

MÉLANIE TARDIF

**CARACTÉRISATION DU RÔLE DE LFA-1 DANS
L'INFECTION DES LYMPHOCYTES T CD4⁺
PAR LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE
HUMAINE DE TYPE 1**

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

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

SEPTEMBRE 2005

© Mélanie Tardif, 2005

Résumé

Le HAART a véritablement révolutionné le traitement anti-VIH en diminuant la morbidité et la mortalité dues au SIDA. Toutefois, les succès demeurent partiels, car avec le temps l'apparition de souches résistantes diminue l'efficacité du traitement. L'un des défis du deuxième millénaire consiste à développer de nouvelles classes d'inhibiteurs efficaces à long terme, spécifiques et non toxiques. La compréhension des événements moléculaires et cellulaires intervenant lors de l'adsorption et de l'entrée du virus dans les cellules cibles représente actuellement une des voies abondamment étudiées. Mon projet de doctorat a ciblé deux facteurs cellulaires participant au processus infectieux du VIH-1. L'objectif premier consistait à déterminer l'influence de la molécule d'adhésion ICAM-1, ancrée dans l'enveloppe du VIH-1, et de son récepteur principal, l'intégrine LFA-1, lors des événements précoces du cycle viral. Les résultats obtenus confirment l'intervention active de l'ICAM-1 et du LFA-1 lors de l'attachement et de l'entrée du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4⁺, un processus lié directement à l'état d'activation de l'intégrine sur les lymphocytes T. La liaison du virus aux intégrines induit des événements de signalisation qui sont favorables à la génération du pore de fusion. Ce phénomène augmente par conséquent l'accès du virus dans le cytoplasme des lymphocytes T CD4⁺ par la fusion des membranes virale et cellulaire. L'interaction entre les deux molécules d'adhérences permet aux virus de s'orienter vers des cellules hautement permissives à l'infection virale, lesquelles expriment des quantités élevées de LFA-1 dans un état d'affinité intermédiaire. Ces données indiquent que le LFA-1 est un cofacteur cellulaire non négligeable dans la pathogenèse virale, particulièrement lors des événements initiaux de l'infection.

Abstract

Since the first isolation of HIV in 1983, huge progress has been made in understanding the biology of the virus and the pathogenesis related to viral infection. HAART has truly revolutionized anti-HIV treatment and reduces AIDS-associated mortality and morbidity. However, the emergence of drug-resistant viruses has decreased the efficiency of HAART. Hence, development of more potent and less toxic drugs than those currently in use represents the next challenges. Recent insights into molecular events involved in viral attachment and entry processes have permitted creation of fusion inhibitors, a new class of anti-HIV drugs. Unfortunately, a number of recent studies revealed that HIV can develop resistance against these new inhibitors. Thus, the understanding of cellular factors collaborating in the early steps of HIV life cycle should be helpful in development of anti-HIV drugs that might be less sensitive to viral mutations. The principal goal of this project was to investigate whether HIV-1-anchored host ICAM-1 participates in the initial steps of HIV-1 life cycle by its interaction with the integrin LFA-1 on target cells. Results confirm the determinant role of this cellular interaction during attachment and entry of viral particles into CD4⁺ T lymphocytes, a phenomenon linked to the activation status of LFA-1. Altogether, these data provide additional clues of the active role played by HIV-1-anchored ICAM-1 and host LFA-1 in the viral life cycle. Such information could be useful in the development of complementary drugs working in combination with fusion inhibitors.

Avant-propos

L'appui de plusieurs personnes influentes m'a permis d'accomplir avec succès mes études doctorales. D'abord, je tiens à remercier très chaleureusement mon directeur de recherche, le Dr Michel J. Tremblay, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et initié au monde du VIH. Sa confiance, ses conseils pertinents, sa grande disponibilité et son dynamisme ont grandement contribué à la réalisation de ce travail de recherche. Je souhaite également remercier tous les membres de mon équipe, présents et passés, et ceux du Dr Benoît Barbeau, pour leurs conseils judicieux, les discussions scientifiques, leur précieuse collaboration et leur amitié. Un grand merci à toutes les personnes qui m'ont aidé dans l'utilisation de nouvelles technologies, notamment Karen Vandal et Michaël Imbeault, ainsi que Sylvie Méthot pour la correction de cette thèse et des articles scientifiques.

Je tiens à remercier le Dr Jacques Corbeil pour avoir accepté de faire la prélecture de ce travail, de même que les Dr Yves St-Pierre et Nicole Bernard pour sa correction.

Merci aux instituts de recherche en santé du Canada (IRSC) et les fonds Hydro-Québec pour leur appui financier durant mes études.

Je remercie du fond de mon cœur ma famille pour m'avoir soutenue et encouragée pendant toutes mes études universitaires.

Enfin, je souhaite sincèrement remercier mon conjoint, Carl Verret, pour son appui inconditionnel, sa compréhension, son écoute et sa bonne humeur qui m'ont réconforté et permis de traverser les moments plus difficiles.

Table des matières

CHAPITRE I. LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE	2
SOMMAIRE DU CHAPITRE	2
1.1 L'ÉPIDÉMIE DU SIDA	2
1.1.1 Épidémiologie	3
1.1.2 Rappel historique	4
1.1.3 Origine du VIH	5
1.2 LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE	6
1.2.1 La sous-famille des lentivirinae	7
1.2.2 Les types et sous-types de VIH	7
1.2.3 Les caractéristiques biologiques du VIH-1	8
1.3 LE TROPISME	16
1.3.1 Le récepteur et les corécepteurs cellulaires	16
1.3.2 Évolution des souches virales chez les individus infectés	18
1.3.3 Les sous-types cellulaires ciblés par le VIH	20
1.4 LE CYCLE VIRAL	31
1.4.1 Attachement	32
1.4.2 Entrée	35
1.4.3 Décapsulation, rétrotranscription et transport du génome viral au noyau	45
1.4.4 Intégration	48
1.4.5 Contrôle de la transcription	48
1.4.6 Transcription et traduction	50
1.4.7 Assemblage et bourgeonnement	52
1.4.8 Maturation des particules virales	58
1.5 LE(S) RÔLE(S) DES MOLÉCULES DE L'HÔTE DANS LE CYCLE DE VIE DU VIH-1	59
1.5.1 Le CMH-II	59
1.5.2 L'ICAM-1	60
1.5.3 Le CD55 et le CD59	60
1.6 LA RÉPONSE DE L'HÔTE À L'INFECTION VIRALE	61
1.7 LA PATHOGENÈSE VIRALE	63
1.7.1 Les marqueurs biologiques	64
1.7.2 La transmission	64
1.7.3 La primo-infection	66
1.7.4 La période de latence	69
1.7.5 L'infection symptomatique	71
1.7.6 Le SIDA	71
1.7.7 Les altérations du système immunitaire au cours de l'infection	72
1.8 LES TRAITEMENTS	77
1.8.1 Les inhibiteurs antirétroviraux	77
1.8.2 Les effets secondaires du HAART	79
1.8.3 Les nouvelles classes de médicaments	79
1.8.4 L'immunothérapie	80
1.9 CONCLUSION	82
CHAPITRE II. L'INTERACTION ENTRE L'ICAM-1 ET LE LFA-1	83
SOMMAIRE DU CHAPITRE	83
2.1 L'ADHÉSION	84
2.2 L'INTÉGRINE LFA-1	85
2.2.1 La sous-famille des β_2 -intégrines	85
2.2.2 Le principal ligand du LFA-1, l'ICAM-1	86
2.2.3 Les caractéristiques physiques du LFA-1	89
2.2.4 Les mécanismes de régulation	91
2.2.5 La signalisation bidirectionnelle	105

2.3	LES PATHOLOGIES ASSOCIÉES À L'INTÉGRINE LFA-1	108
2.3.1	<i>Les maladies héréditaires</i>	109
2.3.2	<i>Les maladies inflammatoires et auto-immunitaires</i>	110
2.4	LES INHIBITEURS DU LFA-1	110
2.5	CONCLUSION	112
CHAPITRE III. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE		113
3.1	HYPOTHÈSE DE RECHERCHE	113
3.2	OBJECTIFS DE RECHERCHE	114
3.3	APERÇU DES RÉSULTATS ET CONTRIBUTIONS SCIENTIFIQUES	115
CHAPITRE IV. LA PRÉSENCE DE LA MOLÉCULE ICAM-1 DANS L'ENVELOPPE VIRALE FAVORISE L'ENTRÉE DU VIH-1 PAR FUSION PLUTÔT QUE PAR ENDOCYTOSE DANS LES LYMPHOCYTES T CD4+ PRIMAIRES.....		117
4.1	RÉSUMÉ.....	117
4.2	ARTICLE	118
CHAPITRE V. LES ÉLÉMENTS PARTICIPANT À LA RÉGULATION DU LFA-1 INFLUENT L'ENTRÉE DU VIH-1 DANS LES LYMPHOCYTES T CD4+ ACTIVÉS.....		158
5.1	RÉSUMÉ.....	158
5.2	ARTICLE	159
CHAPITRE VI. LE LFA-1 EST UN ÉLÉMENT CLÉ DANS L'INFECTION PRÉFÉRENTIELLE DES LYMPHOCYTES T CD4+ MÉMOIRES PAR LE VIH-1.		201
6.1	RÉSUMÉ.....	201
6.2	ARTICLE	202
CHAPITRE VII. DISCUSSION GÉNÉRALE.....		244
7.1	LE LFA-1 PERMET LA LIAISON INITIALE DU VIH.....	246
7.2	LE LFA-1 CONTRIBUE À L'ORGANISATION DU PORE DE FUSION	252
7.3	LE LFA-1 : UN COLLABORATEUR DE LA FUSION VIRALE	260
7.4	LE LFA-1 : UN SIGNAL DIRIGEANT L'INFECTION VERS DES CELLULES PERMISSIVES À LA RÉPLICATION VIRALE.....	262
7.5	PERSPECTIVES	264
7.5.1	<i>Signalisation outside-in.....</i>	265
7.5.2	<i>Effet de LFA-1 sur le tropisme.....</i>	267
7.5.3	<i>Attachement, infection et activation des cellules NK, NKT et CTL.....</i>	267
7.5.4	<i>Cibler LFA-1 : une avenue intéressante dans la lutte anti-VIH.....</i>	268
CHAPITRE VIII. CONCLUSION GÉNÉRALE.....		272
BIBLIOGRAPHIE.....		274

Liste des tableaux

TABLEAU 1 DES RÉPARTITION INFECTIONS À TRAVERS LE MONDE EN 2003	3
TABLEAU 2 RÔLES DES PROTÉINES VIRALES	10
TABLEAU 3 LISTE DES MOLÉCULES DE L'HÔTE INCORPORÉES PAR LE VIH-1	56
TABLEAU 4 INTERACTIONS INTERMOLECULAIRES MÉDIÉE PAR LES CHAÎNE αL ET β_2	103

Liste des figures

FIGURE 1. LA STRUCTURE DU VIH.	8
FIGURE 2. ORGANISATION DU GÉNOME DU VIH ET DE LA SÉQUENCE LTR.....	9
FIGURE 3. DISTRIBUTION DES MOLÉCULES DE GP120 SUR LE VIH-1.	13
FIGURE 4. LA GP120.	15
FIGURE 5. LES DIFFÉRENTES CONFORMATIONS DE LA GP41 16	16
FIGURE 6. GÉNÉRATION DES LYMPHOCYTES T CD4 ⁺ MÉMOIRE CENTRALE ET EFFECTRICE.	23
FIGURE 7. ÉTAPES DU CYCLE VIRAL SELON LA CELLULE INFECTÉE 32	32
FIGURE 8. FUSION.	37
FIGURE 9. RÔLE DES MICROVILLOSITÉS ET DU CHOLESTÉROL LORS DES ÉVÉNEMENTS PRÉCOCES DE L'INFECTION 40	40
FIGURE 10. TRANSCYTOSE DU VIH À TRAVERS LES MUQUEUSES 45	45
FIGURE 11. ÉTAPES INITIALES DU CYCLE VIRAL DANS LES LYMPHOCYTES T CD4 ⁺ 47	47
FIGURE 12. ÉLÉMENTS INFLUENÇANT LA LATENCE VIRALE 49	49
FIGURE 13. TRANSCRIPTION ET IMPACT DE NEF, REV ET VPR SUR LA CELLULE ET L'ASSEMBLAGE DU VIRUS 51	51
FIGURE 14. ASSEMBLAGE DU VIRUS DANS LES LYMPHOCYTES T CD4 ⁺ 54	54
FIGURE 15. TRANSMISSION DANS LES MUQUEUSES INTACTES 67	67
FIGURE 16. LES CLASSES DE MÉDICAMENTS ANTIRÉTROVIRAUX ET LEURS SITES D'ACTION 78	78
FIGURE 17. LES DIFFÉRENTES CONFORMATIONS PRISES PAR LES INTÉGRINES. 94	94
FIGURE 18. LE CYTOSQUELETTE 97	97
FIGURE 19. ORGANISATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE DANS LA CELLULE 98	98
FIGURE 20. REMANIEMENT DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE 99	99
FIGURE 21. INTERACTIONS INTERMOLÉCULAIRES INFLUENÇANT L'ACTIVITÉ DU LFA-1 105	105
FIGURE 22. SIGNALISATION <i>INSIDE-OUT</i> ET <i>OUTSIDE-IN</i> RÉGULANT L'ACTIVATION DU LFA-1 107	107
FIGURE 23. MORPHOLOGIE D'UN LYMPHOCYTE T AU REPOS OU ACTIVÉ 251	251
FIGURE 24. SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE..... 254	254
FIGURE 25. SYNAPSE VIROLOGIQUE ENTRE UN VIRUS _{ICAM-1+} ET UN LYMPHOCYTE T CD4 ⁺ ACTIVÉ 255	255
FIGURE 26. ESSAIS DE FRET..... 266	266

Liste des Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AICD	de l'anglais <i>Activation-Induced Cell Death</i>
AP-1	Protéine activatrice 1
AP2	Protéine adaptatrice de la clathrine 2
APOBEC3G	de l'anglais <i>apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like-3G</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Ester triphosphate de l'adénine
CA	Capside
Ca ²⁺	Calcium
CTL	Cellule T CD8 ⁺ cytotoxique
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
DAG	Diacylglycérol
DC	Cellule dendritique
ERK	Kinase régulée par les signaux extracellulaires
FAK	de l'anglais <i>Focal Adhesion Kinase</i>
GABP	Protéine liant le GA
GEF	de l'anglais <i>Guanine Exchange Factor</i>
GTP	Ester triphosphate de guanine
GDP	Ester biphosphate de guanine
HAART	de l'anglais <i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i>

ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire 1
IN	Intégrase
IFN α	Interféron alpha
IFN β	Interféron beta
IFN γ	Interféron gamma
IP3	Inositol triphosphate
ITAM	de l'anglais <i>Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif</i>
ITIM	de l'anglais <i>Immunoreceptor Tyrosine based Inhibition Motif</i>
JAB-1	de l'anglais <i>Jun activation domain binding protein</i>
JAK	Kinase Janus
JAM-1	de l'anglais <i>Junctional adhesion molecule 1</i>
Kd	Constante de dissociation
kDa	Kilodalton
LFA-1	de l'anglais <i>Leukocyte Function Associated-1 Antigen</i>
LTR	de l'anglais <i>Long Terminal Repeat</i>
MA	Matrice
MAPK	de l'anglais <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
NC	Nucléocapside
NFAT	de l'anglais <i>Nuclear Factor of Activated T cell</i>
NF- κ B	de l'anglais <i>Nuclear Factor kappa B</i>
NRE	Région de régulation négative
PBS	Site de liaison de l'amorce
PHA	Phytohémagglutinine
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIC	Complexe de préintégration

PIP2	Phosphatidylinositol-biphosphate
PKC	Protéine kinase C
PLC γ 1	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
PU.1	de l'anglais <i>PU-box binding factor 1</i>
PYK2	Tyrosine kinase 2 riche en prolines
Rap-1	de l'anglais <i>Ras-Related Protein 1</i>
RapL	de l'anglais <i>Rap-1-Associated Molecule</i>
RCT	Récepteur des cellules T
SDF-1	de l'anglais <i>Stromal-Derived Factor 1</i>
SH	de l'anglais <i>Src Homology Domain</i>
SHP-2	de l'anglais <i>SH2-containing Protein Tyrosine Phosphatase 2</i>
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience humaine acquise
SRC	Sarcome de souris
STAT	de l'anglais <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
cSMAC	de l'anglais <i>central SupraMolecular Activation Clusters</i>
pSMAC	de l'anglais <i>peripheral SupraMolecular Activation Clusters</i>
TAR	de l'anglais <i>Tat Responsive Region</i>
Tmc	Cellule T mémoire central
Tme	Cellule T mémoire effectrice
TI	Transcriptase inverse
TRIM5 α	Protéine 5 alpha à motif tripartite
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne

Mot d'introduction

L'incorporation des molécules de l'hôte par le VIH-1 fut l'objet de nombreuses investigations ces dernières années. La molécule d'adhésion ICAM-1 se trouve parmi celles étant le plus incorporées par le VIH-1 lors de la libération de ce dernier des lymphocytes T CD4⁺ et des macrophages [1-4]. La présence d'ICAM-1 dans l'enveloppe virale augmente considérablement l'infectivité des virus à l'égard des lymphocytes T CD4⁺ lorsque ceux-ci expriment l'intégrine LFA-1 [2, 3, 5]. Cette incorporation réduit également la sensibilité des virus à la neutralisation par des anticorps, ce qui suggère que la molécule d'adhésion participe aux événements initiaux du cycle viral [6, 7].

Ce projet de doctorat a été entrepris sur la base de l'ensemble de ces travaux afin de comprendre et caractériser l'impact de l'incorporation de la molécule ICAM-1 sur l'infectivité du VIH-1. Le premier chapitre porte sur les caractéristiques biologiques, le tropisme, le cycle viral et la pathogenèse du VIH-1 alors que le second présente les éléments régulant l'interaction entre le LFA-1 et l'ICAM-1. Les objectifs de recherche qui ont permis de résoudre l'hypothèse de départ sont énoncés au chapitre trois. Les chapitres quatre, cinq et six contiennent les résultats obtenus dans le cadre de ces travaux et font l'objet de trois publications scientifiques. Ces études comprennent trois volets : 1- La compréhension du mécanisme par lequel la présence de l'ICAM-1 sur le virus augmente l'infectivité du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4⁺ primaires, 2- La caractérisation de ce mécanisme et 3- L'investigation du rôle joué par l'interaction ICAM-1/LFA-1 sur le tropisme du VIH-1 à l'égard des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ présent dans le sang périphérique et les organes lymphoïdes secondaires. Le septième chapitre comporte une discussion générale ainsi que des perspectives futures en relation avec les connaissances acquises tout au long de ce projet alors que le chapitre huit termine sur une conclusion générale

Chapitre I. Le virus de l'immunodéficience humaine

Sommaire du chapitre

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est l'agent étiologique du syndrome de l'immunodéficience acquise, communément appelé le SIDA. Cette maladie, découverte au début des années 80, s'est considérablement répandue à travers le monde et sa propagation perdure encore aujourd'hui. Les dernières estimations réalisées en 2004 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) révèlent qu'entre 36 et 44,3 millions d'individus vivent présentement avec le VIH-1 à travers le monde. Le nombre d'infection prend de l'ampleur dans toutes les régions du globe, mais particulièrement en Asie et en Europe orientale, où le nombre d'infections a grimpé de 50% depuis 2002. Ces tendances montrent qu'il y a encore d'importantes lacunes dans la riposte au VIH/SIDA et que des démarches pragmatiques et ouvertes sur l'avenir demeurent nécessaires pour vaincre cette maladie. Ces approches passent inévitablement par la prévention et le design d'agents antirétroviraux efficaces et abordables. Pour ce faire, la compréhension de la biologie du virus et de ses interactions avec le système immunitaire demeure indispensable. Ce chapitre passe en revue les caractéristiques morphologiques et biochimiques du VIH-1, les étapes de son cycle viral, sa pathogenèse, les altérations au système immunitaire et les traitements antirétroviraux.

1.1 L'épidémie du SIDA

Un quart de siècle s'est écoulé depuis l'apparition du SIDA. Cette maladie origine d'une infection virale provoquée par le VIH. Au cœur d'une épidémie mondiale, cette infection est encore aujourd'hui incurable. Le nombre d'infections progressent toujours et n'épargnent aucune région du monde, et ce, malgré la sensibilisation de plus en plus de

sociétés envers ce fléau, des programmes de prévention et d'éducation, une meilleure prise en charge des personnes infectées et un meilleur accès aux traitements antirétroviraux [8].

1.1.1 Épidémiologie

L'ONUSIDA estime qu'environ 39,4 millions d'individus (dont près de 50% sont des femmes) vivent présentement avec le VIH-1 dans le monde. Bien que ce fléau touche la planète entière, la majorité des infections (90 %) se retrouve dans les pays les plus pauvres [8]. Le tableau 1 indique la répartition des infections à travers le globe.

Tableau 1 Répartition des infections à travers le monde en 2003

Régions du monde	Nombre de personnes infectées par le VIH/SIDA
Afrique subsaharienne	25 millions
Afrique du Nord et Moyen-Orient	550 000
Asie du Sud et Sud-est	6 millions
Asie de l'Est et du Pacifique	1,2 million
Amérique latine et Caraïbes	1,5 million
Europe orientale et Asie centrale	1,3 million
Europe occidentale	580 000
Amérique du Nord	1 million
Australie et Nouvelle-Zélande	15 000

D'après les dernières estimations du ministère de la Santé du Canada, 50 259 canadiens vivent avec le VIH-1 et près de 4 200 nouvelles infections se contractent chaque année [9]. Au Québec, l'infection touche plus de 18 000 personnes et le nombre d'infection augmente au rythme de 1 200 nouvelles infections par année [10]. La quantité de nouveaux cas à travers le monde s'accroît sans cesse, et ce, indépendamment de la richesse des pays et de l'accès aux traitements antirétroviraux. En 2003, près de 5 millions de personnes ont été nouvellement infectées. Ce nombre est le plus élevé depuis le début de l'épidémie.

Depuis 1981, 20 millions d'individus sont décédés du SIDA et environ trois millions de personnes en meurent chaque année (ONUSIDA). Cette infection réduit non seulement l'espérance de vie, mais elle aggrave également la pauvreté dans les pays les moins nantis et entraîne une croissance constante du nombre d'orphelins.

1.1.2 Rappel historique

L'agent étiologique à l'origine du SIDA a été découvert en 1983 par l'équipe du Dr Montagnier et confirmé l'année suivante par celle du Dr Gallo [11-13]. La communauté scientifique s'était mobilisée au début des années 80 afin de démasquer l'agent étiologique responsable de l'infection diagnostiquée chez certaines personnes de la communauté homosexuelle mâle des États-Unis [14, 15]. La présence d'infections opportunistes et de néoplasies inhabituelles chez ces individus traduisait un profond déficit du système immunitaire. À l'époque, on croyait que le SIDA était uniquement une maladie contractée par les personnes d'orientation homosexuelle. Or, les chercheurs découvrirent rapidement que cette maladie touchait également les partenaires des personnes infectées (d'orientation homosexuelle et/ou hétérosexuelle), les hémophiles, les utilisateurs de drogues injectables et les personnes ayant reçu des transfusions sanguines [16-20]. Un rapport publié par le Dr Jonathan Mann mentionne que le nombre de personnes infectées au début des années 80

se situait déjà entre 100 000 et 300 000 [21]. Des analyses rétrospectives ont permis la détection du VIH dans des échantillons datant de 1959, 1969 et 1976, provenant respectivement d'un Africain, d'un Américain et d'un Norvégien [22, 23]. Ces données révèlent que le virus se trouvait déjà sur trois continents avant le début des années 80. D'une façon sournoise, les infections ont progressé à travers le monde, débutant une des pires épidémies que le monde ait connue.

Bien sûr, beaucoup de progrès ont été accomplis depuis les 20 dernières années. La compréhension de la pathogenèse virale a d'ailleurs mené à la création de médicaments antirétroviraux qui ont grandement amélioré l'espérance de vie des personnes infectées. Néanmoins, les succès demeurent partiels puisque ces médicaments ralentissent la progression de l'infection, mais ne l'éliminent pas complètement. De plus, leur accès se limite aux pays les plus riches, ce qui n'améliore en rien le problème dans les pays en voie de développement où le VIH infecte une grande partie de la population.

1.1.3 Origine du VIH

Plusieurs théories ont été énoncées depuis le début de l'épidémie afin de trouver un coupable ou un fait hors du commun responsable de l'épidémie [24]. Or, ce sont les études phylogénétiques qui ont démystifié l'origine du VIH [25-27]. Ce dernier a des liens de parenté avec le virus de l'immunodéficience simienne (VIS). Les singes d'Afrique portent naturellement le VIS et l'homme y est exposé depuis des centaines d'années. Le VIS aurait, à plusieurs reprises au cours du temps, franchi la barrière inter-espèce [24, 28, 29]. Ce passage a nécessité des transformations de la part du virus afin de subsister chez son nouvel hôte. La connaissance de ces adaptations demeure cruciale pour comprendre comment l'épidémie a débuté.

Bien que le VIH origine du VIS, le SIDA ne constitue pas une zoonose (maladie animale transmise à l'homme). La preuve en a été obtenue suite à l'infection, par le VIS, de deux travailleurs en laboratoire. Ces derniers ne développèrent pas le SIDA. Dans le premier cas, l'organisme se débarrassa du virus et dans l'autre, l'infection demeura asymptomatique [30, 31]. D'autres expériences de transmission inter-espèces (entre primates), démontrèrent qu'un virus infectant un nouvel hôte demeure non pathogène et que l'organisme l'élimine [32, 33]. Ces données confirment qu'un virus doit modifier son potentiel pathogène pour infecter un nouvel hôte et coordonner une infection productive. Par contre, l'épidémie actuelle ne peut s'expliquer que par des mutations survenues dans le génome du VIS. En analysant la situation d'un point de vue sociologique et historique, on s'aperçoit que les pandémies sont souvent causées par des changements dans le comportement humain. L'apparition d'un virus pathogène se manifeste généralement par des événements sociaux et biologiques qui facilitent sa transmission. La déforestation, l'augmentation de l'urbanisation et des voyages de même que les comportements sexuels à risques sont quelques exemples de facteurs qui ont certainement contribué à la dispersion du VIH-1 à travers le monde [34-36].

1.2 Le virus de l'immunodéficience humaine

Le VIH fait partie de la grande famille des rétrovirus. Ces virus provoquent des pathologies à évolution lente. Ils partagent certaines propriétés, dont leur structure, leur composition moléculaire et leur mode de répllication. Les rétrovirus se distinguent par leur génome d'ARN qui se rétrotranscrit en ADN proviral à l'aide de la transcriptase inverse. Or, cette enzyme ne corrige pas les mésappariements (*misincorporation*) comme l'ADN polymérase cellulaire. Par conséquent, plusieurs erreurs surviennent lors de la transcription inverse, occasionnant un taux élevé de mutations dans l'ADN rétroviral. Ce dernier s'intègre ensuite dans le génome de la cellule hôte, permettant aux virus de se reproduire pendant toute la durée de vie des cellules infectées.

1.2.1 La sous-famille des *lentivirinae*

Les rétrovirus se subdivisent en trois sous-familles (les *lentivirus*, les *oncovirinae* et les *spumavirinae*) selon le type d'infection qu'ils causent (cytopathique (lytique) ou non cytopathique (oncogène)) et la structure de leur génome. Le VIH appartient à la sous-famille des *lentivirus*. Celle-ci contient plusieurs membres infectant de façon chronique l'homme et les animaux. Ces virus sont exogènes, non oncogène et infectent principalement les cellules du système immunitaire (macrophages et lymphocytes T CD4⁺). Par conséquent, les infections lentivirales résistent aux assauts du système immunitaire et causent généralement des immunodéficiences sur des périodes relativement longues. Un autre caractère distinctif de cette sous-famille, particulièrement pour le VIH, consiste en leur capacité d'infecter des cellules au repos et/ou en différenciation terminale. Leurs génomes contiennent l'information pour tous les gènes essentiels et accessoires nécessaires à l'expression des protéines virales dans les cellules infectées. Les lentivirus ont aussi la capacité de réduire l'expression de leurs protéines chez les cellules infectées et établir un état de latence. Ce dernier peut persister sur une longue période jusqu'à la réactivation du virus lors d'une réponse cellulaire à un agoniste. L'existence de cellules réservoirs (infectées de façon latente) est un des principaux obstacles à l'éradication du VIH chez les patients sous thérapie antirétrovirale.

1.2.2 Les types et sous-types de VIH

Il existe deux types de VIH, soit les types 1 et 2. Ils se différencient par leur origine géographique, l'organisation de leur génome et leur lien de parenté avec le VIS. Certaines données indiquent que le VIH-1 origine de la sous-espèce de chimpanzé *Pan troglodytes troglodytes* [25], alors que le VIH-2 trouve son origine chez le singe *Cercocebus torquatus* [37]. Le VIH-2 se retrouve principalement dans l'ouest de l'Afrique. Il y a trois sous-

groupes de VIH-1 selon les critères phylogénétiques : les groupes M, N et O. Le plus répandu à travers le monde, le groupe M, se subdivise en onze sous-types (*clades*) (A à K), basée sur l'analyse génomique des gènes *env* et *gag*. Le sous-type B infecte la majorité des sidéens vivant en Amérique, en Europe, en Asie et en Australie, alors que les clades A, C, D et E se retrouvent largement en Afrique. Par contre, il y a de plus en plus de sous-types non B retrouvés en Amérique. Les sous-groupes N et O, principalement présents au Cameroun en Afrique, demeurent plus rares [38, 39].

1.2.3 Les caractéristiques biologiques du VIH-1

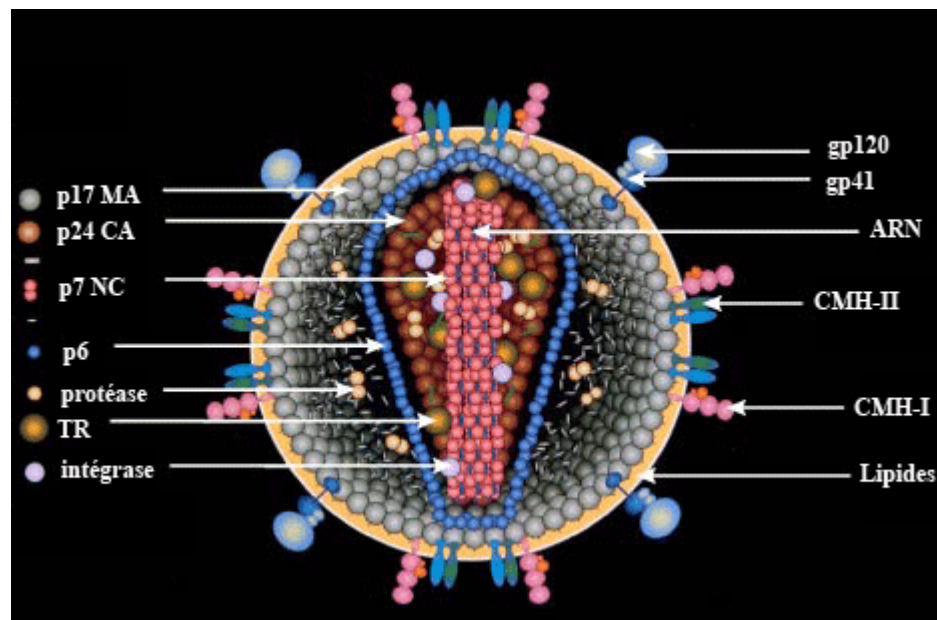


Figure 1. La structure du VIH-1. MA : matrice; CA : capsid; NC : nucléocapsid; TI : transcriptase inverse; ARN : acide ribonucléique; CMH : complexe majeur d'histocompatibilité (adaptée de l'image provenant des Drs Louis Henderson et Larry Arthur et affichée dans le site Internet du National Institute of Health Research (NIH)[40])

1.2.3.1 Organisation génomique

Le matériel génétique du VIH-1 se compose de deux brins d'ARN de 9 200 nucléotides et de polarité positive. La complexité de ce génome explique en grande partie la pathogénicité du VIH-1 (figure 2). Son génome se compose de trois gènes principaux, communs à tous les rétrovirus : *gag*, *pol* et *env*. Le produit de ces gènes est généré sous la forme de précurseurs (polyprotéines).

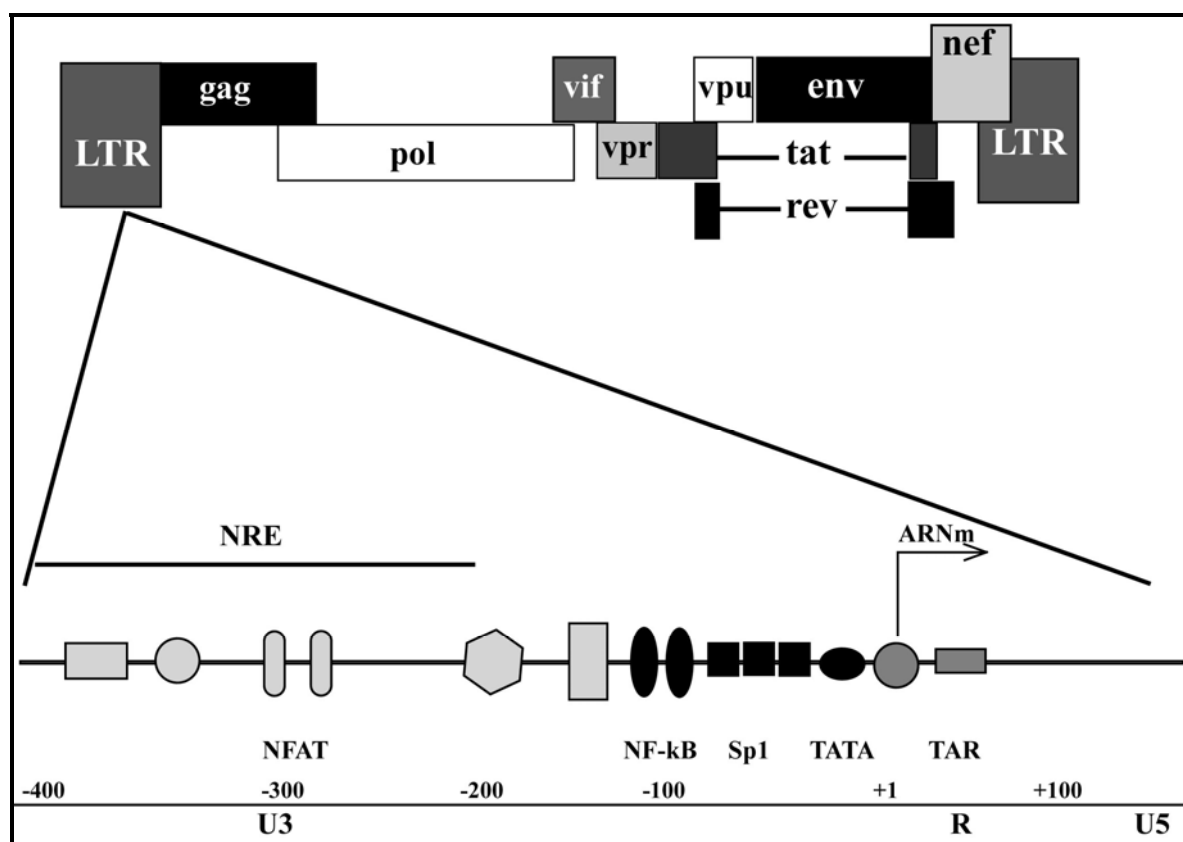


Figure 2. Organisation du génome du VIH-1 et de la séquence LTR (adaptée de [41, 42])

Le gène *gag* code pour des protéines de structure. Le précurseur Gag (Pr55), produit après la traduction de l'ARNm, se clive en quatre protéines : la matrice (p17), la capside (p24), la nucléocapside (p7) et p6. Chaque virus contient environ 1 500 molécules de Gag et 100 de Gag-Pol [43]. Le gène *pol* contient l'information génétique pour la synthèse des enzymes responsables de la transcription inverse de l'ARN en ADN, l'intégration de l'ADN proviral

dans le génome de la cellule hôte et la maturation des virus. Le clivage du précurseur Pol permet la formation de la transcriptase inverse, de l'intégrase et de la protéase. La glycoprotéine gp120 et la protéine transmembranaire gp41 sont toutes les deux issues du clivage du précurseur Env (gp160) lequel provient de la traduction du gène portant le même nom. Une des particularités du VIH-1 consiste à posséder plusieurs autres gènes, dans différents cadres de lecture ouverts. Ces gènes codent pour des protéines qui interviennent dans la réplication du virus. Parmi ces protéines se trouvent Tat et Rev qui permettent respectivement d'augmenter la transcription des gènes et l'expression des protéines virales. D'autres protéines participent également à différentes étapes du cycle viral dont Nef, Vif, Vpr et Vpu. Le tableau 2 résume les fonctions de chacune des protéines virales dans le cycle réplcatif du VIH-1.

Tableau 2 Rôles des protéines virales [44, 45]

Gènes	Protéines et fonctions
<i>gag</i> (de l'anglais <i>Group-Specific Antigen</i>)	Protéines de structure
<i>pol</i> (polymérase)	Transcriptase inverse, protéase, intégrase
<i>env</i> (enveloppe)	Gp120 : attachement/gp41 : fusion
<i>tat</i> (<i>Transactivator</i>)	Régulateur positif de la transcription
<i>rev</i> (<i>Regulator of Viral Expression</i>)	Export des transcrits non épissés hors du noyau
<i>vif</i> (<i>Viral Infectivity</i>)	Empêche la désamination de l'ADN viral en liant la protéine antirétrovirale APOBEC3G
<i>vpr</i> (<i>Viral Protein R</i>)	Transport de l'ADN au noyau, augmente la production virale et contrôle le cycle cellulaire
<i>vpu</i> (<i>Viral Protein U</i>)	Réduit l'expression du CD4
<i>nef</i> (<i>Negative-Regulation Factor</i>)	Augmente l'infectivité et réduit l'expression du CD4

Deux séquences promotrices répétées, communément appelées LTR (de l'anglais *Long Terminal Repeat*), bordent les extrémités du génome viral. Ces séquences contiennent plusieurs sites actifs reconnus par la protéine virale Tat et divers facteurs de transcription cellulaires, lesquels modulent la transcription du VIH-1. Trois régions nommées U3 (nucléotide (nt) -454 à -1), R (site d'initiation à +60) et U5 (nt +60 à +181) (figure 2) composent le LTR [46]. Elles contiennent quatre domaines fonctionnels responsables de la transcription du VIH-1 : la région TAR (de l'anglais *Tat-Activation-Response element*) se situant en aval du site d'initiation (nt +1 à +60), la région promotrice contenant la boîte TATA (nt -78 à -1), la région amplificatrice (nt -105 à -79) et la région modulatrice (nt -454 à -104). Cette dernière contient une région nommée NRE (de l'anglais *Negative Regulatory Element*) régulant négativement la transcription virale [47]. Ces régions (promotrice, amplificatrice et modulatrice) contiennent divers sites consensus de liaison à certains facteurs de transcription cellulaire, notamment NF- κ B. C'est pourquoi l'activation de ces facteurs de transcription, par des agonistes cellulaires, influence la transcription du VIH-1. Les sites consensus présents dans le LTR sont illustrés à la figure 2.

1.2.3.2 La nucléocapside, la capsidite et la matrice

La capsidite, une structure icosaédrique, protège l'ARN viral (Figure 1). L'encapsidation de cet ARN non épissé dépend de son interaction avec la nucléocapsidite (nommée NC ou p7). Cette dernière lie le signal d'encapsidation situé près de l'extrémité 5' de l'ARN viral [48]. Les enzymes virales, soit la transcriptase inverse p66/p51, l'intégrase p32 et la protéase p12, sont aussi encapsidées avec le matériel génétique [49, 50]. La protéine virale Vpr se trouve également à l'intérieur de la capsidite grâce à son interaction avec la protéine p6 [51]. L'ARNt^{lys3}, servant d'amorce à la transcriptase inverse, est aussi spécifiquement encapsidé avec l'ARN viral. Son encapsidation dépend de son interaction avec le Pr55Gag, l'ARN viral et l'ARNt synthétase [52]. Toutes ces molécules sont incluses à l'intérieur de la capsidite, une structure formée essentiellement de la protéine virale p24. Cette dernière est

composée d'un domaine structural et d'un domaine fonctionnel. La partie N-terminale forme le corps de la protéine, alors que la partie C-terminale contient un domaine de dimérisation. Chacune des régions a un rôle bien précis : la région C-terminale assure la multimérisation nécessaire à l'assemblage de la structure, pendant que la partie N-terminale joue un rôle dans la condensation et la morphogénèse de la capsid [53]. La p24 contient également un domaine dans sa région N-terminale permettant la liaison d'une protéine cellulaire, la cyclophiline A. Cette dernière s'intercale entre les p24 de la capsid avec un ratio approximatif de 1:10 [54]. Cette protéine cellulaire, essentielle à l'infectivité virale, participe à la décapsidation et sert de chaperon durant la maturation de la p24 [55, 56]. Les protéines de la matrice (nommée MA ou p17) forment un halo autour de la capsid. La MA subit un changement post-traductionnel par l'ajout d'un groupement myristyl. Celui-ci détermine le site d'assemblage et de bourgeonnement des particules virales grâce à son ancrage à la membrane plasmique [57]. La MA intervient également lors de la décapsidation et de la migration du complexe de pré-intégration vers le noyau.

1.2.3.3 L'enveloppe virale

L'enveloppe virale, composée d'une bicouche lipidique issue des cellules infectées, entoure la matrice (Figure 1). Le virus enveloppé a un diamètre d'environ 80 à 120 nm. L'enveloppe est riche en cholestérol et peu fluide [58], deux caractéristiques intimement liées à la région où le virus bourgeonne. En effet, plusieurs études ont démontré que la libération des particules virales a lieu à partir des radeaux lipidiques, des domaines membranaires riches en cholestérol et en glycosphingolipides. Cette étape du cycle de vie du VIH-1 sera davantage élaborée dans une section ultérieure.

1.2.3.4 La gp120 et la gp41

Les premières analyses de la structure du VIH-1 ont révélé que plusieurs spicules, composés chacun de trois exemplaires des protéines virales gp120 et gp41, tapissent l'enveloppe virale [59-61]. Ces résultats suggéraient qu'environ 72 spicules recouvrent la surface des particules virales séparées l'une de l'autre par environ 21 à 22 nm [62, 63]. Or, de nouvelles données, acquises par microscopie à force atomique, indiquent que les molécules de gp120 forment des amas asymétriques d'environ 200 Å (bouquets) plutôt que des trimères symétriques de 360 kDa [64]. Ces bouquets se forment par la liaison non covalente de plusieurs monomères de gp120 à trois molécules de gp41, un processus plus aléatoire qu'ordonné. Les équipes du Dr A. McPherson [64] et du Dr J.A.T. Young [65] affirment que l'arrangement symétrique (trimère gp120/41), observé par des études de cristallographie, n'existe pas sur les virus libres, mais se forme une fois que les gp41 adoptent une conformation fusogène (à la suite de la liaison des monomères de gp120 aux molécules de CD4 et aux co-récepteurs). Il faudra toutefois de nouvelles investigations afin de confirmer cette hypothèse. La figure 3 montre la distribution des molécules de gp120 sur le virus telle que révélée par la microscopie électronique (A) et à force atomique (B).

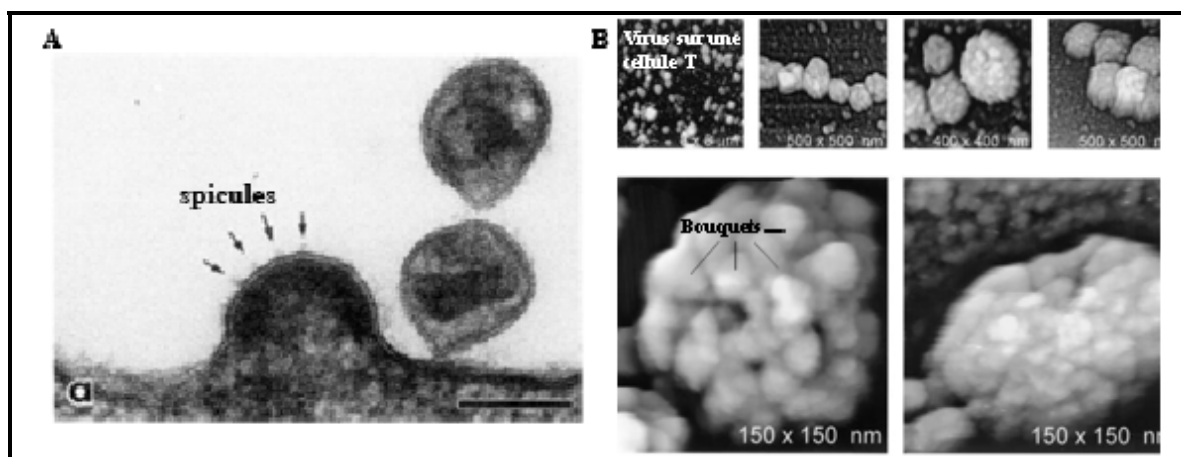


Figure 3. Distribution des molécules de gp120 sur le VIH-1. (A) Adaptée de [63] B) Adaptée de [64])

Les protéines de l'enveloppe sont initialement produites en un seul précurseur, la gp160. Cette polyprotéine subit diverses étapes de maturation dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, incluant son repliement, sa glycosylation, son oligomérisation et son clivage par des protéases cellulaires générant les glycoprotéines gp120 et gp41 [66]. La gp120 possède plus de vingt sites consensus de glycosylation [67-69]. Les sucres représentent 40 à 50% de son poids moléculaire. Le profil de glycosylation dépend de la cellule hôte et peut influencer la liaison du virus avec certains récepteurs cellulaires. Par ailleurs, la glycosylation de certains de ses acides aminés lui confère une résistance aux anticorps neutralisants, une stratégie employée par le virus pour échapper au système immunitaire. La gp120 se compose de cinq régions constantes (C1 à C5) intercalées entre cinq régions variables (V1 à V5) [70]. Des études de cristallographie et résonance magnétique nucléaire (RMN) ont montré que les régions constantes forment le corps central (pont) de la gp120, alors que les régions variables, à l'exception de V5, forment des boucles à la surface de la protéine (Figure 4A) [71, 72]. Les trois domaines formant le corps participent à la liaison du CD4 et du corécepteur (figure 4B), les molécules cellulaires responsables de l'attachement et de l'entrée du virus. Le site de liaison du CD4 se trouve dans la dépression formée à l'interface des trois domaines [71]. Le site de liaison du corécepteur semble plutôt se retrouver dans les régions variables de la gp120, au niveau de la boucle V3. L'engagement avec le CD4 entraîne un mouvement des boucles V1 et V2 libérant la boucle V3 et permettant à cette dernière de se déplacer vers le site de liaison du corécepteur [73]. L'interaction entre la gp120 et le corécepteur enclenche un réarrangement de la gp41 et entraîne l'exposition du peptide de fusion.

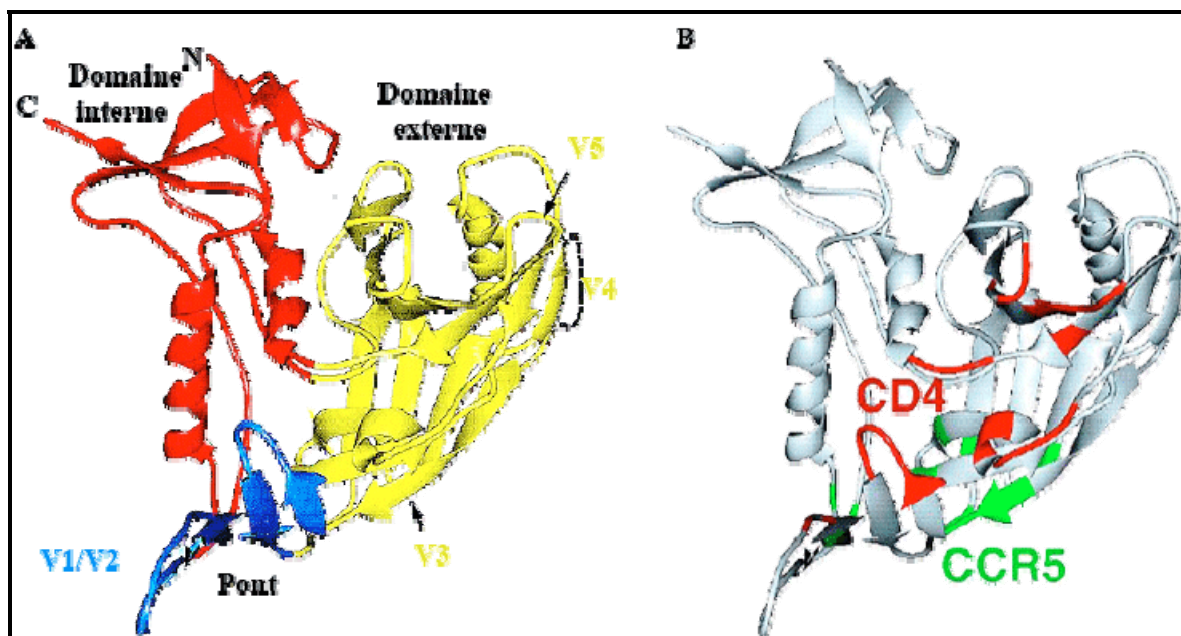


Figure 4. La gp120. A) Structure; B) Domaine liant le CD4 et le corécepteur (CCR5) (adaptée de [71])

La gp41 est une protéine transmembranaire, masquée par la gp120 lorsque celle-ci n'est pas engagée par le CD4. Elle s'ancre dans l'enveloppe virale via son domaine transmembranaire très hydrophobique et lie de façon non covalente la glycoprotéine gp120 [74]. La gp41 contient quatre régions fonctionnelles : le peptide de fusion positionné en N-terminale, l'ectodomaine, la région transmembranaire et la région cytoplasmique. Des études de cristallographie ont démontré que la gp41 est formée d'un corps trimérique composé d'hélices alpha parallèles correspondant à la région N-terminale. Le corps s'entoure d'hélices alpha obliques correspondant à la région C-terminale et alignées de façon antiparallèle créant un trimère d'hétérodimères. L'insertion du peptide de fusion dans la membrane cellulaire induit la formation de la conformation en super hélice (de l'anglais *coiled coil*) [75, 76]. Ce processus entraîne la dissociation de la gp41 de la gp120 et la formation d'un complexe à six hélices (de l'anglais *six-helix bundle*), nécessaire à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique. Les différentes conformations prises par la gp41 sont présentées à la figure 5 ci-dessous.

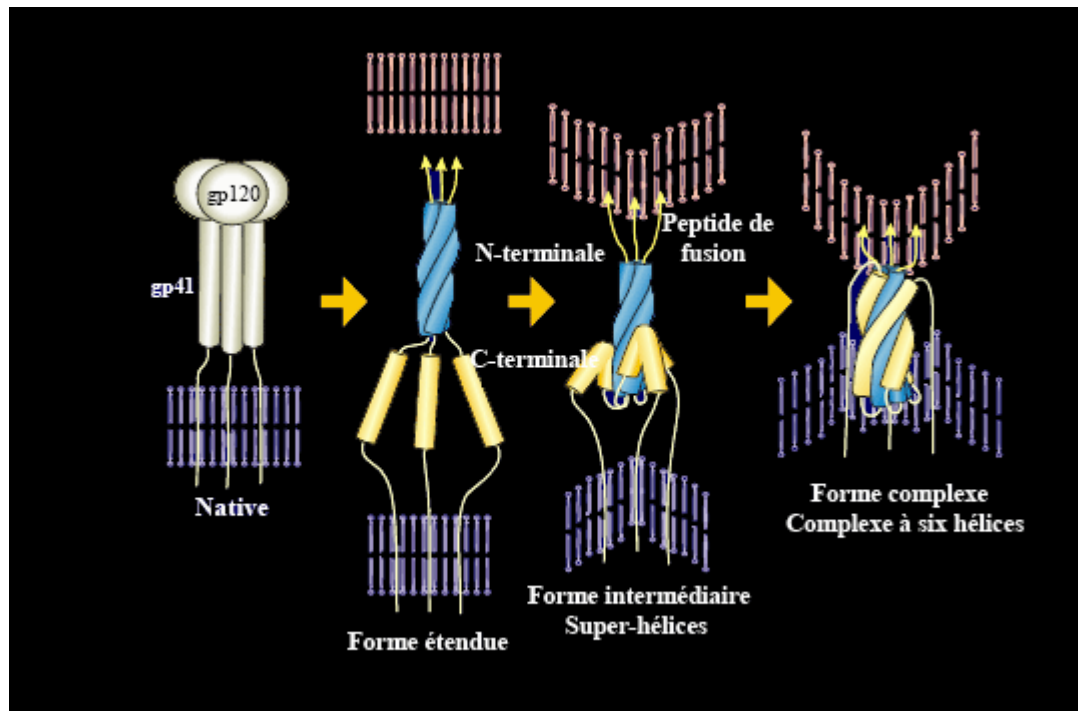


Figure 5. Les différentes conformations de la gp41 (adapté de [77])

1.3 Le tropisme

1.3.1 Le récepteur et les corécepteurs cellulaires

1.3.1.1 Le CD4

La découverte du VIH fut rapidement suivie par la caractérisation de son principal récepteur cellulaire, le CD4 [78-82]. Chacun des monomères de gp120 contient un site de liaison pour le CD4 [83]. Cette protéine de 55 kDa est un membre de la superfamille des immunoglobulines. Elle contient quatre domaines extracellulaires (D1 à D4), une région transmembranaire et une queue cytoplasmique associée généralement avec la protéine tyrosine kinase p56^{Lck}. La liaison de la gp120 se fait au niveau des domaines D1 et D2 et requiert certains acides aminés chargés du domaine D2, notamment les lysines 29, 35 et 46 et l'arginine 59, de même qu'un acide aminé hydrophobique, la phénylalanine 43 [84-86].

La longueur des domaines extracellulaires du CD4 est évalué à 120 Å [87]. Cette molécule s'exprime fortement sur les thymocytes et les lymphocytes T CD4⁺ matures, et plus faiblement sur les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les cellules neuronales et les cellules gliales. Son rôle dans la cellule demeure encore méconnu, mais elle agirait entre autres comme récepteur pour l'interleukine 16, une cytokine chimiotactique pour les lymphocytes T CD4⁺ [88]. Par ailleurs, le CD4 agit aussi comme ligand pour le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II). Il augmente l'avidité du récepteur des cellules T (RCT) envers le CMH-II contenant un antigène dans sa niche peptidique.

1.3.1.2 Les corécepteurs

Après la découverte du CD4, plusieurs groupes démontrèrent la nécessité d'autres facteurs cellulaires distincts pour enclencher la fusion du VIH-1 avec la membrane plasmique de la cellule hôte. À cette époque, plusieurs résultats expérimentaux suggéraient l'existence de deux souches virales différentes : celle à tropisme lymphocytaire T et celle à tropisme macrophagique. Le CCR5 et le CXCR4, deux récepteurs de chimiokines, sont apparus, au milieu des années 90, comme des éléments clés du processus d'entrée virale. Il s'est avéré que ces récepteurs coopèrent avec le CD4 lors du processus de fusion [89, 90]. Bien que d'autres corécepteurs de chimiokines soient connus, notamment le CCR2b, le CCR3, le CCR8, le CX3CR1 et le CXCL16, le CXCR4 et le CCR5 sont les plus utilisés [91-97]. L'emploi préférentiel de l'un ou l'autre des corécepteurs détermine le tropisme des souches virales (X4, R5 ou X4R5) [98]. Les souches R5 infectent uniquement des cellules exprimant le CCR5 à leur surface (macrophages, cellules dendritiques, cellules T CD4⁺ activées). Par ailleurs, ces souches peuvent également être transportées par transcytose à travers les cellules épithéliales. Par contre, les souches X4 ciblent et infectent exclusivement les cellules exprimant le CXCR4 (cellules T CD4⁺ naïves, mémoire centrale

et mémoire effectrice). Les souches X4/R5 n'ont aucune préférence et infectent les cellules exprimant l'un ou l'autre des corécepteurs.

Les récepteurs de chimiokines sont des protéines à sept domaines transmembranaires couplées aux petites protéines G. Leurs principales fonctions consistent à lier des chimiokines et déclencher une cascade de signalisation. Cette signalisation entraîne la migration des cellules au site inflammatoire où les chimiokines sont sécrétées. La principale chimiokine se liant au CXCR4 est le SDF-1, alors que le CCR5 peut en lier quatre : Rantes, MIP-1 α/β et MCP2. La liaison de la gp120 avec le CCR5 ou le CXCR4 dépend en partie des charges électrostatiques des différentes protéines. En effet, les récepteurs de chimiokines portent des charges négatives, alors que la gp120 possède des charges positives [60, 99, 100]. Les ligands naturels (chimiokines) du CXCR4 et du CCR5 entrent en compétition avec la gp120 pour l'attachement aux corécepteurs. En effet, leur sécrétion par les cellules immunitaires (par exemple les lymphocytes T CD8⁺ et les macrophages) supprime la réplication du VIH-1 [101].

1.3.2 Évolution des souches virales chez les individus infectés

La population virale chez un individu infecté est extrêmement polymorphe. Cette variation permet au VIH-1 d'échapper au système immunitaire. Deux mécanismes expliquent sa très grande variabilité génétique : le taux d'erreur élevé de la transcriptase inverse lorsqu'elle transcrit l'ARN en ADN, et le taux élevé du renouvellement viral [102]. Les erreurs qui surviennent lors du cycle de réplication sont très abondantes (deux mutations par cycle réplcatif). Par conséquent, chaque virus produit est unique avec des propriétés biologiques qui lui sont propres (p. ex. tropisme, effet cytopathogène ou vitesse de réplication). Toutefois, de nombreux virus synthétisés sont défectifs et non infectieux. Le virus se réplique massivement à un rythme de 10^8 à 10^9 virions par jour [103]. Or, il arrive que les

mutations procurent un avantage au virus. Par exemple, la présence d'un agent antirétroviral provoque la sélection de virus résistants et ces derniers en viennent à former la majeure partie de la population virale. La capacité du VIH-1 à modifier perpétuellement ses épitopes immunogènes explique pourquoi, encore aujourd'hui, il n'existe aucun vaccin efficace pour prévenir l'infection.

Le changement de tropisme chez un individu infecté demeure un bon exemple de variabilité génétique. Lors de la transmission et de la phase asymptomatique, les virus qui prédominent arborent un tropisme pour le corécepteur CCR5 (R5) [104]. Toutefois, durant les différents stades de l'infection, il y a génération de quasi-espèces à tropisme CXCR4 (X4) et/ou X4/R5 [105]. L'apparition des virus X4 entraîne rapidement la progression vers le SIDA [106]. Ces souches virales sont beaucoup plus destructives et causent d'importants effets cytopathogéniques, notamment l'apparition de syncytium et une diminution du nombre de lymphocytes T CD4⁺. Plusieurs données suggèrent que les souches R5 prédominent lors de la transmission. Des études épidémiologiques antérieures démontrent qu'une délétion de 32 paires de bases dans le gène du CCR5 ($\Delta 32$ CCR5) empêche l'expression de la protéine à la surface cellulaire, protégeant ainsi les individus homozygotes contre la transmission virale [107-110]. D'autre part, certaines études suggèrent que la prédominance des souches R5 est causée par la translocation de celles-ci, des muqueuses vers les sous-muqueuses et/ou les tissus périphériques. Par opposition, les souches X4 demeureraient emprisonnées dans les muqueuses et seraient éventuellement détruites par l'environnement hostile et non propice à l'infection [111, 112]. La sécrétion massive de SDF-1, le ligand du CXCR4, par les cellules épithéliales des muqueuses contribue également à réduire l'infection des cellules environnantes par les souches X4 au moment de la transmission [113]. Même si plusieurs preuves démontrent la supériorité des souches R5 en début d'infection, le tropisme initial du VIH-1 demeure un sujet controversé. D'autres études seraient nécessaires afin d'éclaircir pourquoi les souches R5 prédominent lors de la primo-infection et identifier les facteurs prédisposant à la transformation d'une souche R5 en une souche X4 plus virulente.

1.3.3 Les sous-types cellulaires ciblés par le VIH-1

On sait que le VIH-1 infecte de préférence les cellules qui expriment le CD4 et l'un ou l'autre des co-récepteurs (CXCR4 ou CCR5). Par contre, certaines études montrent qu'il aurait également la capacité d'infecter des cellules dépourvues de CD4, notamment les lymphocytes B [114], les astrocytes [115, 116], les cellules épithéliales, dont les trophoblastes [117], les thymocytes [118], les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules dendritiques [119]. L'infection de ces cellules requiert toutefois la présence de l'un ou l'autre des corécepteurs. Une étude menée par l'équipe du Dr M.A. Goldsmith a démontré que l'infection de cellules dépourvues de CD4 nécessite la présence de cellules exprimant cette molécule dans l'environnement [120]. Ce chercheur affirme que les molécules de CD4 et les corécepteurs n'ont pas besoin d'être exprimées sur la même cellule. En fait, une cellule qui exprime le CD4 pourrait coopérer avec une autre qui ne l'exprime pas lorsqu'elles se trouvent à proximité l'une de l'autre. Ce phénomène expliquerait selon lui pourquoi le VIH-1 infecte les cellules déficientes en molécules de CD4.

1.3.3.1 Les lymphocytes T CD4⁺

Le VIH-1 infecte principalement les lymphocytes T CD4⁺. Ces cellules expriment des quantités élevées de CD4 et différents niveaux des molécules CXCR4 et CCR5 (selon l'état d'activation cellulaire). Elles constituent une population hétérogène où l'on retrouve des cellules avec un profil naïf ou mémoire. Les lymphocytes T naïfs, issus du thymus, n'ont jamais rencontré l'antigène. Ils sont dans un état quiescent (stade G₀), c'est-à-dire qu'ils ne se divisent pas ou très peu (une fois à tous les 365 jours) et vivent très longtemps [121]. Ces cellules se distinguent phénotypiquement par la présence de l'isoforme RA du CD45 [122, 123], une protéine tyrosine phosphatase participant aux événements de signalisation intracellulaire [124]. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs expriment peu de molécules d'adhésion, mais des niveaux élevés de CD62L (L-sélectine) et de CCR7 (récepteur de

chimiokine) [125], deux molécules requises au recrutement des cellules naïves dans les organes lymphoïdes secondaires [126, 127]. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs circulent dans le sang et la lymphe, passant par les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, amygdales, rate et plaques de Peyers). Ils recirculent une à deux fois toutes les 24 heures, en patrouillant en permanence à la recherche de cellules dendritiques leur présentant un antigène spécifique [128]. En l'absence de contact spécifique, les cellules quittent l'organe lymphoïde secondaire, retournent dans la circulation et migrent vers d'autres tissus lymphoïdes. Lorsqu'une cellule reconnaît un peptide, elle cesse sa migration et demeure attachée à la cellule présentatrice d'antigène (CPA). Ce contact permet l'échange de signaux amorçant la stimulation des cellules. Selon l'intensité du signal reçu et les cytokines présentes dans l'environnement, la cellule T naïve s'active et se différencie en cellule effectrice ou non effectrice [129-131].

Conformément à l'éducation qu'elles ont reçue, les cellules effectrices se différencient en cellules de type TH1 ou TH2 [128]. Cette distinction est intimement liée à la gamme de cytokines produites et des cellules qu'elles activent :

- TH1 → macrophages et cellules T CD8⁺;
- TH2 → cellules B et mastocytes.

La stimulation des cellules naïves entraîne aussi l'expression d'un nouvel éventail de molécules permettant d'orienter les différentes sous-populations vers les tissus périphériques où l'inflammation a lieu. Ces cellules cessent d'exprimer du CD62L et du CCR7 et expriment d'autres molécules, notamment certains récepteurs de chimiokines tels que le CCR5, le CCR4 et le CXCR3, des molécules nécessaires à leur entrée dans les tissus non lymphoïdes [131] [132]. La migration des cellules effectrices de type TH1 vers les tissus périphériques entraîne leur différenciation en cellules dites « mémoire effectrice » (Tme) [129][131]. En présence de l'antigène, ces dernières sécrètent toute une variété de cytokines et de médiateurs de l'inflammation servant au recrutement et à l'activation

d'autres cellules immunitaires. Ces phénomènes ont pour but de détruire les pathogènes. Les cellules effectrices de type TH1 coordonnent également une réponse immune spécifique par l'intermédiaire des CTL, des cellules essentielles à la réponse cytotoxique. Les lymphocytes T CD4⁺ de type TH1 contribuent à l'activation des cellules CD8⁺ naïves par la sécrétion de cytokines et/ou l'activation de cellules présentatrices d'antigènes dans les organes lymphoïdes secondaires [128]. Les cellules ayant un profil TH2 stimulent les lymphocytes B dans les organes lymphoïdes secondaires afin qu'ils produisent des anticorps spécifiques [128].

Lorsque le signal provenant d'une CPA est plus faible, mais tout de même spécifique, la cellule naïve se différencie en cellule T non effectrice avec un phénotype « mémoire centrale » (Tmc) [131]. Cette sous-population exprime l'isoforme RO du CD45, le CD62L de même que le CCR7 et exprime à sa surface un grand nombre de molécules d'adhésion, notamment la molécule LFA-1 [133,134]. Ces lymphocytes, bien que dans un état quiescent, se divisent à un rythme plus élevé que les cellules naïves (une fois / 48 jours) [121]. Tout comme ces dernières, les cellules Tmc n'ont pas de fonction effectrice, c'est-à-dire la capacité de produire une variété de cytokines et de médiateurs de l'inflammation. Elles patrouillent dans le sang et la lymphe comme les cellules naïves jusqu'à ce qu'elles rencontrent pour une deuxième fois l'antigène, présenté par une cellule présentatrice d'antigène (macrophage, cellule dendritique ou cellule B) dans les organes lymphoïdes secondaires. Rapidement, les cellules mémoire prolifèrent, se différencient en cellules Tme et organisent la réponse immunitaire spécifique. Ces cellules empruntent ensuite la circulation et se dirigent vers les tissus enflammés. Les cellules Tme se retrouvent à la fois dans les tissus lymphoïdes et les tissus périphériques. Elles ne vivent pas très longtemps et se divisent en moyenne à tous les 15 jours [121]. La figure 6 montre les différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ (avec leurs marqueurs) et leur génération suite à la rencontre avec des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs).

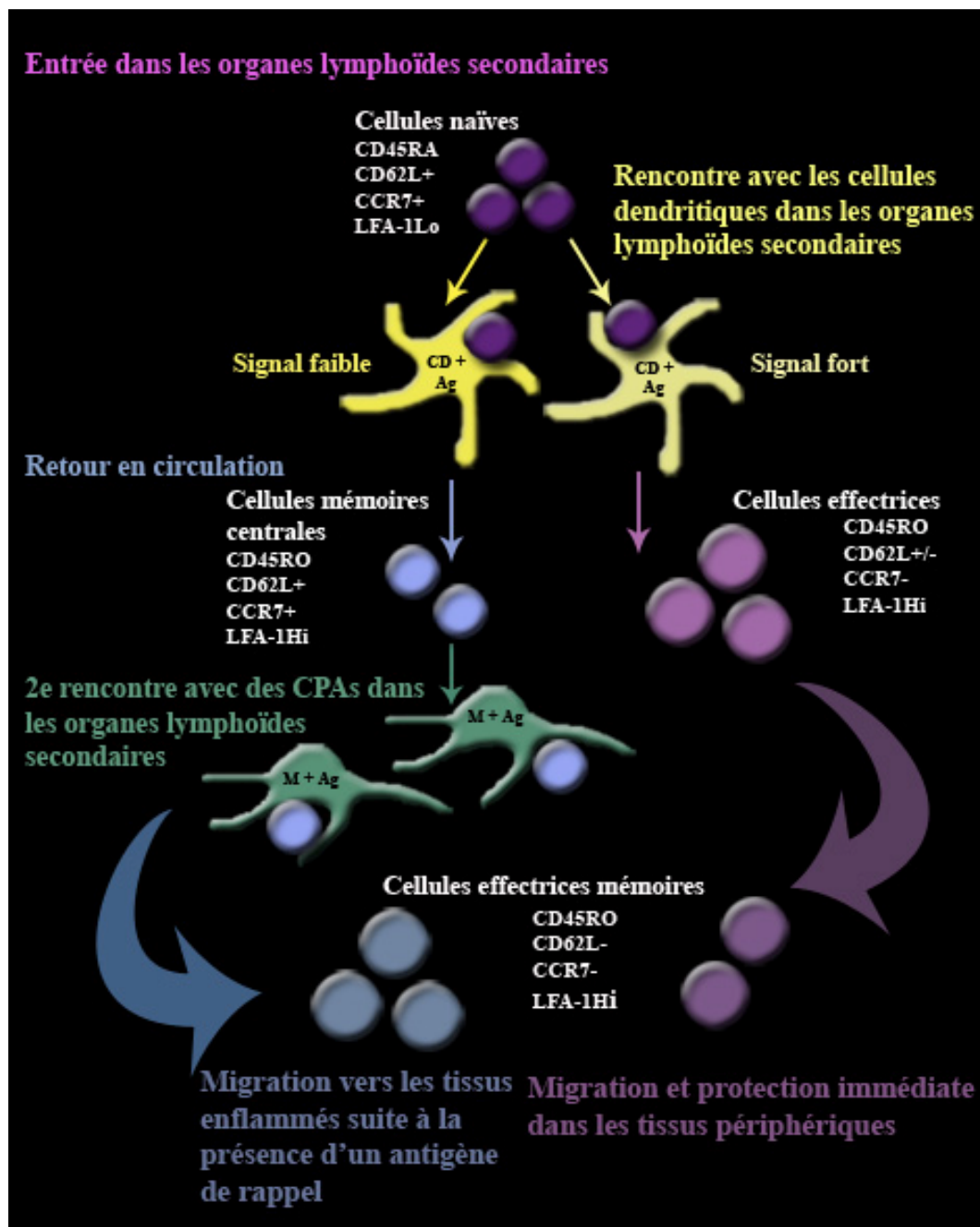


Figure 6. Génération des lymphocytes T CD4⁺ mémoire centrale et effectrice. (CD : cellule dendritique, M : macrophage, Ag : antigène).

Bien que les lymphocytes T CD4⁺ naïfs expriment à la fois le CD4 et le CXCR4, ils sont déficients en CCR5 [135]. La capacité du VIH-1 à infecter ces cellules est encore aujourd'hui contestée. Beaucoup d'études traitant ce sujet complexe ont basé leurs résultats

sur les cellules quiescentes totales sans discriminer entre celles ayant un profil naïf ou mémoire. D'autres études ont toutefois différencié les deux et démontré que le VIH-1 entre dans les cellules T CD4⁺ naïves. Par contre, la transcription inverse et l'intégration y sont peu efficaces [136, 137]. L'analyse des lymphocytes T CD4⁺ naïfs provenant de sujets infectés a montré que ces cellules contiennent effectivement de l'ADN proviral, mais en plus faible quantité que les cellules ayant un phénotype mémoire [130, 138]. Ces dernières expriment des niveaux équivalents de CD4 et CXCR4 à celui sur les cellules naïves [135]. Par contre, elles contiennent davantage de facteurs cellulaires favorisant la transcription inverse, l'intégration et la transcription du VIH-1. Les cellules Tmc intègrent beaucoup plus d'ADN proviral dans leur génome. Bien qu'elles soient au repos, elles ont un métabolisme plus actif que les cellules naïves [139]. Par conséquent, elles présentent une susceptibilité accrue à l'infection et contribuent à générer de nouvelles particules virales. Ces cellules constituent le principal réservoir du VIH-1 chez les personnes infectées [130, 140]. Les cellules T activées demeurent tout de même le meilleur environnement pour la réplication du VIH-1. Elles expriment à la fois le CXCR4 et le CCR5 (celles avec un profil TH1) [141] et contiennent de nombreux facteurs de transcription nécessaires à la réplication virale. Une fois infectées, ces cellules génèrent une importante quantité de virus avant de périr.

1.3.3.2 Les macrophages

Les macrophages détruisent des pathogènes et sécrètent des cytokines et des médiateurs de l'inflammation, deux fonctions associées à la réponse innée [128]. Ces cellules participent également à l'immunité spécifique en présentant des peptides antigéniques aux lymphocytes Tmc. Complètement différenciés, les macrophages proviennent des monocytes qui circulent dans les systèmes sanguin et lymphatique. Lorsque ces derniers s'activent (sous l'effet des cytokines ou autres agents pro-inflammatoires), ils migrent vers les tissus enflammés où ils se différencient en macrophages. Après avoir phagocyté des

antigènes, les macrophages empruntent la circulation et présentent l'antigène aux lymphocytes T CD4⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires. Les macrophages expriment à la fois le CD4, le CXCR4 et le CCR5. Plusieurs études contradictoires ont investigué la capacité des souches X4 à infecter de façon productive ces cellules. Certaines affirment que ces souches entrent dans les macrophages sans qu'il y ait une infection productive, alors que d'autres affirment le contraire [142-146]. Des études biochimiques ont révélé que les molécules de CXCR4 s'expriment sous forme de monomère sur les monocytes et les lymphocytes T. Par opposition, il semble qu'elles forment des complexes entre elles dans la membrane des macrophages [147]. Cette forme est incapable de coprécipiter avec le CD4, contrairement à la forme monomérique, suggérant que le CXCR4 ne s'associe pas avec le récepteur du VIH-1 dans les macrophages. Ces résultats expliqueraient l'incapacité des souches X4 à infecter les macrophages. D'autres données indiquent que le CCR5 et le CXCR4 interfèrent entre eux lors de l'entrée du VIH-1 et entrent en compétition pour les molécules de CD4 disponibles.

Les macrophages tissulaires, présents dans des organes non lymphoïdes tels que les poumons (macrophages alvéolaires), le foie (cellules de Küpffer) [148], le placenta (cellules de Hofbauer) [149] et le cerveau (cellules microgliales) [150], sont également susceptibles à l'infection virale. L'infection de ces cellules contribue fortement à l'établissement de réservoirs viraux, à l'affaiblissement du système immunitaire, de même qu'à la dégénérescence du système nerveux central [151, 152]. Le VIH-1 emprunte différentes routes pour entrer à l'intérieur des macrophages, dont la phagocytose, la macropinocytose et la fusion [153, 154]. Le macrophage sert aussi de cheval de Troie et transmet le virus aux cellules présentes dans les tissus non lymphoïdes et/ou aux lymphocytes T CD4⁺ [155, 156], un phénomène qui sera plus amplement abordé dans la section sur l'attachement et l'entrée virale.

1.3.3.3 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques, un autre type de cellules présentatrices d'antigènes, permettent l'activation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs [128]. Il y a deux classes de cellules dendritiques : les cellules immatures et les matures. Les cellules immatures, comme les cellules de Langerhans, se trouvent dans les muqueuses et la peau où elles agissent en éclaireur. Elles surveillent et informent l'hôte lors de l'intrusion de corps étrangers. Elles ont la capacité de phagocyter, d'internaliser les antigènes exogènes et de les exposer grâce aux molécules du CMH-II. Après la capture de l'antigène, les cellules se différencient en cellules matures et migrent aux organes lymphoïdes secondaires où elles présentent l'antigène aux cellules T CD4⁺. Les cellules dendritiques expriment à la fois le CD4 et les corécepteurs du VIH-1, mais à des niveaux plus faibles que sur les lymphocytes T CD4⁺. Plusieurs études ont montré le rôle déterminant joué par la molécule DC-SIGN (de l'anglais *Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3) grabbing nonintegrin*) dans la capture des particules virales. Cette capture se fait par l'intermédiaire de la gp120 virale. Or, d'autres études suggèrent que différentes interactions contribuent à la capture du VIH-1 par les cellules dendritiques, notamment celles avec le récepteur du mannose, la langerine et d'autres molécules qui demeurent méconnues [157-159]. Les virus attachés à ces récepteurs se transfèrent ensuite aux lymphocytes T CD4⁺. D'autre part, deux études ont récemment rapporté que le VIH-1 a la capacité d'infecter les cellules dendritiques pour qu'elles produisent du virus. La première étude démontre que les cellules de Langerhans, les premières cellules entrant en contact avec le virus dans les muqueuses, s'infectent par les souches R5 du VIH-1 [160]. La deuxième étude suggère que les cellules dendritiques immatures produisent du virus et que le transfert s'effectue en deux phases : le transfert précoce, occasionné par la capture du virus et son relargage aux cellules T, et le transfert tardif, généré par la production de nouvelles particules virales par les cellules dendritiques infectant ensuite les cellules avoisinantes [157]. Cependant, la voie d'entrée menant à une infection productive dans les cellules dendritiques n'a pas encore été décrite.

1.3.3.4 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B produisent les anticorps. Ils expriment peu de CXCR4 et aucun CD4. Leur susceptibilité à l'infection par le VIH-1 demeure controversée. Certaines études indiquent que le VIH-1 entre dans ces cellules, mais que l'ADN viral demeure non intégré [114, 161], alors qu'une autre démontre qu'elles s'infectent [114]. L'entrée du virus nécessiterait l'activation des cellules par le CD40 et l'interleukine 4. L'équipe du Dr Fauci a démontré qu'une fois opsonisé avec des sous-unités du complément, le virus s'attache au CD21 puis se transfère aux lymphocytes T CD4⁺ [162].

1.3.3.5 Les neutrophiles

Les neutrophiles participent activement à la réponse immunitaire non spécifique. Ils composent la majorité des cellules dans le sang périphérique et se rendent les premières aux sites enflammés [128]. Leurs principales fonctions consistent à phagocyter des microorganismes et produire des médiateurs de l'inflammation. Le VIH-1 n'infecte pas les neutrophiles. Cependant, l'activation de ces cellules par des médiateurs de l'inflammation augmente l'attachement des particules virales et par conséquent le transfert des virus aux lymphocytes T CD4⁺ [163]. Ce phénomène ne requiert ni le CD4 et ni la gp120.

1.3.3.6 Les mastocytes

Participant aux réponses innée et acquise, les mastocytes se caractérisent par la sécrétion de médiateurs de l'inflammation, notamment l'histamine. Leurs précurseurs consistent en des cellules immatures provenant de la moelle osseuse et circulant dans le sang périphérique. Lorsqu'elles migrent vers les tissus, elles se différencient en mastocytes. Ces cellules

effectrices se situent principalement dans les muqueuses et les tissus conjonctifs près des vaisseaux sanguins. Elles interviennent lors de réactions allergiques et/ou de la réponse inflammatoire [128]. Les précurseurs des mastocytes expriment à la fois du CD4, du CXCR4 et du CCR5. Deux études ont rapporté que le VIH-1 peut infecter ces cellules de façon productive [164,165]. Toutefois, elles s'infectent uniquement par les souches R5 et X4/R5.

1.3.3.7 Les lymphocytes T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺ jouent un rôle primordial dans la destruction des cellules infectées et néoplasiques, notamment les cellules effectrices (CTL). Les CTL reconnaissent des portions de protéines virales (Gag, Env, Rev et Tat) présentées par l'intermédiaire des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) sur les cellules infectées. Lorsque les CTL reconnaissent un antigène sur une cellule, ils la détruisent par le largage de perforines et de granzymes, deux molécules causant la mort des cellules [128]. Grâce à leurs fonctions cytolytiques, les CTL jouent un rôle fondamental dans le contrôle de l'infection virale. Généralement, le VIH-1 infecte peu ces cellules. Toutefois, quelques études ont montré l'apparition de souches virales, chez des personnes séropositives, utilisant le CD8 comme récepteur et le CXCR4 comme corécepteur [119] [166].

1.3.3.8 Les cellules NK et NKT

La principale responsabilité des cellules NK (de l'anglais *Natural Killer cells*) dans la réponse innée consiste à détruire les cellules anormales (cancéreuses) et infectées. Ces cellules expriment à la fois le CD4, le CXCR4 et le CCR5. Elles sont infectées par toutes les souches de VIH-1 et représentent un réservoir viral non négligeable [167, 169]. Le VIH-1 infecte aussi les cellules NKT (*Natural Killer T cells*), une sous-population de

lymphocytes T générée à partir du thymus et exprimant un seul type de TCR, soit le TCR V α 24/V β 11. Ce dernier reconnaît des antigènes non peptidiques (des glycolipides) présentés par le CD1d, une molécule exprimée sur les cellules dendritiques [128]. De façon similaire aux cellules NK, les NKT participent à la réponse innée et anti-tumorale. Elles expriment le CD4 et les deux corécepteurs, mais seules les souches R5 les infectent de manière productive [170-172].

1.3.3.9 Les cellules épithéliales

Le CD4 est absent des cellules épithéliales. Ces dernières expriment tout de même le CXCR4 et/ou le CCR5 [112] [173], en plus d'autres molécules servant à capturer le virus tels les galactosylcéramides [174] et les héparans sulfates [175, 176]. Ces cellules tapissent les différentes muqueuses et servent de barrière contre les invasions microbiennes. Certains types ont la capacité d'internaliser une multitude de molécules et d'antigènes par les voies d'endocytose et d'exocytose. De plus, ces cellules permettent le passage de certaines molécules d'une extrémité à une autre par un mécanisme appelé transcytose. Il a été démontré que les cellules épithéliales localisées dans la prostate, le col de l'utérus et le vagin ne permettent pas la réplication du VIH-1. Par contre, elles séquestrent le virus et transfèrent ce dernier aux cellules T CD4⁺ [177]. Les cellules M, localisées dans l'intestin au niveau des plaques de Peyer, internalisent également le virus et le transfèrent aux cellules immunitaires, un phénomène attribué au CCR5 [178]. Enfin, les cellules épithéliales du placenta, les trophoblastes, expriment les corécepteurs du VIH-1 et sont susceptibles à l'infection. L'entrée virale se fait par endocytose [179, 180]. Cette internalisation est indépendante de la gp120 et/ou de la gp41, elle est non spécifique, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de récepteur particulier menant à la capture du virus (article en préparation [181]). Les trophoblastes transfèrent également le virus du côté apical vers le côté basolatéral par transcytose [182].

1.3.3.10 Les cellules adipeuses

Les adipocytes, ou cellules adipeuses emmagasinent les lipides (triglycérides, graisses neutres, acides gras, phospholipides et cholestérol) pour former la graisse. Ces cellules participent au métabolisme des lipides en assurant leur production, leur stockage et leur libération dans le sang en fonction des besoins de l'organisme. Elles produisent des cytokines pro-inflammatoires et agissent comme des monocytes/macrophages [183, 184]. Ce sont les seules cellules non immunitaires exprimant à la fois le récepteur et les corécepteurs du VIH-1. D'ailleurs, les deux souches de VIH infectent de façon productive les cellules adipeuses [185]. On ignore par contre la conséquence de cette infection sur l'organisme.

1.3.3.11 Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales qui participent au bon fonctionnement du système nerveux central. Ces cellules ont un rôle de soutien et permettent de nourrir les neurones [186, 187]. Elles collaborent également à la communication nerveuse en formant des réseaux très complexes, lesquels constituent des systèmes de transmission non synaptique participant à la transmission des signaux générée par les neurones [187, 188]. Les astrocytes n'expriment pas le CD4. Par contre, elles expriment à la fois le CXCR4 et le CCR5 [189]. Il a été démontré que le virus y entre par endocytose via le récepteur du mannose [115] et que l'ADN viral s'intègre dans le génome cellulaire. Selon ces données, les astrocytes peuvent servir de réservoir pour le VIH-1. D'autres études ont également montré que l'infection virale altère les fonctions de ces cellules, ce qui pourrait expliquer en partie la dégénérescence du système nerveux central observée chez les sidéens [115].

Bien que le VIH-1 ait démontré un tropisme envers toutes ces cellules *in vitro*, on ignore ce qu'il en est chez les individus infectés et l'impact de ces infections sur la progression de la maladie. Selon les informations disponibles, seules les infections des lymphocytes T CD4⁺ et des macrophages en sont responsables.

1.4 Le cycle viral

L'intrusion du VIH-1 chez l'hôte entraîne inévitablement une bataille ardue entre le virus et les cellules du système immunitaire. Sa capacité à s'établir et à déjouer les défenses du système immunitaire résulte d'une stratégie efficace de sa part où les protéines virales et les protéines cellulaires participent activement. Le virus s'ajuste à la cellule hôte et adapte son cycle vital selon le type cellulaire ciblé. La figure 7 illustre le cycle répliatif dans les lymphocytes T CD4⁺ et les macrophages, les deux cibles principales du VIH-1.

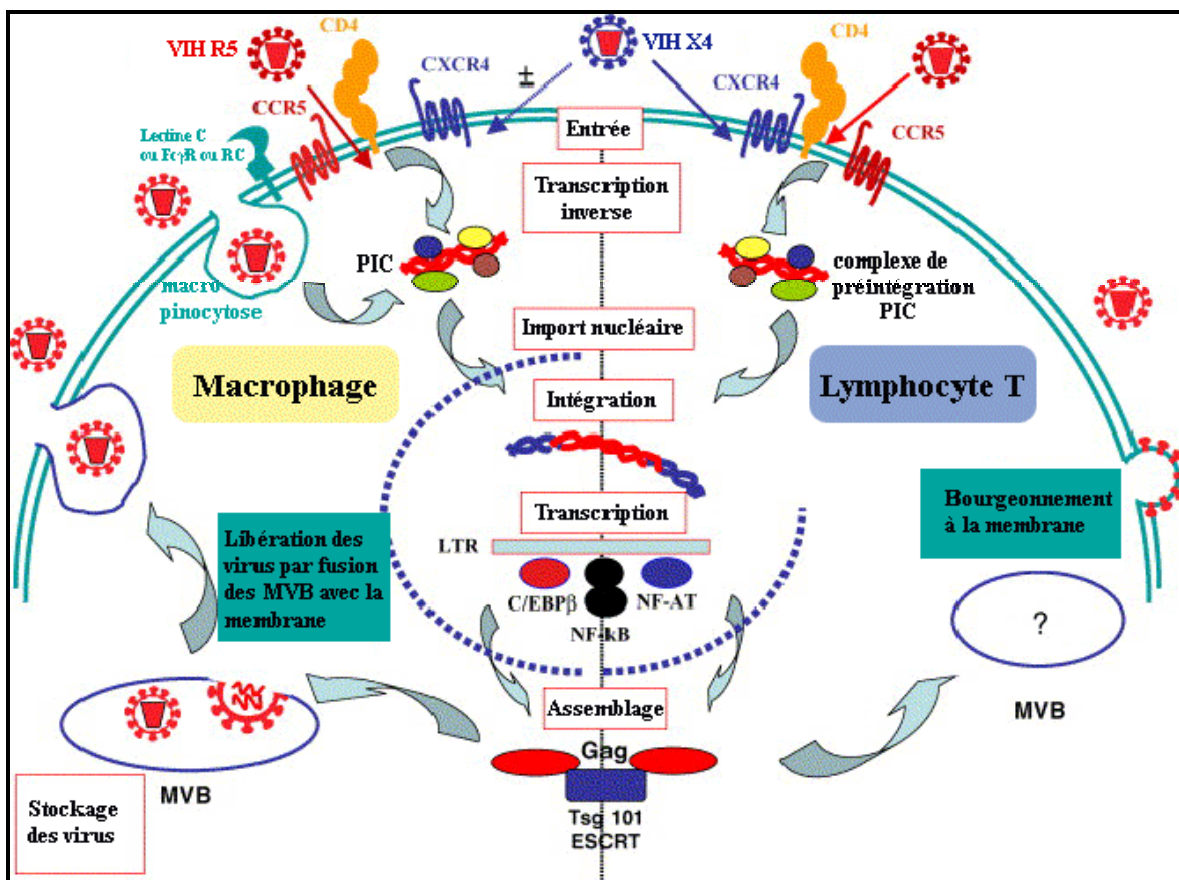


Figure 7. Étapes du cycle viral selon la cellule infectée (adaptée de [143])

1.4.1 Attachement

L'attachement du VIH-1 à la surface des cellules cibles est la première étape menant à une infection productive. Il s'agit d'une interaction généralement spécifique entre les protéines de surface du virus et des protéines qui servent de récepteurs sur les cellules permissives. Plusieurs études ont démontré que la liaison du VIH-1 était essentiellement attribuable à l'interaction entre la gp120 et des récepteurs cellulaires. Toutefois, d'autres interactions indépendantes de la glycoprotéine virale sont également responsables de l'adhésion primaire du virus sur les cellules cibles.

1.4.1.1 Le CD4

Le CD4 est le principal récepteur du VIH-1. La liaison de la gp120 entraîne un mouvement de ses boucles V1 et V2 libérant la boucle V3 qui peut alors se déplacer vers le site de liaison du corécepteur [73]. L'interaction entre la gp120 et le corécepteur enclenche un réarrangement de la gp41 nécessaire à la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique. L'affinité pour la gp120 monomérique [80-191] est de 1 à 10 nM. Par contre, celle de la gp120 oligomérique est nettement inférieure, particulièrement pour les virus provenant d'isolats cliniques [192, 193]. D'autre part, plusieurs types cellulaires ciblés par le VIH-1 expriment peu ou pas de CD4, incluant les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales du col de l'utérus, du rectum et du placenta. Dans ces situations, le virus doit s'attacher indépendamment du CD4.

1.4.1.2 Lectines et autres récepteurs liant la gp120

Beaucoup d'études ont été menées ces dernières années, afin de mieux comprendre la succession d'événements de même que les facteurs clés participant à l'attachement du VIH-1 sur les cellules cibles. Étonnamment, plusieurs molécules ont la capacité de lier la gp120 du virus. Ces interactions dépendent des sucres présents sur la gp120 et des domaines glycosylés ou des lectines sur les récepteurs cellulaires. Ces molécules incluent le récepteur du mannose sur les macrophages [194], le DC-SIGN sur les cellules dendritiques [195-197], le DC-SIGNR sur certaines cellules endothéliales [198], les héparans sulfates sur plusieurs types cellulaires [175, 176] et le galactosylcéramide (Gal-C) [174] et ses dérivés, les sulphotides, sur les cellules neuronales, gliales et épithéliales de même que sur les macrophages [199-202]. Plusieurs de ces interactions participent également au transfert du virus vers les lymphocytes T CD4⁺. Ce type de transfert s'effectue par l'intermédiaire de cellules dendritiques, de macrophages, de cellules épithéliales ou de cellules endothéliales [156, 175, 196]. Il s'agit d'un mécanisme très efficace pour infecter les lymphocytes T CD4⁺.

1.4.1.3 Autres interactions indépendantes de la gp120

L'attachement du VIH-1 peut s'effectuer grâce à d'autres interactions virus-cellule, excluant la gp120. Ces interactions se font entre des molécules de l'hôte incorporées dans l'enveloppe du VIH-1 et leurs contre-ligands naturels sur les cellules cibles (l'acquisition des molécules de l'hôte sera décrite plus amplement dans la section sur l'assemblage et le bourgeonnement) [203]. Brièvement, ces interactions incluent celles entre la cyclophiline et les héparans sulfates [204], de même que celle entre la molécule d'adhésion intercellulaire (ICAM-1) et le LFA-1 (de l'anglais *Lymphocyte Function-Associated Antigen-1*) [2, 5, 205]. La participation de la molécule ICAM-1, ancrée dans l'enveloppe du VIH-1, et les LFA-1, sur les cellules permissives, lors des événements précoces du cycle viral sera davantage développée dans les chapitres IV, V et VI. D'autres molécules présentes dans l'environnement cellulaire coopèrent également au processus d'attachement. La galectine 1, une lectine présente dans le cytoplasme et l'environnement intercellulaire (suite à sa sécrétion ou la nécrose des cellules), augmente abondamment l'adhésion du VIH-1 aux cellules cibles, telles que les lymphocytes T CD4⁺ et les macrophages [206].

En résumé, toute interaction permettant une adhérence ferme entre le VIH-1 et la cellule ciblée augmente considérablement la probabilité que le virus rencontre plusieurs molécules de CD4 et de corécepteurs, deux étapes critiques du processus de fusion. L'affinité et l'avidité (densité) des récepteurs jouent un rôle élémentaire et déterminent la vitesse et l'efficacité de l'entrée virale. Le devenir de l'infection repose en grande partie sur la façon employée par le VIH-1 pour pénétrer à l'intérieur des cellules cibles : il entre soit par fusion ou par endocytose. Le mode d'entrée diffère selon le type cellulaire ciblé et les récepteurs d'adhésion. Les répercussions sur le virus varient selon l'environnement cellulaire qu'il rencontre.

1.4.2 Entrée

L'entrée du virus dans une cellule permissive à l'infection est nécessaire à sa survie et sa multiplication. Le VIH-1 emploie différentes voies pour pénétrer à l'intérieur de la cellule : la fusion ou l'endocytose.

1.4.2.1 La fusion à la membrane plasmique

La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique demeure la principale voie d'entrée du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4⁺. C'est d'ailleurs la seule qui mène à l'infection la plus productive [207-209]. Il s'agit d'un processus complexe faisant intervenir diverses composantes telles que la quantité de gp120/gp41 engagée, l'affinité et la densité des récepteurs et corécepteurs, les radeaux lipidiques, la réorganisation du cytosquelette d'actine et possiblement la signalisation induites par la liaison du virus aux récepteurs et corécepteurs.

L'engagement de la gp120 au CD4 déclenche un changement de conformation de la glycoprotéine virale conduisant à l'exposition de sites aptes à lier les corécepteurs [210]. La flexibilité entre les domaines extracellulaires 2 et 3 du CD4, de même qu'entre le domaine 4 et la membrane plasmique semble cruciale pour l'orientation de la gp120 vers les corécepteurs [211, 212]. La liaison de la gp120 au corécepteur libère la gp41 et amène un réarrangement de celle-ci entraînant la formation de la super hélice. Sous cette forme, la sous-unité hautement hydrophobe de la protéine, le peptide de fusion, se libère et s'insère dans la membrane plasmique. Une fois engagée, la gp41 subit un autre changement de conformation et devient un complexe à six hélices (*6-helix bundle*) (Fig. 5), lequel est responsable de la fusion des membranes virale et cellulaire [213, 214]. L'inhibiteur de fusion, le T-20, agit à cette étape. Il se lie à la région C-terminale et empêche la formation

du complexe à six hélices, rendant la fusion impossible (le mécanisme d'action de cet inhibiteur sera détaillé dans une section ultérieure). La conformation prise par la gp41 permet de déstabiliser les deux membranes en *cis* (première couche de phospholipide de l'enveloppe et de la membrane plasmique), entraînant la création d'une structure métastable qui relie les deux membranes entre elles (*stalk*). Par la suite, le lien unissant les deux membranes s'étend et permet la fusion des membranes en *trans* (deuxième couche de phospholipides). Chez les cellules très permissives à l'infection, 50% de la fusion se fait en moins de 30 minutes, alors que chez les cellules moins susceptibles, cela prend en moyenne 4 heures [215]. Selon des notions acquises avec le virus de l'influenza, l'engagement de plusieurs gp120/41 est nécessaire à la déstabilisation des membranes et la formation du pore de fusion. D'autre part, l'architecture des lipides semble aussi jouer un rôle dans le succès du processus de fusion [216]. En fait, certains lipides facilitent la fusion (p. ex. l'acide oléique), alors que d'autres l'inhibent (p. ex. la lysophosphatidylcholine) [217, 218]. La figure 8A illustre les diverses étapes du processus de fusion du VIH-1, alors que le panneau B explique le modèle de l'hémifusion, un modèle généralement accepté pour expliquer la fusion de deux membranes.

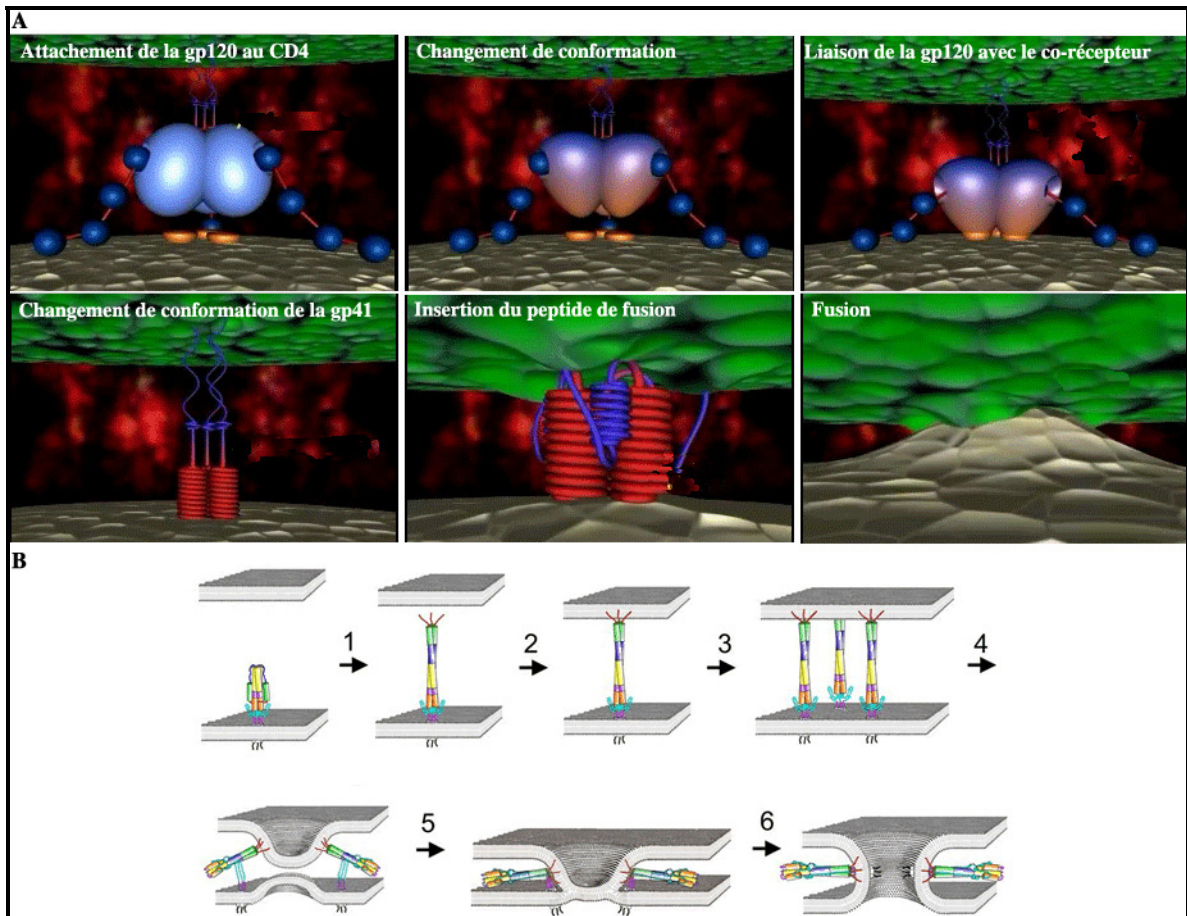


Figure 8. Fusion. A) Étape menant à la fusion du VIH-1 avec la membrane plasmique (adaptée de site web de la compagnie ROCHE [219]) B) Modèle de l'hémifusion médiée par la protéine HA du virus de l'influenza (tiré de [220])

Contrairement à d'autres virus enveloppés comme le virus de l'influenza, la fusion du VIH-1 se fait de manière indépendante du pH [207]. Pour ces virus, l'acidification du milieu entraîne le changement de conformation de leur protéine au potentiel fusogène. L'insertion de cette protéine induit la fusion de l'enveloppe virale avec une membrane cellulaire. Beaucoup plus complexe, le processus de fusion du VIH-1 est un mécanisme coopératif où plusieurs éléments entrent en jeu. Premièrement, la température influence fortement la fusion des membranes. Il a été estimé qu'elle ne pouvait avoir lieu sous 25°C et qu'elle était maximale à 37°C [221, 222]. Cette température constitue un élément important lors de la réorganisation des protéines dans la membrane plasmique, un processus essentiel à l'initiation de la fusion. Plusieurs études ont montré que la création du pore de

fusion nécessite la coopération de diverses molécules de CD4 et de corécepteurs. La formation de cette structure requiert une densité élevée de récepteurs (CD4) et de corécepteurs (CXCR4 ou CCR5) de même que plusieurs molécules de gp120 [213]. La densité des récepteurs et corécepteurs gouverne la vitesse et l'efficacité de la fusion. Certaines études démontrent que le changement de conformation de la gp120 nécessite au moins trois liaisons au CD4 [191, 223] et que la formation du pore de fusion requiert l'engagement d'au moins six molécules de CCR5 [224]. Or, la densité des corécepteurs (CXCR4 et CCR5) sur les cellules T CD4⁺ demeure assez faible, soit moins de 4 000 molécules de CXCR4 ou CCR5 comparativement à 65 000 pour le CD4 [225]. Ce phénomène pose un problème à la création du pore de fusion. En effet, si on considère qu'un lymphocyte T activé a une surface de 500 μm^2 et environ 1 000 molécules de CXCR4 ou CCR5, alors la distance moyenne séparant chacun des corécepteurs est de 0,7 μm [225]. Il s'agit d'une distance beaucoup trop élevée pour la génération du pore de fusion sans apport énergétique (p. ex. un recrutement dirigé des protéines membranaires grâce au remaniement du cytosquelette d'actine). Lorsque la notion des radeaux lipidiques est apparue, le modèle évoquant le recrutement du CD4 et des corécepteurs dans une région spécifique de la membrane plasmique semblait la meilleure explication à la fusion du virus. Les radeaux lipidiques sont des domaines membranaires riches en cholestérol, en sphingolipides et en protéines liées au glycosylphosphatidylinositol (GPI) [226]. Ils forment des structures mobiles et instables. Leur taille et leur composition varient selon les types cellulaires et l'état d'activation des cellules. Ces domaines agissent en qualité de plate-forme pour le trafic membranaire (endocytose, sécrétion) et la transmission du signal, particulièrement parce qu'ils concentrent diverses protéines de signalisation (p.ex. src) et des récepteurs (p.ex. TCR, CD4) dans une région bien précise de la membrane plasmique [227]. L'engagement de récepteurs déclenche une cascade de signalisation, menant à la réorganisation du cytosquelette d'actine et au recrutement de plusieurs protéines de signalisation vers les radeaux lipidiques. Ce processus permet de soutenir et d'amplifier le signal obtenu par l'engagement d'un petit nombre de récepteurs.

Plusieurs études suggèrent que l'entrée des virus enveloppés et non enveloppés dépend des radeaux lipidiques [228]. Le rôle de ces domaines dans l'entrée du VIH-1 demeure toutefois un sujet controversé. Leur participation dans l'entrée virale s'expliquerait par trois phénomènes : concentrer les récepteurs et/ou corécepteurs, réorganiser les protéines dans la membrane et faciliter la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique. On ne peut pas encore affirmer avec certitude que la localisation du récepteur et des corécepteurs dans ces domaines est nécessaire à la fusion. Plusieurs équipes ont rapporté la présence du CD4 dans les radeaux lipidiques alors que le CXCR4 en est exclu. Pour qu'il y ait fusion, le complexe virus-CD4, localisé dans les radeaux lipidiques, doit donc se transporter hors de ces régions afin de rencontrer les corécepteurs et créer le pore de fusion [229, 230]. Par contre, d'autres laboratoires ont montré que la localisation du CD4 dans les radeaux lipidiques n'est pas une condition préalable à la liaison du virus et que le CD4 localisé hors des radeaux lipidiques permet l'attachement et la fusion du VIH-1 [231, 232]. Le cholestérol, une composante importante des radeaux lipidiques, semble être une molécule essentielle à l'entrée du virus par fusion [233-235]. Ces données ont été obtenues en utilisant le méthyl- β -cyclodextrine, un composé qui retire le cholestérol des membranes. Elles démontrent que le cholestérol participe activement à la fusion des virus lorsque les cellules ciblées expriment peu de récepteurs et de corécepteurs [233]. De plus, l'équipe du Dr T. Hope a démontré que contrairement au CD4, le cholestérol est essentiel à la mobilité du CCR5 dans la membrane plasmique des cellules épithéliales [229]. Le regroupement des protéines dans la membrane est un phénomène qui survient en aval de l'engagement ligand/récepteur. L'activation des voies de signalisation et l'induction de la réorganisation du cytosquelette d'actine sont toutes les deux responsables de la diffusion latérale des protéines dans la membrane plasmique. Ainsi, les régions riches en actine, comme les microvillosités, représentent un bon endroit pour la fusion. En 2001, l'équipe du Dr M.S. Springer a démontré que le CD4 et le CXCR4 ou le CCR5 étaient localisés aux mêmes endroits sur les microvillosités présents à la surface des cellules T primaires [236]. Une autre étude, menée cette fois par l'équipe du Dr R. Blumenthal, propose que le virus s'attache sur les microvillosités via le CD4 et que la fusion a lieu après l'affaissement de ceux-ci suite à la réorganisation du cytosquelette d'actine et la rencontre avec les corécepteurs [233]. La présence de cholestérol stabilise les microvillosités. D'ailleurs, le

traitement des cellules avec le méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) affaïsse ces structures. La figure 9 représente un modèle adapté de Viard et al. expliquant le rôle des microvillosités dans l'attachement et la fusion du VIH-1. Parallèlement, une équipe a démontré la co-localisation du CD4 et du CXCR4 dans des pseudopodes riches en molécules d'actines après la liaison de gp120 recombinantes [237], confirmant le modèle proposé par l'équipe du Dr Blumenthal. Par contre, aucune preuve visuelle ne confirme la liaison du virus sur ces structures. Même si les connaissances sur les éléments inclus dans la formation du pore de fusion sont avancées, l'endroit, la quantité de récepteurs et corécepteurs requis et la signalisation générée demeurent méconnus.

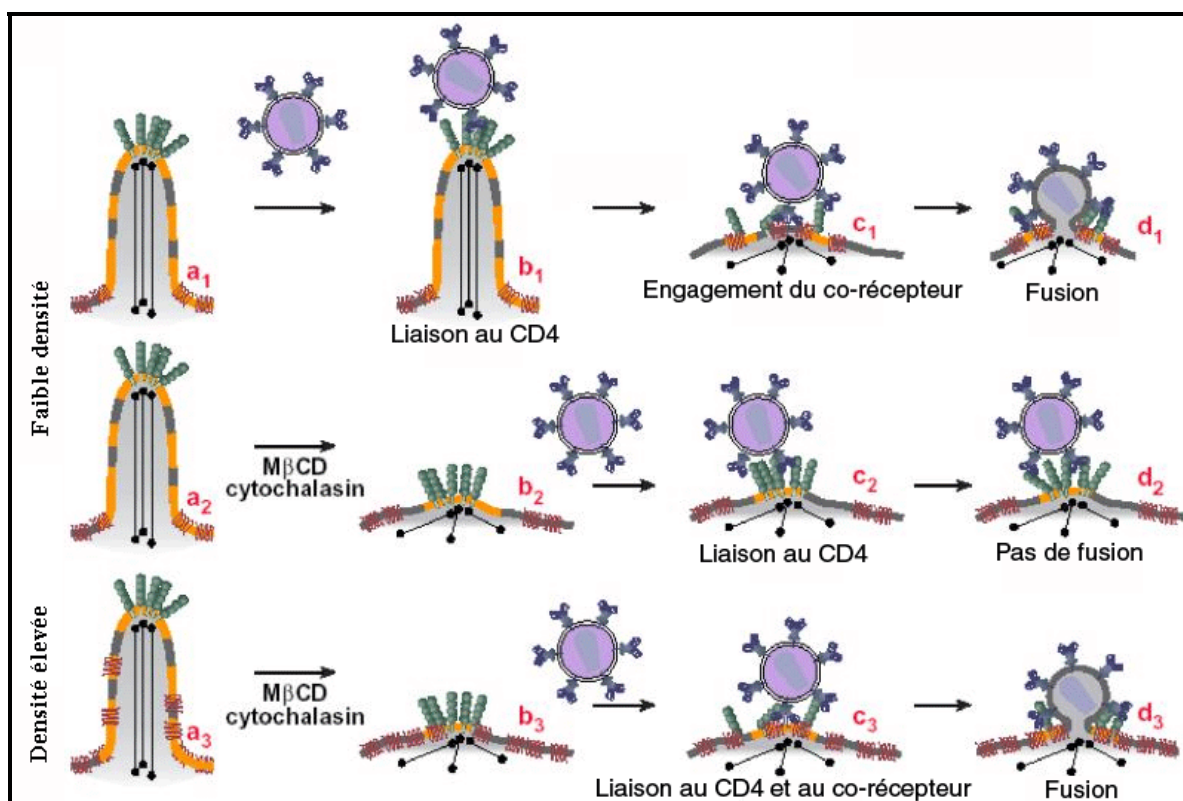


Figure 9. Rôle des microvillosités et du cholestérol lors des événements précoces de l'infection (adaptée de [233]). Le M β CD enlève le cholestérol des membranes alors que la cytochalasine entraîne la dépolymérisation du cytosquelette d'actine et la diffusion latérale des protéines membranaires.

1.4.2.2 Endocytose

Le virus peut également pénétrer dans les cellules par endocytose [238-241]. Le sort du virus internalisé diffère selon le type cellulaire ciblé. Chez les lymphocytes T CD4⁺, l'endocytose mène généralement à la dégradation de la particule virale [242].

L'endocytose est un mécanisme d'internalisation participant à une grande variété de processus cellulaires [243, 244]. Elle est un moyen de réguler l'expression en surface de certaines molécules (par exemple les molécules d'adhésion qui doivent être rigoureusement régulées). D'autre part, il arrête l'interaction récepteur-ligand et capture des molécules solubles (nutriments), des microorganismes et même de cellules mortes. L'endocytose s'amorce généralement par l'engagement de récepteurs membranaires spécifiques (par exemple les récepteurs de la région constante des immunoglobulines (FcR), le récepteur de la transferrine (Tfr), le récepteur du mannose et certains récepteurs de cytokines). Elle s'amorce par des événements de signalisation qui déterminent le type d'internalisation [243]. Il existe différentes sortes d'endocytose. Elle peut être orchestrée par les clathrines ou les cavéoles/radeaux lipidiques. La macropinocytose et la phagocytose constituent deux autres types d'internalisation [244-247]. Tous les types d'internalisation entraînent généralement la dégradation du contenu par la fusion des vésicules endosomales avec les lysosomes.

Plusieurs études ont démontré que le VIH-1 utilise certaines de ces voies d'entrée pour pénétrer à l'intérieur des cellules, notamment l'endocytose dépendante des puits de clathrines (lymphocytes T CD4⁺, monocytes, cellules épithéliales) et la macropinocytose (macrophages) [154, 240]. Toutefois, dans les lymphocytes T CD4⁺ du moins, l'endocytose des particules virales conduit généralement à leur dégradation. Le récepteur responsable de l'internalisation est le CD4 [248]. La queue cytoplasmique du CD4 contient un motif dileucine, un signal utilisé par la machinerie de l'endocytose orchestrée par les puits de clathrines [249]. Or, la liaison de la p56^{Lck} à la queue intracytoplasmique du CD4 masque ce motif, empêchant la protéine d'être internalisée [250]. Par conséquent, la liaison du CD4 avec la protéine de signalisation p56^{Lck} joue un rôle capital dans la prévention de

l'endocytose [251, 252]. Cette tyrosine kinase, présente chez les lymphocytes T, est toutefois absente des cellules myéloïdes. Ainsi, le CD4 s'internalise davantage chez ces dernières. Le mode d'entrée du virus dépend de la densité des corécepteurs sur les cellules cibles. Une étude a d'ailleurs démontré qu'en absence de corécepteurs disponibles pour la fusion, les lymphocytes T CD4⁺ internalisent le VIH-1 [253]. Cette même étude démontre que l'inhibition de l'endocytose favorise la fusion et vice-versa. Ainsi, les deux voies d'entrée employées par le virus sont interconnectées et en compétition. Le virus a donc avantage à s'attacher dans des régions riches en molécules de CD4 et de corécepteurs sur les lymphocytes T CD4⁺. Par ailleurs, chez les macrophages, l'entrée du virus se fait principalement par macropinocytose [154]. Ce type d'internalisation, spécifique aux macrophages et aux cellules dendritiques, requiert un cytosquelette d'actine fonctionnel [254]. Le VIH-1 est internalisé par macropinocytose de façon non spécifique et indépendante de la gp120 [154]. La majorité des virus sont détruits, mais une partie échappe à la dégradation et fusionne avec la membrane vésiculaire, menant à une infection productive. Les trophoblastes, cellules épithéliales du placenta, internalisent également le VIH-1 [180]. Les virus y empruntent différentes voies : celle de la dégradation, celle du recyclage ou celle de la fusion avec les endosomes où l'infection sera productive [179]. Les cellules dendritiques internalisent aussi le VIH-1 par l'intermédiaire de la molécule DC-SIGN. Ce récepteur agit comme molécule d'adhésion et comme récepteur déclenchant l'endocytose. Sa queue intracytoplasmique contient deux motifs d'internalisation : le site consensus YXX Φ liant une molécule adaptatrice déclenchant l'internalisation et le motif dileucine entraînant les vésicules endosomales vers la dégradation par le lysosome [255]. Toutefois, la liaison du virus aux molécules de DC-SIGN mène davantage à son transfert vers les lymphocytes T.

1.4.2.3 Transfert, synapse virologique et transcytose

Le transfert du virus d'une cellule à une autre et la synapse virologique sont deux nouvelles formes « d'entrée » virale caractérisées ces trois dernières années. Ces mécanismes,

employés notamment par le VIH-1 et le HTLV-1, favorisent grandement l'efficacité de l'infection [256, 257].

Le transfert du virus survient par contact direct entre une cellule T CD4⁺ et des particules virales exposées sur un autre type cellulaire (cellule dendritique, macrophage, neutrophile, cellule épithéliale ou endothéliale) [175, 196, 258, 259]. Le mode d'entrée classique (fusion) fait intervenir des virus libres, lesquels sont continuellement en mouvement. Lors du contact entre deux cellules (X et Y), les virus attachés fermement par l'intermédiaire de récepteurs de surface sur la cellule X sont transférés à la cellule Y, ce qui facilite le processus de fusion. Le transfert dit en *trans* a été démontré entre les lymphocytes T CD4⁺ et plusieurs autres types cellulaires incluant les cellules dendritiques, les neutrophiles, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales [175, 196, 258, 259].

L'autre phénomène associé au transfert viral est la synapse virologique. Il est bien établi que la synapse cellulaire est un phénomène fondamental pour plusieurs fonctions biologiques, notamment la transmission du signal entre les neurones ou encore l'activation du système immunitaire (synapse immunologique entre une cellule présentatrice d'antigène et un lymphocyte T). Le contact entre deux cellules entraîne généralement la réorganisation des molécules dans la membrane afin de concentrer certaines d'entre elles au site de contact. Ce processus dépend de la réorganisation du cytosquelette d'actine ainsi que de l'activation de certaines voies de signalisation. La fusion requiert ces deux éléments afin de rapprocher plusieurs molécules de CD4 et de corécepteurs nécessaires à la formation du pore de fusion. Ainsi, la synapse cellulaire est un bon environnement pour initier la fusion virale. La synapse virologique consiste en un contact intercellulaire entraînant le partage de virus. Jusqu'à maintenant, trois types de synapses virologiques ont été identifiés pour le VIH-1. Le premier résulte du contact entre une cellule T CD4⁺ et une cellule dendritique ou un macrophage possédant des vésicules endosomales remplies de virus [156, 260, 261]. Les virus sont libérés des cellules dendritiques ou des macrophages au moment de la synapse avec la cellule T CD4⁺. Cette proximité favorise l'infection des lymphocytes T CD4⁺. Le deuxième phénomène comprend le contact d'une cellule T infectée (X) avec une autre cellule T non infectée (Y) n'exprimant pas le corécepteur nécessaire à l'infection. Les virus

sont relargués à l'interface de la synapse et internalisés par la cellule Y par un mécanisme dépendant de la réorganisation du cytosquelette d'actine et de l'interaction gp120/CD4 [262]. La cellule Y peut ensuite libérer son contenu à une autre cellule (Z) étant plus susceptible à l'infection. Le troisième phénomène consiste en un contact d'une cellule T infectée avec une cellule T permissive à l'infection. Les virus bourgeonnent à la synapse et se lient aux CD4 et aux corécepteurs de la cellule non infectée entraînant la fusion du virus avec la membrane plasmique de celle-ci [263]. Ce processus dépend de la gp120 et du cytosquelette d'actine, de même que de l'adhésion intercellulaire coordonnée par l'ICAM-1 et le LFA-1.

Le VIH a aussi la capacité de transiter d'un environnement à un autre par un mécanisme nommé transcytose. Les cellules épithéliales utilisent ce moyen de transport pour transférer des molécules d'un environnement à un autre. Les IgA présents du côté apical d'une cellule épithéliale peuvent par exemple être expédiés du côté basal par ce mécanisme. Les cellules épithéliales font la même chose avec le VIH-1 et permettent son passage des muqueuses vers les sous-muqueuses et les tissus périphériques. La transcytose permet aux particules virales de se rendre dans des environnements riches en cellules immunitaires, notamment les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs (Figure 10) [111, 112].

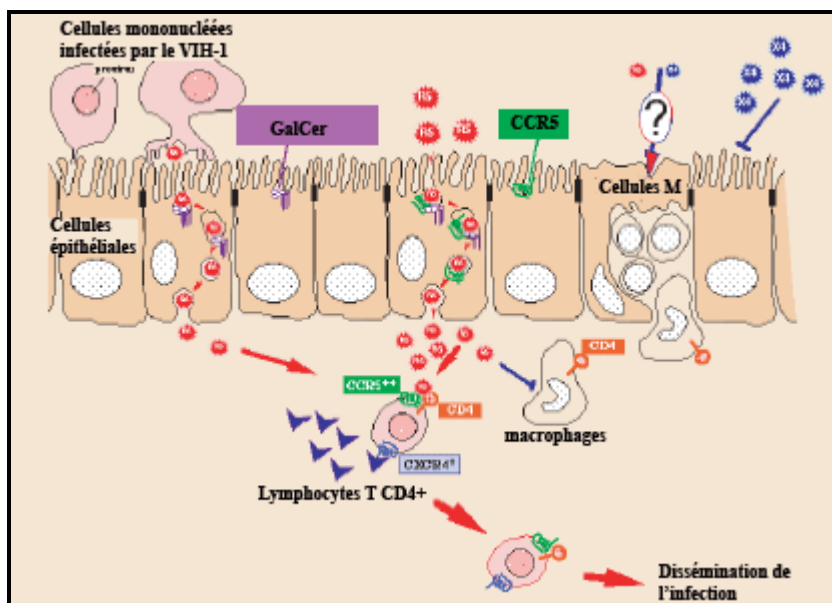


Figure 10. Transcytose du VIH-1 à travers les muqueuses (adaptée de [112])

1.4.3 Décapsidation, rétrotranscription et transport du génome viral au noyau

Lorsque l'enveloppe virale fusionne avec la membrane plasmique ou vésiculaire, la capsid se retrouve dans le cytoplasme. Par un mécanisme encore nébuleux, la structure icosaédrique de la capsid se déstabilise et son contenu se libère dans l'environnement intracellulaire. Des travaux ont démontré que la phosphorylation des protéines de la matrice par les MAP kinases de même que l'action de la cyclophiline A influencent la décapsidation [264, 265]. La protéine virale Nef intervient également dans ce processus en s'associant avec une pompe à protons, la V-ATPase, laquelle induit un changement local de pH et déstabilise la structure de la capsid [266].

Après la décapsidation, le complexe de transcription inverse est relâché de la membrane plasmique. Ce complexe, immobilisé dans le cytoplasme par le cytosquelette d'actine [267], inclut les deux brins d'ARN viraux, l'ARN de transfert lysine 3 (ARN^{t^{lys3}}) qui agit

comme amorce pour la transcription inverse, la transcriptase inverse, l'intégrase, la matrice, la nucléocapside et la protéine virale Vpr. La transcription inverse, convertissant l'ARN viral en ADN, est un processus hautement régulé. Elle débute par la liaison de l'amorce (ARNt^{lys3}) à une séquence complémentaire qui se trouve sur le brin d'ARN viral, le PBS (de l'anglais *Primer Binding Site*). La transcriptase inverse (TI) utilise l'ARNt^{lys3} pour débiter la synthèse du premier brin d'ADN complémentaire (ADNc) [268]. D'autres interactions entre l'ARNt^{lys3} et l'ARN viral participent à la synthèse de l'ADN, dont celle entre une région riche en uridine de l'ARNt^{lys3} et un motif riche en adénosine dans la région U5 du LTR, située en aval du PBS [269, 270]. La transcription inverse dépend également d'un autre motif en aval de la région U5. Ce motif appelé PAS (de l'anglais *Primer Activation Signal*) se lie à la région anti-PAS sur l'ARNt^{lys3} [271]. Cette interaction est conservée parmi les différentes souches de VIH-1, ce qui démontre son importance dans l'infectivité virale. Une fois le premier brin d'ADN synthétisé, la TI, avec son activité RNase H, dégrade le brin d'ARN apparié à l'ADNc et termine la synthèse de l'ADN proviral en produisant le second brin d'ADN.

Le complexe de pré-intégration (PIC) (de l'anglais *PreIntegration Complex*) se compose de l'ADN viral double brin, de la matrice, de l'intégrase, du Vpr, de la transcriptase inverse et de protéines de l'hôte liant l'ADN, les HMGI(Y) [272]. Le PIC se dirige vers le noyau en utilisant les microtubules (protéines formant le cytosquelette cellulaire) [273]. Dans les cellules en division, le virus utilise le mécanisme d'import nucléaire classique où les protéines transporteuses, nommées importine- α et β , expédient les protéines contenant une séquence NLS (*Nuclear Localization Sequence*) jusqu'aux pores nucléaires. Ce moyen de transport demande de l'énergie et requiert la GTPase Ran [274-276]. Le transport du PIC vers les pores nucléaires s'effectue par l'intermédiaire de l'importine- α et de la matrice (p17) du virus. La p17 contient deux séquences NLS permettant la liaison de l'importine- α [277, 278]. Une fois près des pores nucléaires, l'importine- β prend le relais et dirige le complexe vers le noyau [279]. La protéine virale Vpr coopère avec la machinerie cellulaire pour le transport du PIC vers le noyau. Elle contient deux séquences NLS permettant son

interaction avec l'importine- α et l'import nucléaire du PIC, un processus médié en collaboration avec la matrice [277, 280, 281]. Il a été démontré par des études de surexpression que la protéine Vpr induit des bris partiels dans l'enveloppe nucléaire, un phénomène qui aiderait à l'infection des cellules au repos [282]. Par ailleurs, Vpr favorise la réplication du VIH-1 dans les macrophages [283, 284]. Néanmoins, l'utilisation de virus porteurs de mutations dans la protéine Vpr (Δ NLS) a montré que la délétion des séquences NLS du Vpr n'inhibe pas complètement la réplication dans ces cellules [285, 286]. Bien que le Vpr augmente la réplication des virus dans les cellules quiescentes, son rôle exact demeure méconnu. La figure 11 résume les étapes initiales du cycle viral allant de l'attachement à l'intégration.

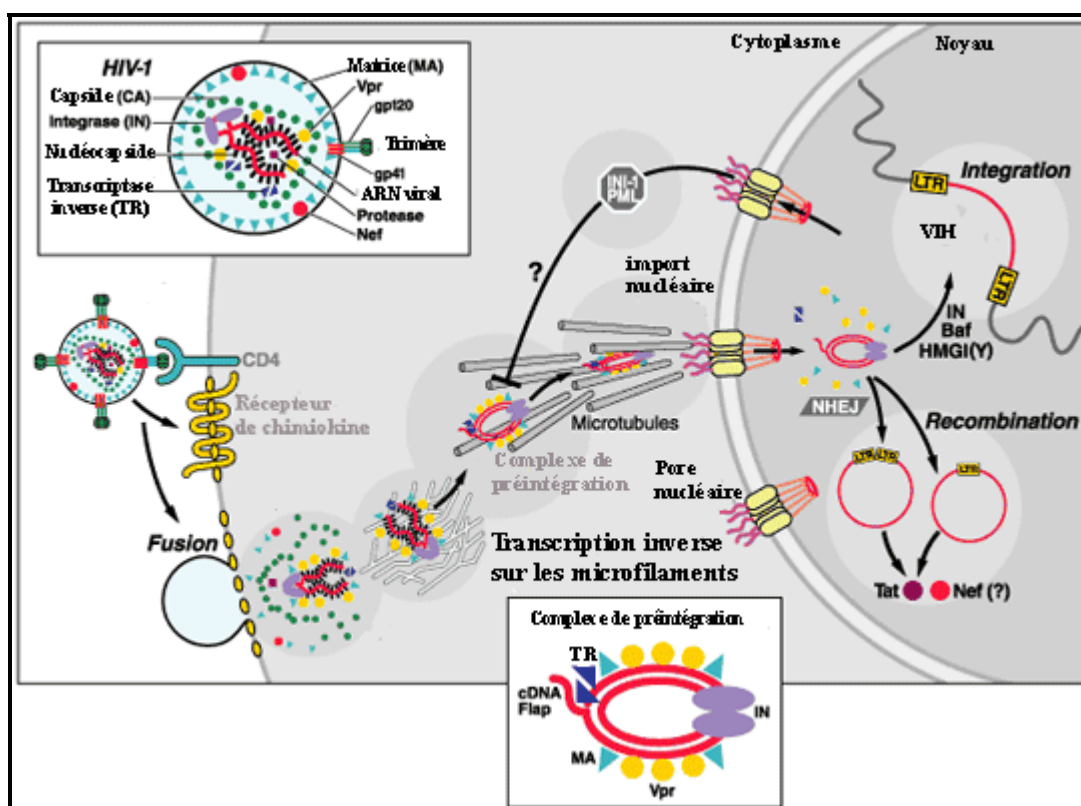


Figure 11. Étapes initiales du cycle viral dans les lymphocytes T $CD4^+$ (adaptée de [287])

1.4.4 Intégration

Une fois à l'intérieur du noyau, l'ADN viral s'intègre dans le génome de la cellule hôte par l'intermédiaire de l'intégrase. Cette dernière se lie à l'extrémité de l'ADN viral et y enlève quelques nucléotides. Par la suite, elle coupe l'ADN génomique et y soustrait certains nucléotides afin de catalyser la jonction entre l'ADN viral et le chromosome cellulaire. Plusieurs études prouvent que l'ADN proviral s'intègre de préférence à l'intérieur de gènes actifs, surtout ceux activés à la suite à l'infection par le VIH-1. Des études démontrent qu'il existe 524 sites possibles d'intégration dans le génome [288]. Par contre, il ne s'intègre jamais dans les centromères [289]. Dans certains cas, l'ADN viral ne s'intègre pas dans le noyau. Il y a alors trois possibilités. La première consiste en la ligature des deux extrémités de l'ADN viral pour former un cercle contenant deux LTR, la seconde entraîne une recombinaison homologue du génome viral formant un cercle avec un seul LTR, alors que la troisième implique que l'ADN proviral demeure sous forme linéaire [290]. Certaines données prouvent que ces formes de génomes viraux, retrouvées dans les lymphocytes T CD4⁺ quiescents, mènent à la transcription des gènes *tat* et *nef* [291].

1.4.5 Contrôle de la transcription

La transcription de gènes viraux ou l'établissement de la latence virale est une étape en aval de l'intégration. La latence cause l'échec des antirétroviraux dans l'éradication du virus. Elle s'établit dans certains types cellulaires engendrant des cellules réservoirs. Le virus émerge de ces cellules suite à la présentation antigénique, la présence de cytokines dans leur environnement comme le TNF α , IL-2, IL-6 et IL-7 [292, 293], l'activation des cellules par l'intermédiaire des TLR (de l'anglais *Toll-Like Receptor*) [164, 294] ou encore par l'action de puissants mitogènes comme la prostatine ou ses dérivés [295-297].

Certaines conditions sont nécessaires à l'établissement de la latence: 1- lorsque l'intégration du génome viral s'effectue à l'intérieur de l'hétérochromatine, une région où la transcription est réprimée, 2- lors d'une carence en facteurs cellulaires se liant sur le LTR du VIH-1 et importants pour la transcription des gènes viraux, 3- en absence de la protéine virale Tat [298] et, enfin, 4- lorsqu'il y a une hypoacétylation des histones [299, 300]. La méthylation de l'ADN n'a par contre aucune conséquence sur l'établissement de la latence [301]. La figure 12 illustre les éléments contrôlant la transcription active et la latence virale.

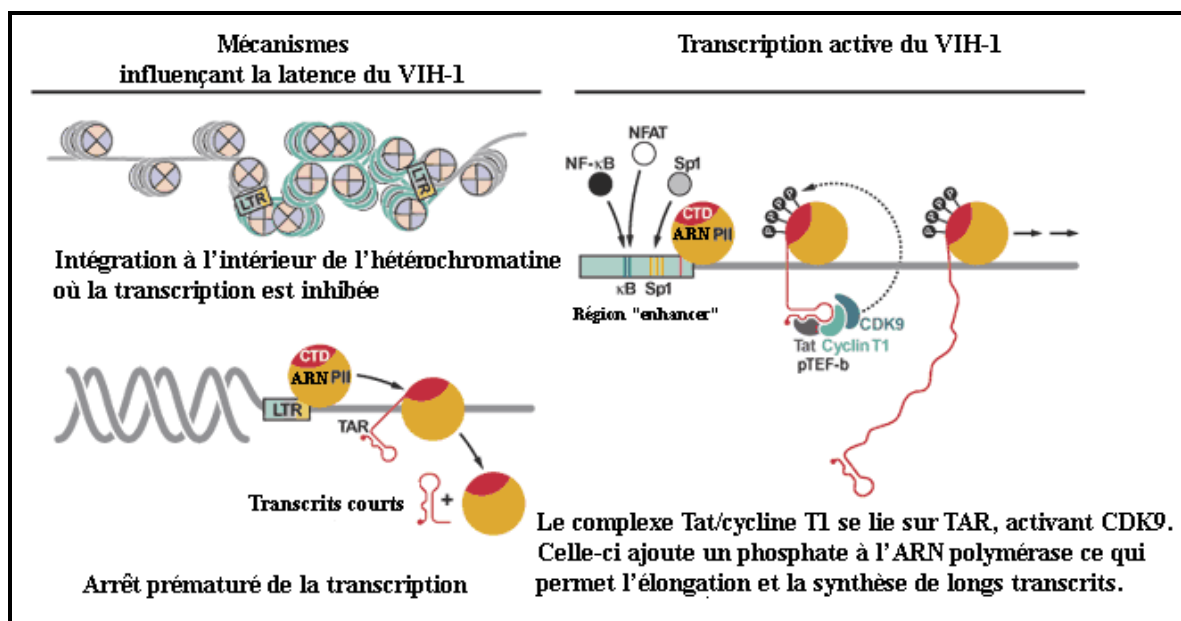


Figure 12. Éléments influençant la latence virale (adaptée de [287])

Le promoteur du VIH-1, le LTR, contient plusieurs sites consensus liant des facteurs de transcription cellulaire. Ces protéines contribuent à la synthèse de transcrits viraux, tout comme la protéine virale Tat. Celle-ci est requise pour l'élongation complète des transcrits d'ARN. Brièvement, l'engagement de facteurs de transcription cellulaire amorce la transcription du génome viral jusqu'à la synthèse d'une boucle d'ARN en forme d'épingle à cheveu nommée TAR [302]. La liaison de la protéine virale Tat à l'ARN requiert la formation de cette structure. La poursuite de la transcription requiert la participation de Tat

et le recrutement du facteur de transcription et d'élongation positif b (P-TEFb) (de l'anglais *Positive Transcription Elongation Factor b*) à la région TAR [303]. Ce facteur comprend la kinase dépendante de la cycline 9 (CdK9) (*Cyclin-Dependent Kinase 9*) de même que la cycline T1. La CdK9 ajoute un phosphate au domaine C-terminal de l'ARN polymérase II, ce qui permet l'élongation du transcrit [304]. En l'absence de Tat, l'ARN polymérase est incapable de synthétiser des transcrits longs. Par conséquent, les transcrits courts s'accumulent. La présence de facteurs interférant avec l'élongation de la transcription (N-TEF) (de l'anglais *Negative Transcriptional Elongation Factor*) est responsable de ce phénomène [305, 306].

1.4.6 Transcription et traduction

La transcription se divise en deux phases. La première, médiée par l'interaction directe entre les facteurs de transcription cellulaires et le LTR, est précoce. La deuxième phase nécessite d'abord l'accumulation de la protéine virale Tat (en première phase) [307]. La transcription du génome viral entraîne la synthèse de plus de douze transcrits viraux différents [308]. Ces transcrits proviennent de l'épissage alternatif ou de la transcription complète du génome viral. Deux types de transcrits sont synthétisés : les transcrits courts non adénylés et les transcrits longs polyadénylés, lesquels couvrent l'ensemble du génome viral. Le Tat stimule fortement la formation des transcrits longs. Les transcrits courts ne possèdent pas de signal inhibiteur IRS (de l'anglais *Inhibitory RNA Sequences*), et sont ainsi transportés hors du noyau [309]. Ces transcrits précoces codent pour les protéines de régulation Nef, Rev et Tat qui agissent à la fois sur le cycle viral et la cellule (Figure 13). Les transcrits longs peuvent subir un épissage alternatif et demeurer dans le noyau de façon relativement stable. Ces transcrits codent pour des protéines de structure, des enzymes, des protéines accessoires et l'ARN génomique servant de matériel génétique pour l'assemblage de nouvelles particules virales. Le transport vers le cytoplasme des ARN messagers (ARNm), partiellement épissés ou non, nécessite la protéine Rev (Figure 13) [309]. La traduction des ARNm non épissés permet la synthèse de polyprotéines (Gag, Pol et Env),

lesquelles sont par la suite clivées par des protéases afin d'obtenir les protéines virales nécessaires à l'assemblage et la formation de particules infectieuses.

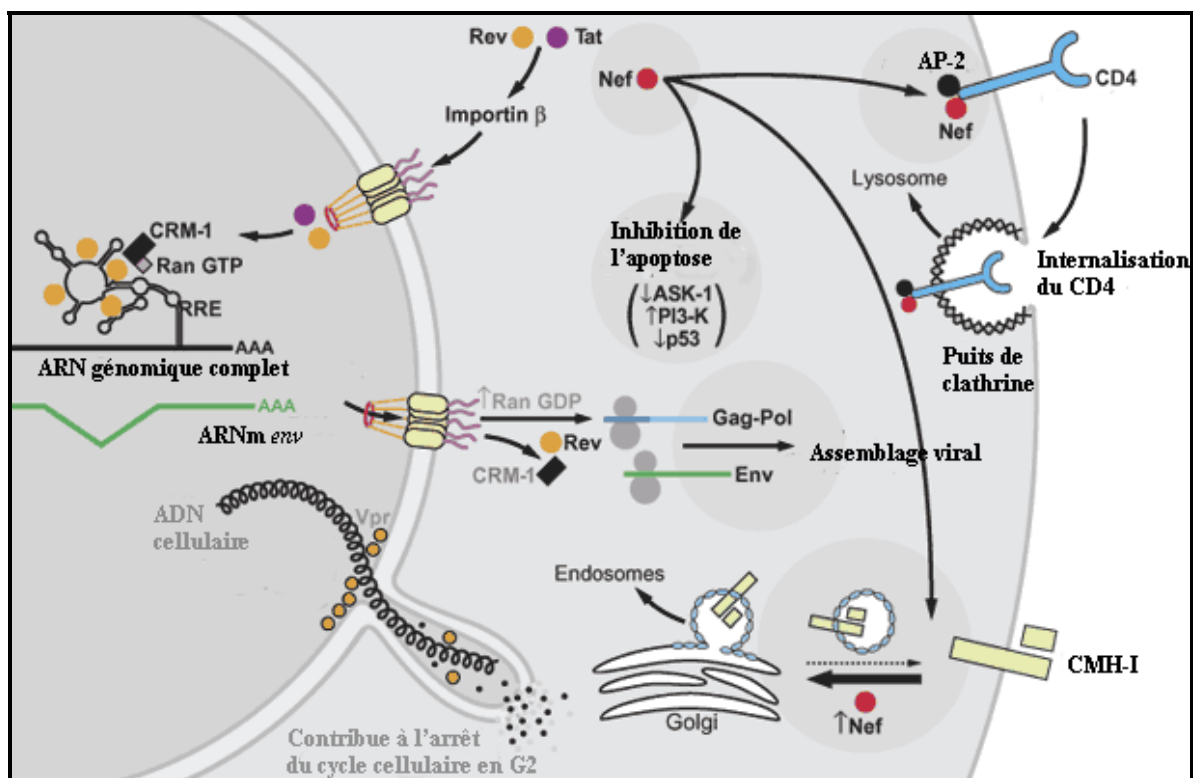


Figure 13. Transcription et impact de Nef, Rev et Vpr sur la cellule et l'assemblage du virus (adaptée de [287])

L'ADN proviral non intégré sert également de patron à la transcription. L'accumulation de cet ADN est importante durant la phase asymptomatique (99% de l'ADN proviral total) et se fait autant dans les lymphocytes T que dans les tissus lymphoïdes et le cerveau [137, 310, 311]. Les protéines virales Tat et Nef peuvent toutes les deux être transcrites en absence d'intégration de l'ADN proviral [312, 313]. La production de ces protéines entraîne l'activation des cellules sans toutefois mener à la production de nouvelles particules virales. Il existe une corrélation entre la quantité d'ADN circulaire avec deux LTR dans les cellules mononuclées du sang périphériques de sujets infectés et

l'augmentation de la virémie, le déclin des lymphocytes T CD4⁺ ainsi que la progression rapide vers le SIDA [314]. De même, il y a un lien entre la quantité d'ADN circulaire (à un LTR) dans le cerveau de patients atteints de SIDA et le développement de la démence [310, 311]. Le rôle de ces ADN (non intégrés) dans la pathogenèse du VIH-1 n'est pas encore très clair, mais plusieurs études sont en cours afin de mieux le comprendre.

1.4.7 Assemblage et bourgeonnement

L'assemblage et la libération des nouvelles particules virales empruntent différentes voies selon le type de cellule infectée.

1.4.7.1 Lymphocytes T CD4⁺

L'assemblage et le bourgeonnement des particules virales se font à la membrane plasmique des cellules T. Plusieurs protéines, notamment les polyprotéines Gag et Gag-Pol, la protéine Nef, les protéines de l'enveloppe (gp120/41) et la protéine cellulaire HP68 (agissant comme chaperonne pour la protéine Gag) participent à l'assemblage des particules virales [315]. La figure 14 illustre les acteurs clés intervenant dans les processus d'assemblage et de bourgeonnement. Plusieurs données démontrent que l'assemblage final et le bourgeonnement ont lieu dans les radeaux lipidiques. D'abord, les glycoprotéines gp120 et gp41 s'ancrent dans la membrane par ces domaines membranaires [316, 317]. De plus, le Pr55Gag, une polyprotéine qui s'associe aux radeaux lipidiques en présence d'un groupement myristyl présent dans la protéine p17 (MA), coordonne l'incorporation de la gp41 dans l'enveloppe virale [318-320]. La protéine Nef, une fois palmitoylée, participe également à la localisation du lieu de bourgeonnement (dans les radeaux lipidiques) [228, 321]. Elle augmente l'infectivité des virus en favorisant leur bourgeonnement dans les

radeaux lipidiques et ainsi l'incorporation de gangliosides et de cholestérol, deux molécules importantes pour l'entrée virale [321].

La fluidité de la membrane constitue un autre élément déterminant pour le bourgeonnement. Une membrane fluide permet à Gag de courber la bicouche lipidique et former des particules. De plus, les interactions protéine-protéine entre les diverses molécules de Gag permettent de rapprocher les radeaux lipidiques. C'est pourquoi l'enveloppe du virus se compose principalement de ces microdomaines. Par ailleurs, le bourgeonnement requiert la participation de plusieurs autres protéines dont la protéine p6 de Gag et des protéines cellulaires intervenant dans la voie d'endocytose et de sécrétion, comme la Tsg101, les Vps (de l'anglais *Vacuole Protein Sorting*) et le complexe ESCRT-1 (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) [322-325]. La voie d'endocytose participe à beaucoup de fonctions biologiques et permet notamment de trier les protéines. Le signal nécessaire à la dégradation des protéines est la conjugaison de celles-ci avec plusieurs molécules d'ubiquitines. Cette voie de dégradation et de recyclage fait intervenir les protéines Tsg101, Vps et le complexe ESCRT-1. Chez les cellules infectées par le VIH-1, il a été démontré que la Tsg101 est relocalisée et se situe près de la membrane plasmique. La protéine p6 de Gag permet son recrutement. Elle y attache l'ubiquitine, un signal crucial pour le bourgeonnement viral. La p6 contient un domaine PTAP (Pro-Thr/Ser-Ala-Pro) [326] permettant la liaison de la Tsg101 lors de la présence de l'ubiquitine. La Tsg101 entraîne le recrutement du complexe ESCRT-1 et Vps4, lesquels sont nécessaires au bourgeonnement du virus [324, 327]. Le VIH-1 prend ainsi le contrôle de la machinerie de dégradation cellulaire et l'utilise pour ses propres intérêts.

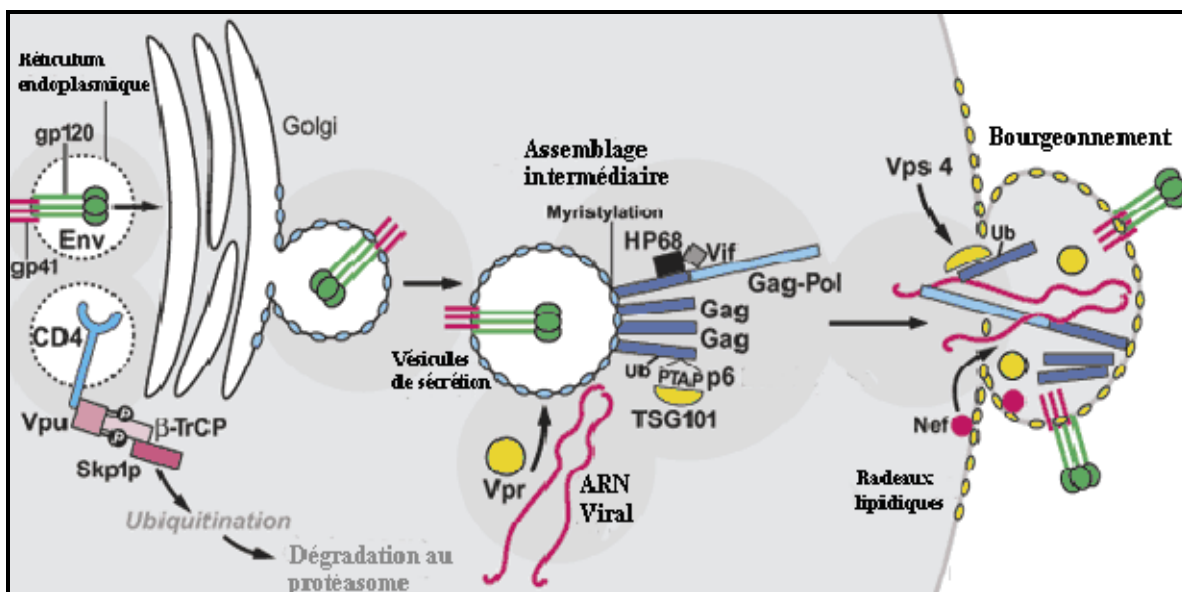


Figure 14. Assemblage du virus dans les lymphocytes T CD4⁺ (adaptée de [287])

1.4.7.2 Macrophages

Contrairement aux lymphocytes T CD4⁺, l'assemblage dans les macrophages a lieu dans les endosomes tardifs et/ou les corps multivésiculaires (MVB) (*MultiVesicular Bodies*) [328, 329]. Il a toutefois été démontré que le même phénomène s'observe chez les lymphocytes T CD4⁺ [330]. Le ciblage de la protéine Pr55Gag vers la membrane plasmique ou les MVB est dicté par la matrice (p17) et des signaux intracellulaires distincts [331]. Cet assemblage ressemble énormément à celui qui a lieu à la membrane plasmique. La p6Gag lie la Tsg101, laquelle recrute ensuite le complexe ESCRT au MVB [332, 333]. Lorsque l'assemblage est terminé, les virus bourgeonnent dans les MVB. Une fois les MVB fusionnées avec la membrane plasmique, les particules virales sont larguées dans l'environnement extracellulaire. La voie de sécrétion des exosomes participe à ce phénomène [155]. Plusieurs données prouvent que le VIH-1 emprunte cette voie pour sortir des macrophages, particulièrement les empreintes laissées par les molécules de l'hôte incorporées par le virus. En effet, lorsque les virus se répliquent dans les macrophages, ils contiennent dans leur enveloppe des protéines cellulaires retrouvées principalement dans les endosomes tardifs et

les MVB (CD63 et LAMP-1) [328]. Ces résultats confirment que le virus exploite la machinerie cellulaire d'endocytose et d'exocytose pour sa biogenèse et qu'il s'adapte selon le type de cellule infectée [334].

1.4.7.3 Incorporation des molécules de l'hôte lors du bourgeonnement

Comme il a été mentionné dans les sections précédentes, le VIH-1 acquiert son enveloppe de la membrane plasmique d'où il est issu ou encore des vésicules endosomales. Dans les deux cas, le virus bourgeonne des radeaux lipidiques [316, 317, 335]. Or, ces domaines membranaires concentrent une variété de protéines aux fonctions multiples, notamment la signalisation et l'adhésion cellulaire. Le virus emporte donc avec lui une panoplie de molécules qui proviennent de la cellule hôte. Non seulement il s'empare des protéines de surface, mais il s'approprie aussi des protéines localisées à l'intérieur du cytoplasme.

Un bon nombre de protéines cellulaires se trouvent sous l'enveloppe virale. Par exemple on retrouve les protéines du cytosquelette (actine, ezrine, moesine, cofiline) [336, 337], le Staufén [338], la cyclophiline A [339, 340], l'APOBEC3G (via Pr55Gag) [341, 342], le Tsg101 et le complexe ESCRT-1 [322, 343]. La liaison de ces protéines cellulaires avec des protéines virales au moment de l'assemblage et du bourgeonnement entraîne leur incorporation à l'intérieur des particules virales.

Les mécanismes dictant l'incorporation des molécules de l'hôte dans l'enveloppe virale semblent plus diversifiés. Les molécules du CMH-I et II sont les principales protéines cellulaires incorporées dans l'enveloppe virale [344]. Elles représentent près de 20% des protéines retrouvées sur l'enveloppe du VIH-1 [345]. Les souches de laboratoires et cliniques amplifiées dans les PBMCs (de l'anglais *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) et

les amygdales contiennent également la molécule ICAM-1 [1, 4]. Plusieurs autres molécules sont pareillement ancrées dans l'enveloppe virale, mais à une plus faible densité. Le tableau 3 résume les principales protéines incorporées dans l'enveloppe virale.

Tableau 3 Liste des molécules de l'hôte incorporées par le VIH-1

Protéines de l'hôte	Origine virale	Souche	Références
CD3	H9	IIIB	[346, 347]
CD4	H9, PBMC	IIIB	[346, 347]
CD11a	H9, PBMC, SupT1, Jurkat, U937	IIIB, IIIRF, PI	[346, 348-350]
CD11b	H9, U937	IIIB	[346]
CD11c	H9, U937	IIIB	[346]
CD18	H9, PBMC, SupT1, Jurkat, U937	IIIB, IIIRF, PI	[346, 348, 349]
CD25	H9, PBMC	IIIB	[347, 350]
CD28	293T, PBMCs, Jurkat	NL4-3, 92HT599, 92HT026, 92RW009	[351]
CD43	H9, PBMC, SupT1, Jurkat	IIIB, IIIRF	[346, 348]
CD54 (ICAM-1)	H9, PBMC, CD4 ⁺ , Jurkat, U937, Raji-CD4 ⁺	IIIB, IIIRF, NL4-3, PI, LAI, 92HT599 JRCSF	[4, 346, 349, 350, 352]
CD55	H9, PBMC, U937	NL4-3, IIIB, PI	[346, 353]

CD59	H9, PBMC, U937	NL4-3, IIIB	[346, 353]
CD62L	PBMC	NL4-3	[354]
CD63	H9, PBMC, SupT1, Jurkat	IIIB, IIIRF	[347, 348]
CD80/86	PBMCs	NL4-3, 93TH054/R5, 91US056/R5, 92UG046/X4, 93UG070/X4	[355]

Plusieurs théories ont été émises pour expliquer l'inclusion et l'exclusion des protéines membranaires. Quatre modèles ont été proposés : l'inclusion par la liaison des protéines avec le cytosquelette d'actine, l'inclusion par l'interaction des protéines cellulaires avec des protéines virales comme la gp120/gp41 ou Pr55Gag, l'inclusion passive par la présence des protéines dans les radeaux lipidiques et/ou dans les endosomes et enfin l'exclusion causée par un encombrement stérique nuisant à l'assemblage et au bourgeonnement [356].

Beaucoup de protéines présentes à la surface des particules virales s'associent naturellement au cytosquelette d'actine. Puisque l'actine s'incorpore à l'intérieur des virus, les protéines associées au cytosquelette devraient l'être tout autant. Cette hypothèse a récemment été renforcée pour la molécule ICAM-1 [357]. En effet, l'actine forme un pont entre la molécule ICAM-1 et le Pr55Gag. Ce phénomène contribue à l'incorporation spécifique de la molécule d'adhésion par l'intermédiaire de l'actine et d'une protéine virale. Le rôle du Pr55Gag dans l'assemblage des particules est déjà bien connu. Cette protéine interagit avec la queue intracytoplasmique de la gp41, une connexion essentielle pour l'incorporation de la gp41 dans l'enveloppe virale [320, 358]. Elle intervient également dans l'incorporation de Vpr et de Vif [359, 360]. Contrairement au Pr55Gag, les glycoprotéines gp120/41 ne sont pas essentielles à l'incorporation des molécules ICAM-1

dans l'enveloppe du VIH-1 [357, 361]. L'incorporation des molécules de HLA-DR (CMH-II) est aussi indépendante de la présence des glycoprotéines de l'enveloppe [362]. L'inclusion passive des molécules présentes dans les radeaux lipidiques reste une avenue alternative expliquant l'incorporation différentielle de certaines molécules de l'hôte dans l'enveloppe virale. Beaucoup d'études suggèrent que le VIH-1 bourgeonne des radeaux lipidiques [363-366]. D'ailleurs le VIH-1 incorpore deux protéines localisées dans les radeaux lipidiques et liant le GPI (glycosylphosphatidylinositol) (CD59 et Thy-1) [366]. De nombreuses molécules de co-stimulation, généralement retrouvées dans les radeaux lipidiques, sont également détectées sur l'enveloppe virale, ce qui valide ce modèle d'inclusion. Par conséquent, les molécules absentes de ces domaines membranaires ne devraient pas se retrouver dans l'enveloppe du VIH-1. Or, la présence des protéines dans ces régions membranaires ne suffit pas nécessairement à leur incorporation. Le meilleur exemple demeure la phosphatase CD45. Cette protéine ne semble pas se retrouver sur le VIH-1. Même si elle est localisée dans les radeaux lipidiques et/ou au site de l'assemblage des virions, elle demeure pratiquement indétectable sur les virus (résultats observés dans notre laboratoire mais non publiés). Son exclusion s'explique davantage par la grosseur de sa queue intracytoplasmique, laquelle cause de l'encombrement stérique et nuie à l'assemblage des virus. Les corécepteurs du VIH-1 représentent un autre exemple de molécules exclues de l'enveloppe virale. Leur taille et leur localisation dans la membrane provoquent possiblement leur exclusion. D'autres expériences restent toutefois nécessaires afin de comprendre les causes réelles responsables de leur bannissement de l'enveloppe du VIH-1.

1.4.8 Maturation des particules virales

Au moment du relargage, les virus sont immatures. Cela signifie que les précurseurs de Gag et de Gag-Pol ne sont pas clivés. L'enzyme qui effectue le clivage de ces protéines est la protéase virale. La protéase génère les protéines p17, p24, p6 et p7 de même que les

enzymes virales. Par la suite il y a la formation de la capside virale, contenant tous les composants décrites dans les sections antérieures, et la matrice protectrice. L'équipe du Dr S.D. Fuller a dernièrement montré que la majorité des virus matures contiennent une capside conique, mais qu'environ le tiers en possèdent plus de deux (capsides) [367]. De plus, ils ont remarqué qu'environ 7% des capsides sont tubulaires au lieu d'être coniques. Ces résultats démontrent que l'assemblage de la capside n'est pas toujours structuré. Toutefois, on ignore si les différences dans sa morphologie ont un rôle à jouer dans l'infectivité virale.

1.5 Le(s) rôle(s) des molécules de l'hôte dans le cycle de vie du VIH-1

L'incorporation de protéines cellulaires par le virus influence les différentes étapes du cycle viral. Certaines protéines favorisent les événements précoces de l'infection, alors que d'autres activent les cellules du système immunitaire ou encore protègent le virus contre sa neutralisation et/ou sa dégradation.

1.5.1 Le CMH-II

L'isotype HLA-DR du CMH-II est incorporé massivement dans l'enveloppe du VIH-1. Sa présence double pratiquement l'attachement et l'infectivité virale par sa liaison avec le CD4 [368, 369]. Par ailleurs, la présence des molécules de HLA-DR permet au virus de présenter des antigènes aux cellules T et de les activer [370]. Une autre étude démontre que le virus qui contient le CMH-II a la capacité de présenter des super antigènes aux lymphocytes T [371]. Donc, la présence de HLA-DR sur le virus déclenche des événements de signalisation dans les cellules avec lesquelles le virus entre en contact. Il est possible que

ce phénomène ait un impact sur l'hyper-activation du système immunitaire observé chez les individus infectés. Toutefois d'autres analyses sont requises afin de clarifier cette hypothèse.

1.5.2 L'ICAM-1

La molécule d'adhésion ICAM-1 se retrouve abondamment dans l'enveloppe du VIH-1. Elle augmente considérablement l'infectivité (3 à 10 fois) des virus lorsque les cellules cibles expriment le contre-ligand d'ICAM-1, l'intégrine LFA-1, sous sa forme activée [2, 6, 7, 205, 372-374]. L'impact de ce phénomène est important, puisque tous les virus qui bourgeonnent des cellules T ou des macrophages incorporent la molécule ICAM-1. Par ailleurs, la présence d'ICAM-1 sur le virus protège ce dernier de la neutralisation par les anticorps de même que de l'inhibiteur de fusion T-20 [5, 7, 375, 376]. Le mécanisme par lequel la présence de la molécule ICAM-1 influence l'infectivité, confère une résistance aux anticorps neutralisants et diminue la sensibilité des virus à l'inhibiteur de fusion fut l'objet de mes travaux de doctorat. Ces aspects seront donc davantage détaillés dans les chapitres IV, V et VI.

1.5.3 Le CD55 et le CD59

Les molécules CD55 et CD59 sont des protéines qui confèrent la résistance à l'attaque et à la lyse par le complément. Leur présence dans l'enveloppe du VIH-1 protège ce dernier contre la destruction médiée par les protéines du complément [377].

1.6 La réponse de l'hôte à l'infection virale

La compréhension de la pathogenèse du VIH-1 passe par celle des bases immunologiques du contrôle des infections virales. La réponse de l'organisme face à une invasion virale se divise en deux catégories : les réponses innée et acquise [128, 378, 379]. L'immunité innée, une réponse immédiate et non spécifique, est la première ligne de défense de l'organisme. Elle joue un rôle crucial dans le contrôle de l'infection primaire dans les muqueuses et dans l'organisation de la défense spécifique. Elle s'orchestre par les peptides antimicrobiens, les molécules du complément, les molécules antivirales comme l'INF α/β , les phagocytes (macrophages, neutrophiles, cellules de Langerhans) et les cellules NK/NKT. Ces cellules génèrent d'importants médiateurs solubles, dont les cytokines, les interférons et les chimiokines, lesquels interfèrent avec la réplication virale et entraînent la mise en place d'une défense anti-VIH spécifique.

Récemment, deux protéines cellulaires ont été associées à l'immunité innée anti-rétrovirale : TRIM5 α [380] et APOBEC3G [381]. La protéine TRIM5 α , un membre de la famille des protéines du cytosquelette, restreint l'infection par le VIH-1 dans les singes *Macaca mulatta* et les *Cercopithecus aethiops* [382, 383]. Selon ces données, l'infection d'une nouvelle espèce par un virus nécessite d'abord une adaptation afin d'éviter la restriction médiée par la protéine TRIM5 α du nouvel hôte [380]. De nombreuses études sont présentement en cours afin de déterminer la cible de TRIM5 α et son mécanisme d'action. L'APOBEC3G (de l'anglais *apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like-3G*), quant à lui, fait partie de la famille des AID/APOBEC, des protéines modifiant l'ARN (en anglais *editing*) dont certains membres ont la capacité de désaminer l'ARN et/ou l'ADN [384-386]. L'APOBEC3G semble exercer son effet antirétroviral en désaminant la cytidine (dC \rightarrow dU) dans l'ADN complémentaire (ADNc) du premier brin d'ARN rétrotranscrit (du VIH-1). La présence de dU dans l'ADNc entraîne alors sa dégradation ou encore une hypermutation, un mécanisme entraînant l'inactivation des gènes viraux [387-389]. Le VIH-1 a par contre développé une stratégie pour contrecarrer

cet effet antiviral. En effet, plusieurs études ont démontré que les souches virales déficientes en Vif sont affectées par l'APOBEC3G, alors que celles qui l'expriment sont résistantes [385, 390]. Des études ont confirmé que Vif augmente la dégradation d'APOBEC3G par le protéasome en lui ajoutant des molécules d'ubiquitines [391, 392]. Récemment, il a été établi que Vif interfère également avec l'activité de l'APOBEC3G en se liant au site nécessaire à l'activité désaminase [393].

La réponse immunitaire acquise est une réplique dirigée précisément contre un agent microbien. Elle s'orchestre par l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs (en cellules effectrices de type TH1 ou TH2) dans les organes lymphoïdes secondaires à la suite de la reconnaissance d'un antigène spécifique présenté par les CPA. L'activation de ces cellules est cruciale pour la coordination des réponses humorale et cellulaire. La réponse humorale, induite par les infections et la vaccination, fait intervenir les lymphocytes B. Ces cellules, activées par les lymphocytes T $CD4^+$ de type TH2, produisent des anticorps spécifiques qui se lient aux particules virales (sur des épitopes exposés en surface). Les anticorps participent à la réponse antivirale de trois manières : par leur liaison au virus, 1) ils induisent sa lyse par le complément, 2) ils amorcent sa capture et sa dégradation par les phagocytes et 3) ils inactivent le virus en bloquant son attachement sur les cellules cibles [128]. Bien qu'elle soit cruciale dans la destruction des virus libres, l'immunité humorale est inefficace contre les cellules infectées. Par contre, la réponse médiée par les lymphocytes T $CD8^+$ entraîne la destruction de ces cellules. Tout comme les lymphocytes T $CD4^+$, les $CD8^+$ forment une population hétérogène formée de cellules naïves, de cellules dites mémoires et de cellules effectrices (CTL). Ces dernières, générées à la suite de l'activation des lymphocytes T $CD8^+$ naïfs par les cellules T $CD4^+$ effectrices de type TH1, ont un tropisme pour les tissus périphériques non lymphoïdes. Elles identifient les cellules infectées ou en détresse et les détruisent. Cette reconnaissance entraîne la mort de la cellule cible, par l'intermédiaire d'une interaction directe entre la molécule Fas (CD95) et le Fas ligand, et par la dégranulation des CTL libérant au contact de la cible les enzymes toxiques que sont la perforine et les granzymes [128]. Ces cellules produisent également de

l'interféron gamma ($\text{INF}\gamma$), une cytokine inhibant localement la réplication virale, et des facteurs solubles réduisant la capacité des virus à pénétrer dans les cellules (chimiokines Rantes, $\text{MIP-1}\alpha$ et $\text{MIP-1}\beta$) [98, 394].

Puisque les lymphocytes T CD4^+ constituent les pierres angulaires de l'immunité acquise, leur destruction et/ou l'altération de leurs fonctions entraîne inévitablement des dommages dans le contrôle et l'éradication des infections virales, un phénomène observable chez les individus infectés par le VIH-1.

1.7 La pathogenèse virale

La facilité avec laquelle le VIH-1 s'est disséminé partout dans le monde est directement liée aux particularités de sa pathogenèse. Puisque l'infection initiale n'implique aucun symptôme apparent, les personnes infectées transmettent le virus pendant plusieurs années sans jamais connaître leur état. Or, les effets nocifs de l'infection sur le système immunitaire s'accroissent progressivement et, lorsque l'équilibre entre le virus et le système immunitaire est brisé, les symptômes associés au SIDA apparaissent, de pair avec les conséquences qui en découlent.

L'infection par le VIH-1 comporte deux effets principaux : la détérioration progressive du système immunitaire, rendant l'organisme plus vulnérable aux infections microbiennes et à certaines néoplasies, et la détérioration du système nerveux, menant à la démence [395-397]. Ces deux conséquences reflètent l'évolution graduelle de la pathogenèse comportant cinq phases : la transmission, la primo-infection, la période de latence, la phase symptomatique et enfin le SIDA.

1.7.1 Les marqueurs biologiques

La charge virale et le décompte des lymphocytes T CD4⁺ sont deux paramètres importants pour le diagnostic et l'évaluation de la progression de l'infection [398]. La charge virale, exprimée en nombre de copies d'ARN viral par millilitre de sang, nous informe sur la réplication du virus. La charge virale, très élevée durant la primo-infection, diminue lors de la période de latence et remonte graduellement à mesure que l'infection se dirige vers le stade SIDA. Le décompte des lymphocytes T CD4⁺ nous indique l'état du système immunitaire et s'exprime en nombre de cellules par millilitre de sang. Chez les personnes immunocompétentes, le décompte des cellules T se situe entre 800 et 1 200 cellules par millilitre. Chez les individus séropositifs, un seuil de 500 indique une atteinte au système immunitaire. À des taux encore plus faibles, le patient doit subir certains traitements en prophylaxie afin de contrer l'apparition d'infections opportunistes. La combinaison de ces deux paramètres permet de déterminer à quel moment démarrer une thérapie antirétrovirale. Leur mesure doit être effectuée tous les trois à six mois. Ces données proviennent du Comité consultatif sur la prise en charge clinique des personnes vivant avec le VIH-1 [399].

1.7.2 La transmission

L'efficacité de transmission du virus d'un individu à un autre dépend principalement de la réunion de deux conditions : la présence d'une quantité suffisante de virus dans un fluide biologique et d'une porte d'entrée permissive à ce dernier. Le sang, le sperme et le lait maternel sont les liquides biologiques contenant le plus de virus [128]. Les transmissions par contact sexuel (homosexuels masculins, hétérosexuels) et par le sang (toxicomanie, accidents, transfusions sanguines) demeurent les façons courantes de transmettre le virus. La transmission se fait également de la mère à l'enfant durant la grossesse, lors de l'accouchement ou lors de l'allaitement.

Une charge virale élevée ($> 1\ 500$ virus/ml) [400], des antécédents de maladies transmises sexuellement [401-404] et certaines périodes du cycle menstruel [405, 406] sont tous des éléments pouvant augmenter les chances de transmission. Les femmes demeurent beaucoup plus vulnérables que les hommes à la contamination par le VIH et les autres maladies transmises sexuellement (3 à 8 fois) [407].

Les muqueuses présentes dans les sites anatomiques propices à une infection primaire (bouche, vagin, col de l'utérus, rectum, colon) représentent une excellente porte d'entrée pour le VIH-1. Les épithéliums stratifiés des muqueuses orales, génitales et anales constituent des interfaces entre les milieux externe et interne. Lorsque la muqueuse est intacte, le virus a la capacité de traverser la barrière épithéliale et d'infecter les cellules immunitaires présentes dans les couches internes de l'épithélium. Les virus R5 traversent la barrière épithéliale par transcytose. Or, la sous-muqueuse, localisée du côté basolatéral, contient des cellules du système immunitaire sujettes à l'infection, notamment les cellules de Langerhans, les lymphocytes T $CD4^+$ « mémoires » effecteurs et les macrophages [408, 409]. Toutes ces cellules infectées empruntent le système lymphatique et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. La figure 15 illustre la transmission du VIH-1 par voie sexuelle chez la femme. Lorsqu'il y a des micro ulcérations ou des bris aux muqueuses, le virus atteint plus facilement les cellules du système immunitaire et n'a pas à traverser la barrière de cellules épithéliales. Parmi les conditions responsables de micro ulcérations dans la muqueuse vaginale, notons certaines périodes du cycle menstruel, la prise d'hormones (comme la progestérone), et l'inflammation (en présence d'infections transmises sexuellement, de vaginites bactériennes et l'emploi de microbicides comme le nonoxynol-9) [411].

1.7.3 La primo-infection

L'infection primaire réfère à la période située entre la transmission et l'apparition d'une réponse immunitaire spécifique contre le virus. Bien que certains individus soient asymptomatiques durant cette période, 50% à 90% des gens infectés développent des symptômes non spécifiques ressemblant à la mononucléose ou à la grippe [412, 413]. Ce stade s'étale sur une période de trois à six semaines.

La transmission du virus mène généralement à l'infection progressive des cellules environnantes, incluant principalement les cellules du système immunitaire, celles qui généralement nous protègent contre les invasions microbiennes. En deux à trois semaines, le virus envahit les organes lymphoïdes secondaires et ces derniers deviennent les principaux sites de production et d'emmagasinement viral de même que de destruction des lymphocytes T CD4⁺ [414- 416]. Une étude menée avec le VIS a montré que dans les deux premières semaines d'infection, 80% des lymphocytes T CD4⁺ contenant l'ARN viral sont des cellules quiescentes, lesquelles représentent d'importants réservoirs du virus [417].

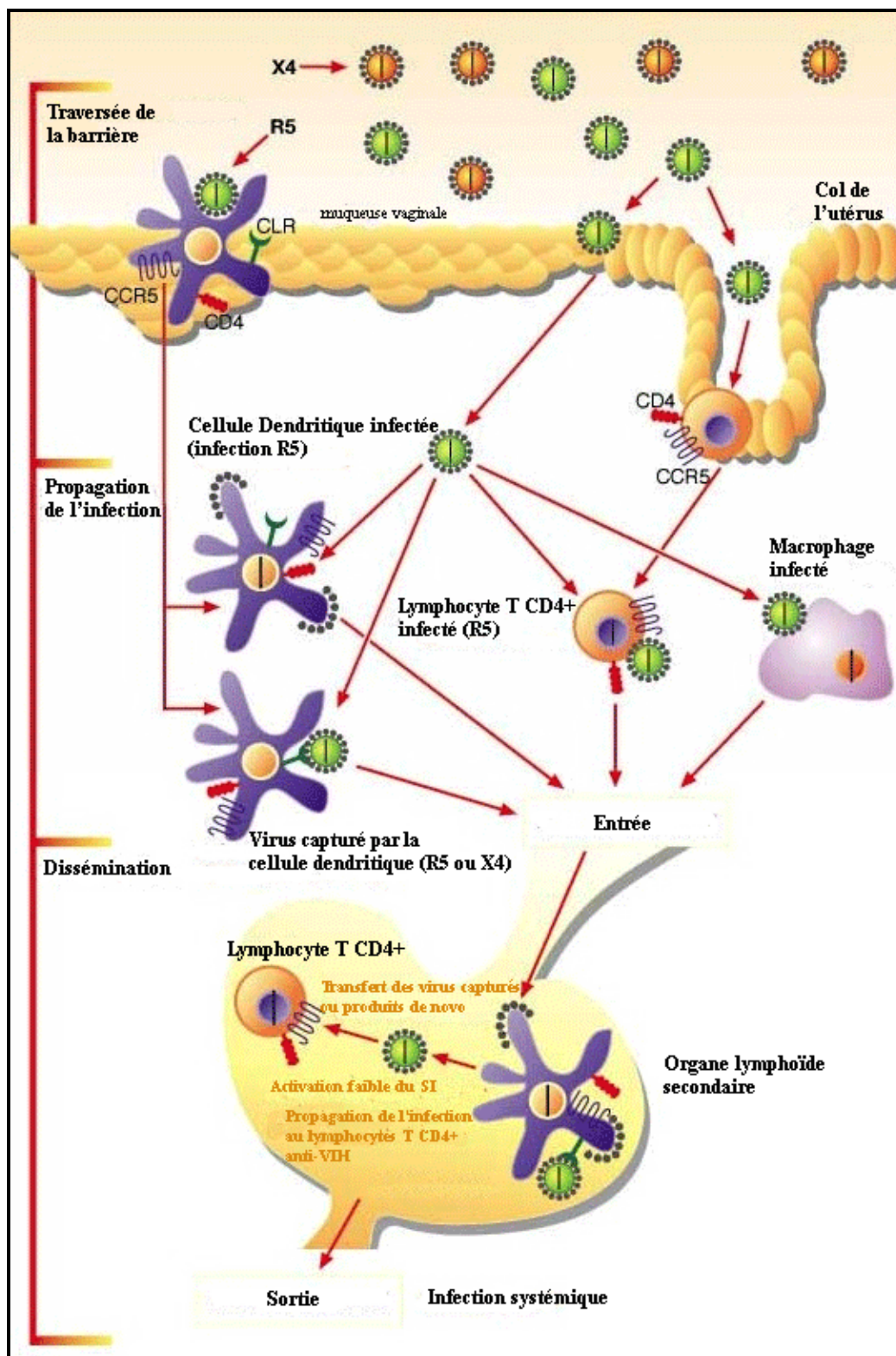


Figure 15. Transmission dans les muqueuses intactes (adaptée de [410])

La primo-infection se caractérise par une réplication très active du virus (plus d'un million de copies du virus par millilitre de sang sont retrouvés chez un individu infecté durant cette période) [103]. Les sécrétions vaginales, le sperme et le lait maternel contiennent aussi une quantité considérable de particules virales. Par conséquent, le risque de transmission est beaucoup plus élevé durant la primo-infection que lors de tout autre stade de l'infection. De plus, la réplication massive du virus dans les lymphocytes T CD4⁺, les principales cibles du VIH-1, entraîne leur destruction durant l'infection primaire [418]. Il a été estimé qu'entre 10 et 100 millions de cellules T CD4⁺ infectées meurent chaque jour dans un processus dynamique où chaque cellule T infectée génère 20 cellules contenant le virus dans leur génome [419-421].

L'infection primaire induit cependant l'établissement d'une réponse immunitaire spécifique contre le VIH-1. C'est pourquoi au bout de quelques semaines d'infection (une semaine à trois mois), le nombre de lymphocytes T CD4⁺ redevient normal et la charge virale sanguine diminue jusqu'à être quasi indétectable. La réponse anti-VIH met en jeu les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques (CTL) et les T CD4⁺. Bien que ces cellules jouent un rôle extrêmement important dans le contrôle de la réplication virale et la destruction des cellules infectées, leurs efforts ne permettent qu'un contrôle partiel de l'infection. En effet, les CTL sont incapables d'éliminer les virus libres dans le sang. C'est là que la réponse humorale joue un rôle non négligeable lors de la primo-infection. Plus tardive, elle apparaît environ six mois suivant l'infection [415, 422]. Cette réponse se caractérise par la production d'anticorps anti-VIH par les lymphocytes B suivant leur activation par les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques. Les anticorps produits neutralisent les virus libres entraînant leur capture par les macrophages et les cellules dendritiques et ainsi leur dégradation. Bref, les réponses cellulaire et humorale sont essentielles au contrôle de l'infection, mais ne permettent malheureusement pas l'éradication du VIH.

1.7.4 La période de latence

Après la primo-infection, l'individu infecté entre dans un état de latence clinique, un état caractérisé par l'absence de symptômes et d'infections opportunistes [398]. La chronicité de l'infection par le VIH-1 est liée à la capacité du virus à établir des infections latentes dans certaines cellules, notamment les lymphocytes T CD4⁺ de type mémoire central et les macrophages (en primo-infection) [292]. Un certain équilibre entre le virus et le système immunitaire se maintient pendant plusieurs années sans affecter la santé du patient séropositif (entre trois et dix ans) [423]. La quantité d'ARN viral demeure tout de même élevée durant cette période. L'équilibre entre la production et la destruction de particules virales et/ou des cellules infectées est alors déterminant. La progression de l'infection coïncide avec le déclin des CTL. On estime qu'environ 10^{10} particules virales sont produites et détruites par jour [424], alors que 3×10^9 lymphocytes T CD4⁺ meurent de façon journalière [420]. Au fur et à mesure que le virus se multiplie, les lymphocytes T CD4⁺ perdent du terrain. Les cellules dirigées spécifiquement contre le VIH-1 sont celles qui sont détruites de préférence. Ainsi, le VIH-1 se multiplie librement et la charge virale augmente. Cette charge est inversement proportionnelle à la quantité de cellules T CD4⁺. Plus la charge reste élevée, moins il y a de lymphocytes T CD4⁺. Elle constitue donc un bon indice de la progression de la maladie au même titre que le déclin des cellules T CD4⁺.

L'équilibre entre la production et la destruction des virus se maintient pendant un certain nombre d'années jusqu'à ce que le VIH-1 prenne progressivement le dessus sur l'organisme (8-10 ans) [425]. Tant que le nombre de lymphocytes demeure au-dessus d'un certain seuil ($> 200/\text{mm}^3$), le patient ne développe pas de symptôme [399]. Toutefois, le VIH-1 détruit progressivement les cellules T CD4⁺, les pierres angulaires du système immunitaire. On estime que le nombre de lymphocytes T CD4⁺ décline à un rythme de 1% par jour durant la progression de l'infection [420]. Cela amène inévitablement d'importantes répercussions sur le système immunitaire.

1.7.4.1 Sujets asymptomatiques à long terme

De manière remarquable et pour des raisons encore méconnues, certains individus contrôlent l'infection pendant des années sans que le virus prenne le dessus. Ces sujets sont qualifiés d'asymptomatiques à long terme (ALT) (en anglais *Long Term Non-Progressors*) [426-429]. Ces cas représentent 1 à 2% des individus infectés à travers le monde. Chez ces individus, la réponse cellulaire est très vigoureuse et met en jeu des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ anti-VIH. Même s'il se produit un peu de réplication virale, le taux de cellules T CD4⁺ demeure stable. Les ALT vivent très bien avec le virus et cela peut durer entre 15 et 20 ans [423]. Plusieurs facteurs cellulaires et viraux semblent responsables de ce phénomène, notamment les acteurs de l'immunité innée. Chez ces individus, les CTL produisent trois défensines, soient les alpha-1, 2 et 3, capables d'inhiber la réplication virale [430]. D'autre part, les cellules NK qui détruisent de façon non spécifique les cellules infectées ou cancéreuses semblent essentielles à l'élimination des virus en primo-infection chez les ALT [431]. Toutefois, des expériences supplémentaires seraient nécessaires afin de comprendre davantage les réponses immunitaires protectrices chez les ALT.

1.7.4.2 Stratégies d'évasion virale

Le VIH-1 a développé divers mécanismes pour échapper à la surveillance du système immunitaire [432]. D'abord, l'infection des cellules orchestrant la réponse immune dirigée contre lui est un moyen ingénieux de s'y dérober. Le VIH-1 infecte non seulement les lymphocytes T CD4⁺, mais aussi la majorité des autres cellules composant le système immunitaire. L'infection d'une cellule entraîne sa destruction ou encore l'altération de ses fonctions. D'autre part, le VIH-1 a la capacité d'échapper aux effets des CTL, les cellules s'avérant les plus efficaces dans le contrôle de l'infection. Le virus s'y soustrait de trois façons : 1) la réduction du nombre de CTL en induisant leur mort programmée (apoptose)

[433, 434], 2) l'introduction de mutations dans les séquences virales reconnues par les CTL [435] et 3) l'interférence avec la synthèse et l'expression du CMH-I, une molécule essentielle à la reconnaissance par les CTL [436, 437]. Par ailleurs, le virus échappe à la réponse humorale en modifiant ses protéines de surface, les rendant méconnaissables par les anticorps présents en circulation. Cette habilité qu'a le VIH-1 à modifier ses protéines de surface rend aussi très difficile l'élaboration d'un vaccin. L'ensemble de ces stratégies virales fait en sorte que le système immunitaire est progressivement submergé et détruit par l'infection. C'est alors que la phase symptomatique apparaît.

1.7.5 L'infection symptomatique

Lorsque le nombre de cellules T CD4⁺ passe en dessous du seuil critique ($> 200/\text{mm}^3$), le corps devient plus vulnérable à certaines maladies normalement contrôlées. Ce stade se caractérise par l'apparition d'anomalies plus ou moins graves et non spécifiques, mais qui persistent chez les gens infectés. L'amaigrissement, le gonflement des ganglions, des diarrhées et de la fièvre constituent les symptômes fréquemment rencontrés. Par ailleurs, les individus peuvent également développer un zona, une candidose oropharyngée, des crises d'herpès et une leucoplasie chevelue de la langue [398, 438, 439].

1.7.6 Le SIDA

Le SIDA apparaît au moment de l'effondrement du système immunitaire (déclin des lymphocytes T CD4⁺) et de l'augmentation de la virémie. Ce stade, le plus grave de l'infection, se caractérise par le développement de maladies opportunistes et de néoplasies graves touchant diverses parties du corps [440]. Environ 25 maladies caractérisent les sidatiques. On retrouve notamment la pneumonie à *Pneumocystis carini*, la tuberculose, la

toxoplasmose, les mycoses à *Candida*, les infections par le cytomégalovirus, les encéphalites, les lymphomes et le sarcome de Kaposi. Ces infections sont pratiquement absentes chez les gens immunocompétents. Les micro-organismes responsables font partie de la flore normale des individus ou encore constituent des pathogènes déjà rencontrés et éliminés par l'organisme dans le passé. Or, chez les gens immunodéprimés, le système immunitaire ne peut plus arrêter la multiplication de ces micro-organismes, puisque les cellules T CD4⁺ « mémoire » qui répondaient spécifiquement à ces antigènes ont été détruites et que le système n'est pas assez fort pour régénérer les lymphocytes T effecteurs. Le SIDA se caractérise également par la destruction des organes lymphoïdes secondaires occasionnant une immunodéficiences très sévère. La démence, une autre des complications du SIDA, résulte de la destruction des cellules neuronales engendrée en partie par la production de cytokines et médiateurs de l'inflammation dans le cerveau [441]. Tous ces problèmes mettent la vie du patient en danger. Sans traitement, le patient survit généralement pendant environ trois ans.

1.7.7 Les altérations du système immunitaire au cours de l'infection

L'infection par le VIH-1 entraîne de nombreuses irrégularités dans le système immunitaire, dont la diminution progressive du nombre de lymphocytes T CD4⁺ [442]. Cette réduction est causée par un ensemble de phénomènes dont la destruction des cellules infectées et des cellules anti-VIH, l'activation chronique du système immunitaire induisant un renouvellement cellulaire important (génération-activation-destruction), la destruction des organes lymphoïdes secondaires et du thymus, et enfin la mort de cellules non infectées par un mécanisme encore méconnu.

1.7.7.1 Les lymphocytes T CD4⁺

L'homéostasie du système immunitaire passe inévitablement par le bon fonctionnement des organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus) et secondaires (ganglions lymphatiques, rate, amygdales). La moelle osseuse produit l'ensemble des cellules immunitaires. Le thymus, site de maturation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ naïfs, est très actif pendant les premières années de la vie, mais s'atrophie avec l'âge. Malgré tout, il génère un certain pool de cellules naïves tout au long de la vie. Les organes lymphoïdes secondaires sont les compartiments où les lymphocytes T rencontrent l'antigène et coordonnent la défense spécifique. Le déclenchement de la réponse immunitaire spécifique est un phénomène quasi aléatoire. Elle découle de la rencontre d'une cellule présentatrice d'antigène (CPA) présentant l'antigène sous forme de peptide à un lymphocyte T exprimant un récepteur spécifique pour ce peptide. Les lymphocytes T spécifiques sont minoritaires et dilués dans la masse de lymphocytes T totale. Il a été estimé qu'une cellule sur 10⁵ reconnaît un antigène spécifique [128]. La probabilité de rencontre demeure très faible, mais est compensée par une cadence importante de la migration des cellules à travers l'organisme.

Lors de l'infection, les cellules T CD4⁺ « mémoire » répondant spécifiquement au VIH-1 se confinent dans les organes lymphoïdes secondaires, un lieu où l'inflammation est importante. Ces endroits sont propices à l'infection, la formation de syncytium (la fusion entre plusieurs cellules infectées et non infectées) ou encore l'induction de la mort cellulaire. Le déclin important des lymphocytes T CD4⁺ n'est pas uniquement causé par leur infection, puisque les cellules naïves, plus réfractaires à l'infection, meurent également chez les individus infectés [443]. Chez ses personnes, l'hyperactivation du système immunitaire se produit à tous les stades de l'infection et elle est secondaire, du moins en partie, à la stimulation des cellules par certaines protéines virales (p.ex. gp120, Tat). Par conséquent, les fonctions cellulaires sont dérégées, la production de cytokines est anormale et la réplication virale augmente. Ce phénomène entraîne également la perte de cellules par

un mécanisme de mort programmée nommé apoptose active ou AICD (de l'anglais *Activation-Induced Cell Death*). Une étude a récemment démontré que les cellules Tme $CD4^+$ et $CD8^+$ se renouvellent abondamment chez les personnes infectées, contrairement aux cellules T naïves et aux Tmc [444]. Les auteurs affirment que cette augmentation est directement liée à l'hyperactivation du système immunitaire. Cette génération rapide, combinée à l'hyperactivation de ces cellules entraîne leur destruction par l'AICD. Ce phénomène exerce un drainage continu du pool de cellules naïves, diminuant la capacité du système immunitaire à répondre spécifiquement aux envahisseurs. D'autre part, l'hyperactivation favorise la génération des cellules Tme aux dépens des Tmc, lesquelles sont les principales cellules responsables de la coordination de la deuxième réponse immunitaire contre un pathogène. Chez les patients traités en primo-infection et qui contrôlent leur virémie, on dénote la présence des cellules Tmc et Tme produisant de l'IL-2 et de l'INF γ , deux cytokines importantes pour l'orchestration de la réponse spécifique. Par opposition, les patients en échec thérapeutique, avec une virémie élevée, ont peu de cellules Tmc, alors que leurs Tme ne produisent pas d'IL-2 et meurent rapidement [445]. Ces résultats confirment que les cellules Tmc jouent un rôle déterminant dans le contrôle de l'infection, tout comme la production d'IL-2 par les deux sous-populations. L'hyperactivation est aussi favorable à la réplication du virus et soutient l'augmentation de la charge virale. Le traitement des individus infectés avec le HAART permet de réduire la charge virale, mais aussi de reconstituer en partie les sous-populations de lymphocytes T $CD4^+$ dans le sang périphérique. Le HAART agit sur trois aspects : il augmente rapidement la quantité de cellules T $CD4^+$ mémoires, diminue l'activation des cellules T et accroît le nombre de cellules T naïves [446, 447]. Or, ses travaux ne reflètent qu'une partie de l'état du système immunitaire, puisqu'ils ont été exécutés avec le sang des personnes infectées et non avec leurs ganglions lymphatiques (des endroits qui contiennent de 50 à 60% des lymphocytes totaux) [415, 448-450]. Une étude combinant l'analyse des populations lymphocytaires dans le sang périphérique et dans les ganglions de sujet sains et de patients infectés et asymptomatiques a révélé que globalement (dans le sang et les ganglions) la fraction de cellules T en division est réduite chez les gens infectés [451]. Puisque le HAART entraîne une diminution de la réplication virale et donc de l'activation des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques, l'inflammation ganglionnaire diminue et les

cellules T « mémoire » anti-VIH qui y étaient séquestrées sont relarguées dans le sang. C'est pourquoi les travaux limités à l'analyse des populations cellulaires dans le sang montrent un accroissement des cellules T « mémoire » dans ce compartiment. Toutefois, il semble que ce soit le résultat d'une redistribution des cellules T CD4⁺ dans l'organisme plutôt qu'un nouvel apport en cellules « mémoire ». La formation de cellules T naïves représente le processus principal de renouvellement des lymphocytes T. Or, chez l'adulte, le thymus est atrophié et génère peu de lymphocytes naïfs comparativement à celui de l'enfant. Le VIH-1 peut infecter les cellules T immatures localisées dans le thymus, causant de l'inflammation et sa destruction. Chez l'enfant, l'atteinte du thymus mène à un pronostic défavorable [452]. Par contre, l'ablation du thymus chez l'adulte ne prévient pas l'augmentation des lymphocytes T naïfs chez les patients traités avec le HAART [453]. De ce fait, chez les individus infectés, le nouvel apport de lymphocytes T CD4⁺ naïfs proviendrait soit du thymus et/ou de l'expansion clonale des cellules matures préexistantes en circulation [454-456].

1.7.7.2 Les lymphocytes T CD8⁺

Les lymphocytes T CD8⁺ jouent un rôle déterminant dans le contrôle de l'infection virale. Chez les sujets infectés, une expansion importante des lymphocytes T CD8⁺ a lieu très tôt lors de l'infection et résulte de la prolifération rapide des cellules T CD8⁺ « mémoire » et des CTL [457, 458]. Le VIH-1 ne manifeste pas de tropisme pour ces cellules, c'est pourquoi elles déclinent peu chez les individus infectés, sauf lors de l'hyperactivation menant à l'AICD ou pendant le traitement par les antirétroviraux. Par contre, le pool de lymphocytes T CD8⁺ naïfs diminue tout comme les T CD4⁺, suggérant une atteinte dans le processus de génération des lymphocytes T.

1.7.7.3 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les cellules responsables de la production des anticorps. Le VIH-1 semble peu apte à infecter les lymphocytes B de manière productive. Par contre, les fonctions immunologiques de ces cellules sont très endommagées chez les personnes infectées [459, 460]. Chez ces individus, il y a une hypergammaglobulinémie, c'est-à-dire une production anormale d'anticorps non spécifiques présents dans le plasma. Des études sont en cours afin de comprendre le ou les mécanismes par lesquels l'infection virale altère les fonctions biologiques des lymphocytes B.

1.7.7.4 L'immunité innée

La réponse innée (immunité non spécifique) est la première ligne de défense de l'organisme. Chez les individus infectés, une partie des fonctions innées est altérée. Par exemple, l'infection des macrophages par le VIH-1 endommage certaines de ses activités principales, notamment la phagocytose [461-465]. Paradoxalement, l'infection des macrophages augmente leur capacité à produire des médiateurs de l'inflammation et à activer les lymphocytes T CD4⁺, deux phénomènes favorisant l'infection des lymphocytes T CD4⁺ [466-468]. L'infection par le VIH-1 affecte aussi la biologie des cellules dendritiques. Leur maturation est inhibée, de même que leur habilité à stimuler les lymphocytes T CD4⁺ [469, 470]. Des études ont également montré que l'infection des cellules NKT entraîne leur destruction au même titre que les lymphocytes T CD4⁺ [170-172]. La perte de ces cellules amène des conditions favorables à l'auto-immunité et à une moins bonne défense contre les invasions bactériennes et virales, de même qu'au développement de lésions tumorales [471].

Tous ces effets néfastes sur le système immunitaire contribuent à l'incapacité de l'organisme infecté à maîtriser les infections opportunistes et à enrayer l'infection du VIH-1. Les traitements antirétroviraux et l'immunothérapie sont donc importants pour restaurer le système immunitaire et améliorer l'espérance de vie des individus infectés.

1.8 Les traitements

Les médicaments offerts pour combattre le VIH-1 ciblent différentes étapes de son cycle de vie. Ces composés améliorent l'espérance de vie des malades, mais occasionnent plusieurs effets secondaires, d'où parfois le manque d'observance de la part des patients. Par ailleurs, ces molécules ne permettent ni de rétablir complètement le système immunitaire ni d'éradiquer le virus.

1.8.1 Les inhibiteurs antirétroviraux

Le premier médicament antirétroviral, l'azidothymidine (AZT), est apparu en 1985. L'AZT a été synthétisée en 1964 en tant qu'anti-cancéreux, mais n'a pas été utilisé à cette fin en raison de sa faible activité anti-tumorale. Son activité antirétrovirale fut démontrée en 1974 sur le rétrovirus de la leucémie murine de *Friend* et en 1985 sur le VIH-1 [472]. L'ère de la monothérapie débuta en 1987 [473]. L'AZT, un analogue de nucléosides, est un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse (INTI). D'autres analogues de nucléosides, dont le d4T, le 3TC et le ddC furent synthétisés par la suite afin d'être employés en combinaison avec l'AZT (en bithérapie). Pour être actifs, les INTI doivent être phosphorylés par la cellule [472, 474, 475]. Sous leur forme triphosphorylée, ils s'incorporent à la chaîne d'ADN en formation lors de la transcription de l'ARN du virus et en bloquent l'étape finale. Malheureusement, ils agissent également dans les processus naturels de

multiplication cellulaire. Leur toxicité, en particulier envers les mitochondries, a été mise en évidence chez l'adulte et chez l'enfant. Vers la fin des années 90, les inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (INNTI) firent leur apparition sur le marché (p.ex. efavirenz, névirapine et délavirdine) [476-478]. Cette classe de médicament agit aussi sur la transcriptase inverse, mais de manière différente des analogues nucléosidiques. Ces composés bloquent la synthèse d'ADN viral en se fixant aux sites actifs de la transcriptase inverse et l'empêchent de fonctionner. Comme ils ciblent uniquement une protéine virale, leurs effets secondaires sont minimes. L'autre classe d'inhibiteurs, découverte au début des années 90, cible la protéase du VIH-1 (p.ex. saquinavir, ritonavir et indinavir) [479, 480]. Ces inhibiteurs empêchent l'activité de l'enzyme virale de sorte que les virus nouvellement produits sont défectueux et incapables d'infecter de nouvelles cellules. La trithérapie (HAART) (de l'anglais *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*) débuta en 1996 [481]. Plusieurs travaux confirment que la combinaison de trois antirétroviraux ralentit l'apparition de la résistance virale face à ces composés. Malencontreusement, le virus acquiert inévitablement des mutations qui lui confèrent une résistance face à certains inhibiteurs. Par conséquent, le traitement doit généralement être modifié à plusieurs occasions.

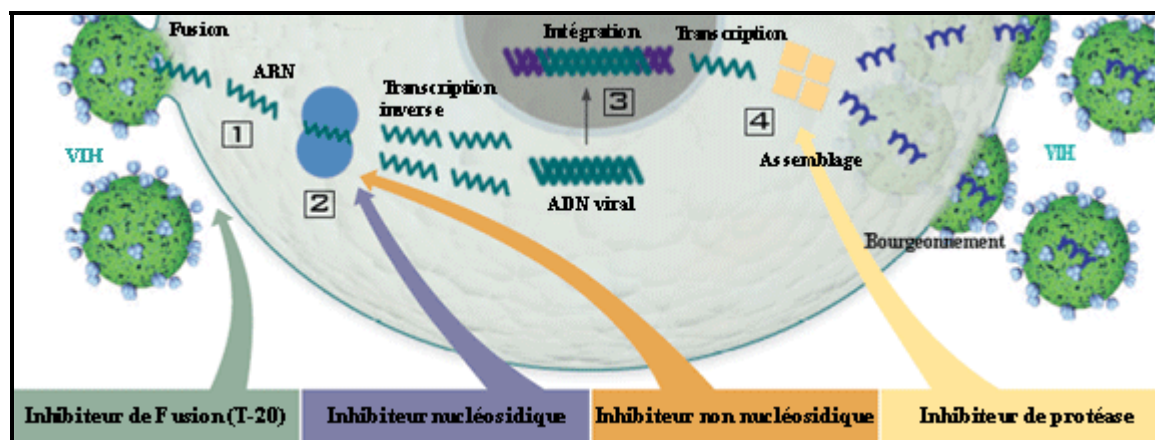


Figure 16. Les classes de médicaments antirétroviraux et leurs sites d'action (adaptée de [482])

1.8.2 Les effets secondaires du HAART

Les effets indésirables sur l'organisme de la prise du HAART restent considérables. En effet, les complications métaboliques (difficilement réversibles) touchent environ 60% des individus sous thérapie depuis plus de 11 ans [483, 484]. Les mécanismes occasionnant ces problèmes de toxicité demeurent peu compris et diffèrent selon les individus. Les inhibiteurs de la protéase virale sont les plus problématiques. Plusieurs données prouvent que ces composés entravent le métabolisme du glucose et des lipides provoquant le diabète sucré, l'hypertriglycémie, l'hypercholestérolémie et la lipodystrophie [485, 486]. Les inhibiteurs nucléosidiques quand à eux endommagent les mitochondries favorisant ainsi la production d'acide lactique, la gluconéogenèse et l'apoptose des adipocytes [487]. L'érythème, un autre effet indésirable causé par le HAART, est provoqué par toutes les classes de médicaments, incluant les inhibiteurs non nucléosidiques [487]. La toxicité des médicaments constitue une des barrières à l'observance du traitement de la part des patients [399]. Or, il a été démontré que 95% des doses de médicaments doivent être prises pour assurer le succès thérapeutique et prévenir l'émergence de souches résistantes [488, 489]. Devant la toxicité des molécules administrées, de même que l'émergence de souches virales résistantes, le besoin de nouvelles classes de molécules est de plus en plus criant.

1.8.3 Les nouvelles classes de médicaments

Le développement d'une nouvelle classe de médicaments, les inhibiteurs de l'entrée virale, a commencé au début des années 90. La molécule T-20 (Fuzéon), créée en 1992, est un inhibiteur de fusion disponible depuis 2003 [490, 491]. Il se donne en combinaison avec les autres agents antirétroviraux. Ce composé est une petite molécule de 36 acides aminés mimant la région HR2 de la gp41 et se fixant sur la région HR1 de celle-ci [492, 493]. Cette liaison empêche le repliement de la gp41 et ainsi la formation du pore de fusion. La sensibilité au T-20 dépend principalement de l'affinité et de l'avidité des récepteurs et

corécepteurs sur les cellules cibles [376, 494]. D'ailleurs, lorsque la fusion se fait rapidement, le T-20 diminue en efficacité. Malheureusement, la prise de ce médicament entraîne également la génération de virus résistants [495-498]. Puisque le T-20 cible une protéine virale sujette aux mutations, l'apparition de souches résistantes n'est guère surprenante. D'autres molécules inhibant l'attachement au CD4 et/ou au corécepteur, présentement en phase de recherche clinique ou préclinique, semblent prometteuses (p.ex. AOP-RANTES, SCHERING-D, TAK-779, AMD3100 et PRO542) [499-502]. Toutes ces molécules font également faces aux mutations de la part du virus. Enfin, la dernière classe d'inhibiteur à voir le jour cible l'intégrase du VIH-1. L'intégrase est une molécule unique aux virus et permet à l'ADN viral de s'intégrer dans l'ADN génomique cellulaire, un phénomène crucial pour la persistance du virus. Le S-1360, le premier de sa génération, est présentement en études cliniques de phase II [503]. D'autres composés de la même classe font également l'objet d'études dont le PL-2500 [504] et les styrylquinolines [505]. Par contre, le VIH-1 parviendra probablement à développer des mutations qui le rendront résistant aux nouveaux agents antirétroviraux. D'ailleurs, une étude a tout récemment confirmé que le VIH-1 développe plusieurs mutations résistantes contre l'inhibiteur de l'intégrase S-1360 [506].

1.8.4 L'immunothérapie

L'immunothérapie demeure une avenue intéressante pour compenser les lacunes de la thérapie combinée. Elle consiste à utiliser diverses molécules immunomodulatrices afin de stimuler la réponse cellulaire et humorale anti-VIH. Cette stratégie a pour but de limiter temporairement la prise d'antirétroviraux, un arrêt permis par une immunité cellulaire retrouvée. L'avenue actuellement explorée consiste en l'emploi de cytokines, en combinaison avec le HAART ou encore comme vaccins thérapeutiques. Les cytokines sont de petites molécules produites par les cellules immunitaires qui stimulent ou inhibent certaines fonctions cellulaires. Il est reconnu que l'infection par le VIH-1 dérègle la production des cytokines par les lymphocytes T, ce qui contribue au déclin des cellules T, à

l'augmentation de la charge virale et à l'incapacité du système immunitaire à contrôler l'infection. Par exemple, la production de cytokines jouant des rôles de facteur de croissance (p.ex. IL-2, IL-12 et IL-15) est fortement réduite, contrairement à la production de composés pro-inflammatoires qui stimulent la réplication virale (TNF α , IL-7, INF γ) [507-511]. Les premières études cliniques en immunothérapie combinant l'IL-2 avec d'autres antirétroviraux ont malheureusement donné des résultats décevants. En effet, bien que cette interleukine soit un facteur de croissance important pour les lymphocytes T, elle n'améliore pas les fonctions immunes et ne protège pas contre la destruction des lymphocytes T CD4⁺ chez les patients sidéens [512]. Les mêmes observations ont été obtenues avec l'IL-12 [513]. D'autres composés ayant des propriétés immunomodulatrices ont été étudiés, comme l'hydroxyurée, la cyclosporine A, la thalidomide et le mycophénolate mofetile (MMF) [514]. Toutefois, leur utilisation comme adjuvant à la trithérapie est encore controversée.

1.9 Conclusion

Le VIH-1 est un pathogène astucieux et redoutable à plusieurs égards. Ce chapitre a passé en revue les caractéristiques biologiques du virus et la façon dont il prend le contrôle de l'organisme. Les stratégies d'évasions virales sont nombreuses et la capacité du virus à infecter les cellules du système immunitaire, lesquelles protègent généralement l'organisme contre les infections microbiennes, demeure la tactique la plus efficace. L'infection productive passe par une série d'étapes dont l'attachement, la fusion, la transcription inverse, l'intégration, la transcription, l'assemblage, le bourgeonnement et la maturation. Une fois à l'intérieur de sa cible, le virus en prend le contrôle et en altère les fonctions biologiques. D'ailleurs, une des conséquences majeures de l'infection consiste en la destruction des lymphocytes T CD4⁺, les principales cibles du virus, lesquelles coordonnent généralement la réponse immunitaire spécifique anti-VIH. Le virus peut aussi persister dans certains types de cellules quiescentes, comme les macrophages et les cellules Tmc. Cette stratégie pose un problème important à son éradication par les antirétroviraux. L'autre force du virus consiste à modifier ses protéines par la création de mutations, empêchant ainsi sa reconnaissance, ou celle des cellules infectées, par le système immunitaire. Cette propriété entraîne également des problèmes de résistance aux médicaments antirétroviraux. La dissection des événements liés à l'infection initiale et aux acteurs cellulaires qui y participent, demeure essentielle à la compréhension de la biologie du virus de même qu'au design de stratégies antirétrovirales complémentaires, ciblant des interactions cellulaires non sujettes aux mutations.

Chapitre II. L'interaction entre l'ICAM-1 et le LFA-1

Sommaire du chapitre

L'adhésion cellulaire, un phénomène ubiquitaire, participe à une multitude de fonctions biologiques. Elle se subdivise en plusieurs étapes successives dont la phase d'approche, l'interaction primaire et la consolidation. Différentes molécules participent à ces événements, notamment les intégrines et leurs ligands. Ces molécules, très dynamiques, influencent une variété de phénomènes biologiques incluant la croissance cellulaire, le cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose, la survie et la motilité. L'intégrine LFA-1 et son ligand, l'ICAM-1, interviennent notamment dans l'inflammation et la réponse immunitaire. Dans les cellules au repos, le LFA-1 a peu d'affinité pour la molécule ICAM-1. Les modifications dans la conformation (affinité) de l'intégrine de même que son oligomérisation (avidité) régulent son interaction avec l'ICAM-1. Par l'intermédiaire de protéines de signalisation, de même que par le remaniement du cytosquelette d'actine, les signaux intracellulaires (inside-out), et extracellulaires (outside-in) contribuent à activer le LFA-1. Généralement reconnue pour son rôle bénéfique dans la réponse immunitaire, l'interaction entre le LFA-1 et l'ICAM-1 peut avoir des répercussions néfastes. En effet, la suractivation de l'intégrine contribue, à divers degrés, aux maladies inflammatoires et/ou auto-immunes, telles que l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis et le lupus érythémateux. La connaissance des événements régulant l'interaction entre les deux molécules est fondamentale pour le développement d'inhibiteurs spécifiques pouvant mener ultimement à la découverte d'agents thérapeutiques efficaces. Élucider les événements de signalisation déclenchés par l'engagement du LFA-1 s'avère tout aussi intéressant pour comprendre l'orchestration des réponses innées et acquises. Ce chapitre focalise sur les mécanismes de régulation de l'intégrine LFA-1 et sur la signalisation déclenchée par la liaison de l'ICAM-1, deux aspects nécessaires à la compréhension des études subséquentes présentées aux chapitres IV, V et VI de cet essai.

2.1 L'adhésion

L'adhésion constitue un processus cellulaire nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme [515]. La division et la différenciation cellulaire, l'implantation de l'embryon, la migration des cellules et l'activation du système immunitaire constituent quelques exemples de processus biologiques nécessitant des interactions adhésives. Différentes pathologies, comme les cancers et la formation de métastases, les thromboses et l'infertilité, proviennent d'anomalies dans les processus d'adhésion. L'implantation d'un agent pathogène dans un tissu spécifique et/ou de l'infection des cellules cibles requièrent également des interactions adhésives [516-519].

L'adhésion repose sur des interactions entre des molécules spécifiques. Ces molécules se classifient en cinq grandes familles, dont la superfamille des immunoglobulines (p.ex. ICAM-1, PECAM-1 et CD2), les intégrines (p.ex. LFA-1, MAC-1 et VLA-4), les sélectines (p.ex. CD62L, CD62P et CD62E), les mucines (CD43, PSGL-1) et les cadhérines [128]. La liaison initiale constitue la première étape critique de l'adhérence cellulaire. La durée de cette interaction dépend de la nature de la liaison et des forces exercées par les deux surfaces. La liaison peut se rompre en absence d'interaction intercellulaire supplémentaire et en présence de forces extérieures, d'agitation brownienne ou d'une rétraction spontanée d'un lamellipode (excroissance cellulaire nécessaire à la migration des cellules). Lorsqu'une deuxième liaison se forme, l'attachement se renforce et s'étend progressivement afin de former d'autres interactions. La densité des molécules participant à l'adhésion, leur diffusion dans la membrane plasmique, leur longueur et leur flexibilité influencent toutes les étapes de l'adhésion [520-522]. L'autre étape critique est la consolidation des interactions. Celle-ci se réalise par la déformation des membranes cellulaires permettant un accollement des deux surfaces (une distance inférieure à quelques dizaines de nm), la réorganisation des molécules dans la zone de contact et une concentration de microfilaments d'actine nécessaire à l'augmentation de la rigidité membranaire locale. L'expression, l'affinité et l'avidité régulent étroitement le processus

adhésif. Le désengagement s'amorce par la protéolyse des récepteurs, leur recyclage ou par la dépolymérisation du cytosquelette d'actine affectant la rigidité membranaire à la zone de contact [523].

2.2 L'intégrine LFA-1

Le bon fonctionnement du système immunitaire repose en partie sur l'intégrine LFA-1 (CD11a/CD18). Celle-ci participe à l'adhésion intercellulaire et la signalisation intracellulaire [524-530].

2.2.1 La sous-famille des β_2 -intégrines

Les intégrines sont formées de deux sous-unités, α et β , liées de façon non covalente. La chaîne α lie le ligand, alors que la chaîne β sert à la transmission de l'information dans la cellule. Il existe chez l'humain 18 types de chaînes α et 8 de chaînes β pouvant s'associer entre elles et former 24 hétérodimères [531-533]. Les sous-familles se divisent sur la base des chaînes β . Celle des β_2 -intégrines (CD18) s'exprime uniquement à la surface des leucocytes. Quatre types de chaînes α peuvent s'associer avec le CD18 : le CD11a (α_L), le CD11b (α_M), le CD11c (α_X) et le CD11d (α_D) [534, 535]. L'intégrine CD11a/CD18 (LFA-1) s'exprime sur tous les leucocytes (lymphoïdes et myéloïdes) [536], alors que l'intégrine CD11b/CD18 se trouve sur les macrophages et les leucocytes polymorphonucléaires [537]. Le CD11c/CD18 et le CD11d/CD18 sont deux intégrines exposées principalement sur les monocytes, les macrophages tissulaires et les éosinophiles [538, 539]. Contrairement à l'intégrine LFA-1, toujours exprimée en surface, les intégrines CD11b/CD18 et CD11c/CD18 sont emmagasinées principalement à l'intérieur de granules, lesquelles migrent à la membrane plasmique des cellules myéloïdes lors de leur activation

cellulaire [540-542]. Les chaînes α et β sont produites séparément et s'assemblent dans le réticulum endoplasmique. Les gènes des chaînes α (CD11a, b et c) se situent dans le chromosome 16 [543], alors que le gène codant pour le CD18 se localise dans le chromosome 21 [543, 544]. Chez les individus atteints du syndrome de Down (trisomie 21), les leucocytes expriment une quantité plus élevée de β_2 -intégrines, l'adhésion étant donc plus forte chez ces personnes. Ces individus souffrent souvent d'infections répétées, suggérant qu'une adhésion excessive est autant dommageable qu'une adhésion déficiente [545].

2.2.2 Le principal ligand du LFA-1, l'ICAM-1

Les principaux ligands du LFA-1 sont les molécules d'adhésion ICAM-1(CD54), ICAM-2 (CD102), ICAM-3, 4 et 5 puis JAM-1 (de l'anglais *Junctional Adhesion Molecule 1*) [546]. Puisque les études effectuées dans le cadre de ce doctorat ciblaient uniquement l'interaction entre le LFA-1 et l'ICAM-1, je ne parlerai que des caractéristiques de ce ligand.

L'ICAM-1 (CD54) est une protéine membranaire hautement glycosylée de 80 à 114 kDa (selon le degré de glycosylation), appartenant à la superfamille des immunoglobulines [547-550]. Son rôle principal consiste en l'induction d'une interaction menant à l'adhérence de deux cellules. Son gène se trouve dans le chromosome 19 [551].

2.2.2.1 Expression

Le degré d'expression de l'ICAM-1, présent sur tous les leucocytes de même que les cellules endothéliales [535], varie selon l'état d'activation des cellules. Une multitude de signaux et de facteurs de transcription, notamment le NF- κ B, les JAK/STAT, l'INF γ , l'AP-1, les MAPK et les PKC régulent sa synthèse [552-554]. L'adhésion médiée par l'ICAM-1 est également régulée par son clivage à la surface des cellules endothéliales. Ce processus est médiée par des protéases et entraîne la présence d'ICAM-1 soluble (ICAM-1s) dans la circulation sanguine. Ce phénomène régule à la baisse la réponse immunitaire et diminue la migration des leucocytes vers les tissus périphériques. Selon certaines données publiées récemment, les résidus tyrosines Y474 et Y485, localisés dans la queue intracytoplasmique de l'ICAM-1, de même que diverses voies de signalisation sont responsables de son clivage [555].

2.2.2.2 Structure

L'ICAM-1 se compose de cinq domaines extracellulaires, un domaine transmembranaire et une petite queue intracytoplasmique de 28 acides aminés [556]. L'interaction avec le LFA-1 se fait par son domaine I, situé en N-terminal, particulièrement grâce aux acides aminés E34, K39, M64, Y66, N68 et Q73 [557, 558]. L'ICAM-1 interagit également avec l'intégrine Mac-1 (CD11b/CD18), le fibrinogène, les rhinovirus et les érythrocytes infectés par le parasite *Plasmodium falciparum*, mais avec des régions différentes de celles liant le LFA-1 [559-563]. Plusieurs études démontrent que l'ICAM-1 se retrouve sous forme de dimère à la surface des cellules humaines [564, 565]. Selon la topologie des dimères et des analyses de cristallographie, les équipes du Dr T. Springer et du Dr J.H. Wang ont démontré que la dimérisation se fait par les domaines 1, 4 et 5, de même que la région transmembranaire de l'ICAM-1 [566, 567]. Les premières études sur la capacité des dimères à lier le LFA-1 suggéraient qu'effectivement, leur présence augmentent l'avidité

pour l'intégrine [564, 565]. Par contre, ces études ont été effectuées avec la forme soluble de l'ICAM-1 (en monomère ou en dimère). Par des études de mutagenèse dirigée et/ou l'expression de l'ICAM-1 monomérique dans les cellules (ancré à la membrane avec un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI)), d'autres ont démontré qu'à densité égale, les monomères et les dimères ont des capacités similaires à lier le LFA-1 [567]. La dimérisation de l'ICAM-1 jouerait plutôt un rôle important lors de la signalisation intracellulaire chez les CPA [568, 569].

2.2.2.3 Signalisation et interactions intermoléculaires

L'ICAM-1 est une molécule de co-stimulation pour les cellules présentatrices d'antigènes. Son engagement augmente la prolifération cellulaire et la phosphorylation des protéines ERK et pp60^{src} [570, 571]. Or, sa queue intracytoplasmique ne contient aucun motif consensus lié à l'activité des protéines kinases (ITAM) (de l'anglais *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) ni de motif SH (de l'anglais *Src Homology domain*) liant les protéines phosphorylées. Par contre, elle contient un motif IKKYRLQ lequel entraîne la liaison de la phosphatase SHP-2 (de l'anglais *Src Homology domain 2 (SH2)-containing Phosphatase-2*) après sa phosphorylation tout comme le motif consensus ITIM (de l'anglais *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*) I/VxYxxL/V [572]. On estime que le pontage des molécules ICAM-1 enclenche une cascade de signalisation via le recrutement de la phosphatase SHP-2. D'autres études sont cependant nécessaires afin de mieux caractériser les phénomènes en amont et en aval de cette interaction. La queue intracytoplasmique de l'ICAM-1 interagit aussi avec des protéines associées au cytosquelette d'actine, notamment l' α -actinine, l'eitrine et l'actine [573, 574]. Ces interactions participent à l'incorporation de la molécule d'adhésion au sein de l'enveloppe du VIH-1, tel que mentionné dans le chapitre précédent.

2.2.2.4 Désordres immunologiques associés à l'ICAM-1

Les dommages dans la structure de la molécule ICAM-1 ou encore des anomalies de son expression entraînent certains désordres immunologiques [575], dont les mélanomes, les tumeurs lymphoïdes et myéloïdes, les désordres neurologiques, le rejet d'organes transplantés, l'ischémie, l'artériosclérose et l'asthme allergique [556, 576, 577].

2.2.3 Les caractéristiques physiques du LFA-1

L'intégrine LFA-1 se compose des chaînes α L (CD11a) et β ₂ (CD18), contenant chacune des particularités nécessaires à la liaison du ligand ICAM-1.

2.2.3.1 Le CD11a (α L)

La chaîne α du LFA-1 est une protéine de 180 kDa, composée d'un domaine extracellulaire contenant plusieurs sites de glycosylation [578], d'une région transmembranaire et d'un court domaine intracytoplasmique. La portion extracellulaire contient sept régions homologues et trois sites consensus (DXSXS séparé par une paire de résidus oxygénés) liant des cations divalents comme le magnésium (Mg^{2+}) ou le manganèse (Mn^{2+}) [579]. Cette région se nomme MIDAS (de l'anglais *Metal Ion Dependent Adhesion Site*). Son analyse par cristallographie a démontré que la présence de cations ne modifie pas la structure de la protéine [580]. Par des études de mutations dirigées, il a été confirmé que la région MIDAS intervient lors de la liaison du ligand en présence de Mg^{2+} ou de Mn^{2+} [581-583]. Cette région lie les résidus chargés négativement sur le ligand. Les sites requis pour la liaison de l'ICAM-1 sont le domaine I et la région MIDAS [584]. Le domaine I se situe entre les régions répétées deux et trois de la portion extracellulaire [585-588]. La majorité

des anticorps bloquant l'interaction entre le LFA-1 et l'ICAM-1 sont dirigés contre le domaine I du CD11a [589, 590]. Même si beaucoup d'entre eux maintiennent la conformation de haute affinité, ils obstruent le site de liaison. La région intracytoplasmique de la chaîne α L contient un motif hautement conservé parmi les intégrines, la séquence KxGFFKR. Ce site consensus est important pour la stabilité de l'hétérodimère (CD11a/CD18) de même que pour le maintien de l'intégrine sous une forme inactive [591-594]. Ce motif lie aussi la calréticuline, une protéine liant le calcium. Plusieurs études démontrent que cette interaction participe à l'adhésion et à la signalisation médiées par les intégrines [595-597]. D'autres études prouvent que les résidus localisés en aval du motif KxGFFKR sont indispensables à l'adhésion [598, 599]. Notamment, la liaison de la GTPase Rap-1, une protéine activée lors de la stimulation antigénique, en présence de chimiokines SDF-1 ou d'agent mitogénique tel le PMA (phorbol myristate acétate), requiert les lysines 1097 et 1099 [600-602]. L'association de la chaîne α L avec la protéine Rap-1 augmente l'affinité de l'intégrine pour son ligand. Chez les cellules au repos, la forme inactive prédomine et ce phénomène est engendré en partie par la liaison de l'intégrine avec le cytosquelette d'actine. La queue intracytoplasmique du CD11a n'est toutefois pas nécessaire à l'interaction de l'intégrine avec le cytosquelette [591]. Cette interaction se fait principalement par le CD18.

2.2.3.2 Le CD18 (β_2)

Le chaîne β_2 de l'intégrine LFA-1 est une protéine de 95 kDa contenant un domaine extracellulaire hautement glycosylé, une portion transmembranaire et une courte région intracytoplasmique. Le domaine I de la chaîne β_2 contient également un site MIDAS qui contribue à la liaison de l'ICAM-1 [603-606]. De plus, la portion extracellulaire du CD18 comprend une région riche en cystéine (CRR) (de l'anglais *Cystein Rich Region*) (56 résidus) localisée près de la membrane plasmique (du côté extracellulaire). Le rôle de cette région a été confirmé par des analyses faites avec une intégrine chimère, composée du

CD11a sauvage et d'un CD18 contenant le CRR de la chaîne β_1 . Les résultats ont montré que cette région ne joue aucun rôle dans l'interaction entre les deux chaînes, mais qu'en son absence, le LFA-1 est activé de façon constitutive [607]. Par une méthodologie similaire, ils ont également démontré que l'interaction entre les deux chaînes requiert la région transmembranaire du CD18, laquelle participe également au maintien de la conformation inactive du LFA-1 dans les cellules au repos [608]. Beaucoup d'études de mutagenèses dirigées ont permis de démontrer le rôle indispensable de la queue intracytoplasmique de la chaîne β_2 dans l'activation de l'intégrine [609, 610]. Les résidus F754, F766 et T758-760 interviennent lors de la liaison de la molécule ICAM-1. Les trois thréonines (T758-760) jouent un rôle particulièrement important lors des événements en aval de la liaison du ligand, dont la réorganisation du cytosquelette d'actine et la migration. Elles n'ont toutefois aucune influence lors des changements conformationnels de l'intégrine [592]. La liaison du CD18 au cytosquelette, la rétention des intégrines non complexées, l'assemblage des hétérodimères et leur expression à la surface de la cellule dépendent des résidus R733 et K742 [591]. L'influx de calcium intracellulaire généré par l'engagement du LFA-1 semble médié par le motif NPXF positionné en C-terminal [611].

2.2.4 Les mécanismes de régulation

2.2.4.1 La régulation de l'expression

Seuls les leucocytes expriment les chaînes α_L et β_2 . Leur expression est régulé selon le type cellulaire, l'activation des cellules, leur état de différenciation et leur âge [133, 612]. Le gène ITGAL encode la protéine CD11a [613]. Son promoteur contient des sites consensus pour la liaison des facteurs de transcription SP1 et PU.1 [614-616]. La transfection de ce promoteur (fusionné avec un gène rapporteur) dans différentes lignées cellulaires a permis de démontrer que la protéine s'exprime uniquement dans les cellules

hématopoïétiques. L'expression différentielle du CD11a dépend de la méthylation du gène ITGAL et de la structure de la chromatine (dans les lymphocytes T, le gène reste hypométhylé, alors que dans les fibroblastes il demeure hyperméthylé) [617]. D'ailleurs chez les patients atteints de lupus érythémateux, le gène ITGAL reste toujours dans un état hypométhylé, ce qui contribue à la surexpression du LFA-1 et à l'auto-immunité [618]. Ce sont les facteurs de transcription SP1, PU.1 et GABP qui influencent l'expression du CD18 [619-623]. L'activation des cellules immunitaires entraîne généralement une augmentation de l'expression des chaînes α L et β_2 afin que les cellules répondent rapidement à l'invasion et orchestrent la contre-attaque. Par ailleurs, les changements de conformation (affinité) et de densité (avidité) régulent l'activation de l'intégrine LFA-1.

2.2.4.2 L'affinité

L'affinité se définit comme étant la force de l'interaction entre l'intégrine et son ligand. Les intégrines ont la capacité de moduler leur affinité par des modifications de conformation. Jusqu'à tout récemment, on croyait que les intégrines, y compris le LFA-1, prenaient deux conformations différentes, soit la conformation « fermée », représentant l'état de faible affinité, et la conformation « ouverte », un état de haute affinité [624] (Figure 17A). Les études sur la structure tridimensionnelle des intégrines suggéraient qu'à l'état de repos, la portion extracellulaire était repliée avec la « tête » de l'intégrine près de la membrane. Suivant l'activation, les portions juxta-membranaires des sous-unités se déplaçaient, entraînant le redressement de la « tête » et l'exposition des épitopes nécessaires à la liaison du ligand. Or en 2003, l'équipe du Dr T.A. Springer a démontré que les intégrines peuvent prendre trois conformations différentes : celle de faible (K_d 1 mM), d'intermédiaire (K_d 10 μ M) et de haute affinité (K_d 100 nM) [625]. Ces trois conformations sont illustrées à la figure 17B [626]. Bien que les configurations intermédiaires et de haute affinité du LFA-1 interagissent fortement avec l'ICAM-1, seule la dernière procure une interaction stable. La conformation de haute affinité s'obtient lors de la séparation des chaînes α L et β_2 . Par des

analyses de FRET (de l'anglais *Fluorescence Resonance Energy transfer*), l'équipe du Dr T.A. Springer a découvert que la liaison de l'ICAM-1 entraîne un éloignement des queues intracytoplasmiques du LFA-1 (diminution du transfert d'énergie), un processus élémentaire pour la signalisation *outside-in* [627].

Les signaux *inside-out*, la liaison de l'ICAM-1 (*outside-in*), la présence de Mg^{2+} ou Mn^{2+} , le PMA ou encore d'anticorps agonistes régulent l'affinité du LFA-1 pour ICAM-1 [628] [627, 629-631]. Il n'y a cependant aucune preuve confirmant que les signaux *inside-out*, notamment ceux engagés par les chimiokines ou la présentation antigénique, ont la capacité de générer la conformation de haute affinité *in vivo*. Ces signaux engendrent probablement une configuration intermédiaire qui permet la liaison du ligand et entraîne subséquemment la transformation successive de plusieurs molécules de LFA-1 dans un état de haute affinité [628]. Le Dr T.A. Springer suggère que la conformation intermédiaire est suffisante pour l'adhésion. La stabilisation de l'interaction est coordonnée par l'oligomérisation des intégrines et la formation de l'état de haute affinité, deux processus engendrés par la signalisation *outside-in* (provenant de la liaison du ligand). Cette hypothèse a d'ailleurs été confirmée à la fin de l'année 2004 [631].

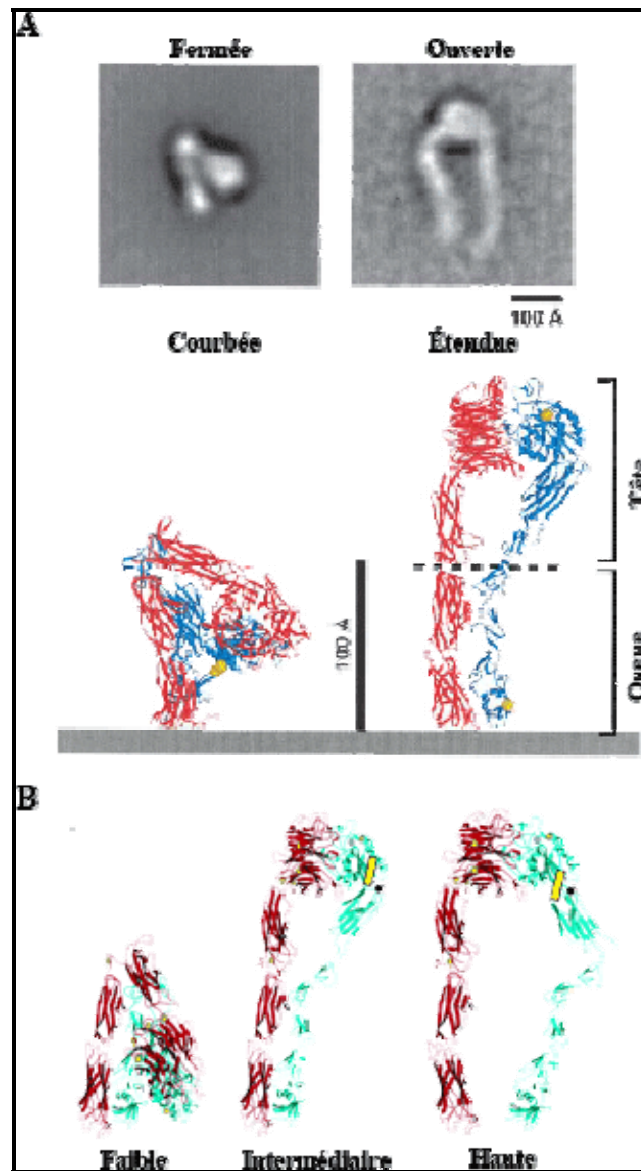


Figure 17. Les différentes conformations prises par les intégrines. A) les conformations « fermée » et « ouverte » des intégrines par la présence respective de Ca^{2+} et de Mn^{2+} . **B)** Les conformations entraînant une faible, une moyenne et une haute affinité pour leur ligand (adaptée de [626]).

Certains anticorps, dont le MEM83, ont la capacité d'augmenter l'affinité du LFA-1 pour l'ICAM-1. Le mécanisme d'action de cet anticorps a d'ailleurs récemment été découvert par l'équipe du Dr T.A. Springer. Leurs études démontrent que l'anticorps se lie à un endroit opposé et éloigné du site de liaison de l'ICAM-1 (épitopes D182, E218). L'effet

agoniste du MEM83 semble dépendre de sa capacité à modifier l'orientation du domaine I, changeant indirectement la conformation de l'intégrine en une forme de haute affinité [589]. Les cations divalents figent également la conformation « ouverte » de l'intégrine, laquelle est détectable en présence de cations divalents dans la région MIDAS, particulièrement avec le Mg^{2+} , le Co^{2+} , le Zn^{2+} , le Mn^{2+} et le Ni^{2+} [624, 631,632]. Par contre, le Ca^{2+} a l'effet contraire et se lie à une région nommée AMIDAS accolée au site MIDAS [606]. Cet ion est un régulateur négatif des intégrines et maintient la conformation « fermée » [626]. Le PMA a aussi la capacité de moduler l'affinité de LFA-1. En effet, il a dernièrement été confirmé qu'en plus de déclencher sa diffusion latérale dans la membrane [633], le PMA induit la conformation d'affinité intermédiaire de l'intégrine [634].

2.2.4.3 L'avidité

Induite par l'oligomérisation de plusieurs intégrines, l'avidité permet d'augmenter la force d'adhésion. Ce phénomène élève la probabilité de rencontre entre les intégrines et leurs ligands. L'augmentation de l'avidité succède à la génération de signaux *outside-in* (par la liaison du ligand) et/ou des signaux *inside-out*, lesquels entraînent la réorganisation du cytosquelette d'actine et le recrutement de diverses protéines adaptatrices (protéines sans activité enzymatique servant à rapprocher deux protéines afin qu'elles interagissent entre elles) de même que des kinases vers les queues cytoplasmiques des chaînes αL et β_2 . Plusieurs résultats expérimentaux démontrent que l'oligomérisation des molécules de LFA-1 est une condition préalable à la liaison avec son ligand [635-639]. L'oligomérisation des molécules de LFA-1 (*clustering*) s'observe suivant la stimulation via le RCT (récepteur des cellules T) ou un traitement avec un ester de phorbol ou encore un ionophore du calcium [640]. La présence de composés qui empêchent la réorganisation du cytosquelette d'actine (p.ex. cytochalasine B ou D, jasplakinolide) inhibe l'activation du LFA-1 induite par un de ces agonistes [627, 628, 640-644]. De façon similaire, la présence de composés inhibant l'activité de la calpaïne (p.ex. la calpeptine), une protéase essentielle à la diffusion latérale

des intégrines dans la membrane plasmique, empêche l'adhésion entre le LFA-1 et l'ICAM-1 [629, 640]. Or, l'équipe du Dr. T.A. Springer a récemment prouvé que l'oligomérisation des intégrines est un événement qui survient en aval de la liaison avec l'ICAM-1. Selon eux, les travaux précédents ne tenaient pas compte de l'adhésion homotypique (entre deux ou plusieurs cellules) coordonnée par l'ICAM-1 et le LFA-1 lors de leurs essais. Ainsi, les amas de LFA-1 visualisés sur leurs cellules (en absence de substrat) proviendraient d'une adhésion homotypique antérieure (entre deux ou plusieurs cellules) suite à l'activation cellulaire. Les travaux présentés par Minsoo Kim et collaborateurs sont très intéressants puisqu'ils démontrent pour la première fois que la liaison d'ICAM-1 monomérique et/ou multimérique (sous forme soluble) entraîne la formation de petits amas de LFA-1 (environ 10 \AA) et que l'adhésion intercellulaire médiée par l'ICAM-1 induit à la fois la génération de petits et de gros amas (> 200 nm) [631]. Ce phénomène, dépendant de la réorganisation de cytosquelette d'actine et de la diffusion latérale des intégrines dans la membrane plasmique, a pour but de renforcer l'adhésion.

2.2.4.4 Le remaniement du cytosquelette d'actine

2.2.4.4.1 Le cytosquelette

Le cytosquelette (Figure 18) forme un réseau de filaments responsable de la morphologie des cellules, des mouvements cellulaires et intracellulaires et de l'adhérence. Il est constitué de trois types de filaments : les microfilaments d'actine (7 à 9 nm de diamètre), les microtubules (25 nm de diamètre) et les filaments intermédiaires (10 nm de diamètre) [645].

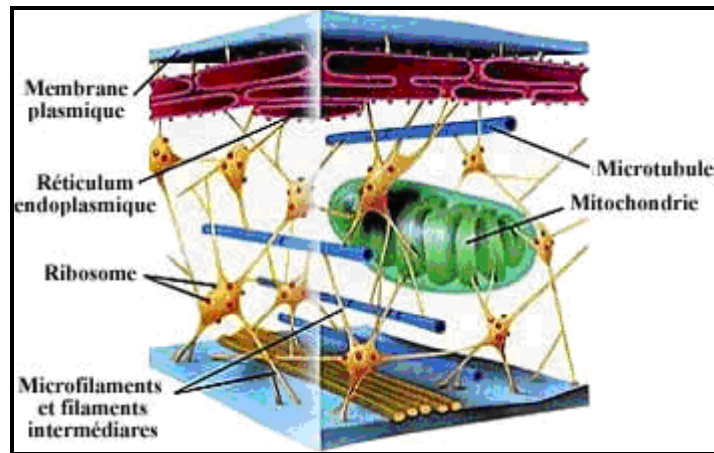


Figure 18. Le cytosquelette (tirée de[646])

2.2.4.4.2 *Les microfilaments d'actine*

L'actine, une molécule de 42 kDa, est la plus abondante des protéines cellulaires (représentant de 1 à 10% des protéines totales d'une cellule). Elle se trouve dans le cytoplasme sous la forme de monomère (actine G) ou de polymère (actine F). Les microfilaments se composent de polymères d'actine contenant une extrémité polaire à croissance rapide (extrémité +) et une extrémité à croissance lente (extrémité -). À l'intérieur de la cellule, l'actine F est organisée de trois façons : en faisceaux parallèles (dans les microvillosités), en réseaux formant des mailles (dans les lamellipodes et les réseaux sous-membranaires (actine corticale)) et en faisceaux contractiles (dans les fibres de tension, les ceintures d'adhérence, les sarcomères et les anneaux contractiles mitotiques) (Figure 19).

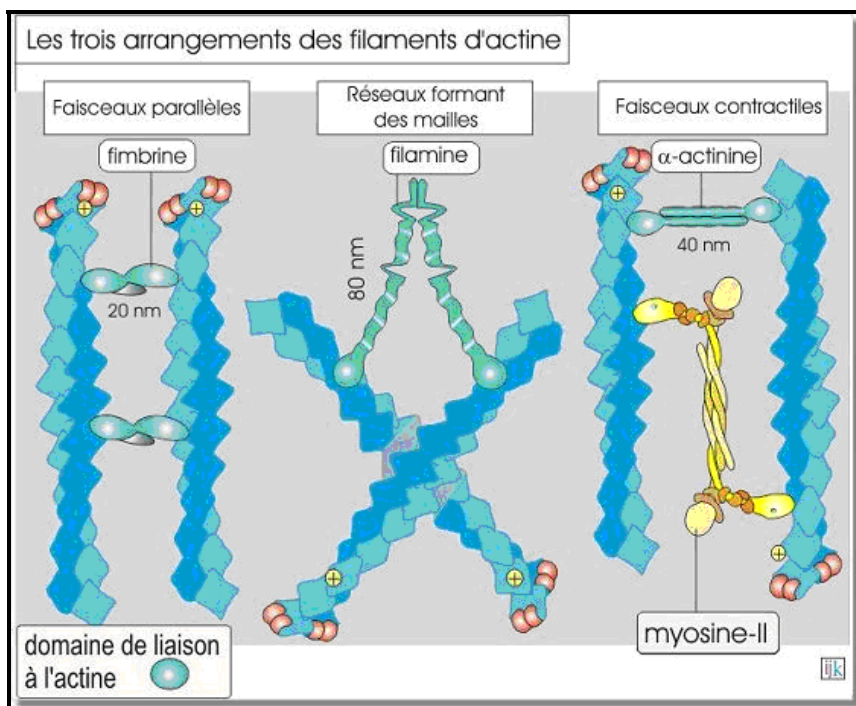


Figure 19. Organisation du cytosquelette d'actine dans la cellule (tirée de [647])

2.2.4.4.3 La polymérisation et la dépolymérisation

La polymérisation de l'actine (figure 20) est un processus énergétique nécessitant l'ATP. Brièvement, l'actine G, couplée à l'ATP s'ajoute à l'extrémité + du microfilament à l'aide du complexe ARP2/ARP3 (de l'anglais *Actin-Related Protein*) (lié à l'extrémité -). La présence du complexe favorise la formation d'une amorce composée de trois molécules d'actine (site de nucléation pour la formation de longs polymères). Lorsque l'actine se polymérise, l'ATP s'hydrolyse, laissant l'ADP à l'intérieur du polymère. Ce dernier se stabilise par la présence d'une protéine de coiffage (nommée CapZ) à l'extrémité +, laquelle prévient la perte de molécules d'actine liées à l'ADP. La polymérisation de l'actine reste un processus réversible. La dépolymérisation est catalysée par la cofiline et a lieu à l'extrémité -, où les molécules d'actine liant l'ADP se retirent. Dans la cellule au repos, les deux formes persistent en équilibre dynamique, c'est-à-dire qu'il y a continuellement un ajout et une perte de molécules d'actine sur le filament. Le calcium, le pH, les phospholipides et les petites protéines G (p.ex. Rho, Rac) régulent étroitement le

remaniement des polymères. Ce processus dépend de protéines effectrices (p.ex. cofiline, CapZ, gelsoline et profiline), activant la dépolymérisation ou la polymérisation, et de protéases (calpaïnes), clivant les points d'ancrages et les réseaux [648-651]. Lorsque la cellule reçoit un signal de polymérisation, l'actine s'ajoute plus rapidement aux polymères (par l'inhibition de la cofiline ou l'activation du complexe ARP2/ARP3), un processus qui favorise l'élongation des polymères. La cellule peut également démanteler les microfilaments par l'action de la gelsoline et/ou la cofiline (des protéines qui dissocient les polymères) et briser les points focaux d'adhérence par l'action des calpaïnes (protéases clivant notamment la taline et l' α -actinine) (revue dans [652]). Ces phénomènes peuvent être inhibés par divers composés, dont la cytochalasine ou la latrunculine (préviennent la polymérisation) et la jasplakinolide (préviennent la dépolymérisation, stabilise les polymères et augmente la polymérisation) [653].

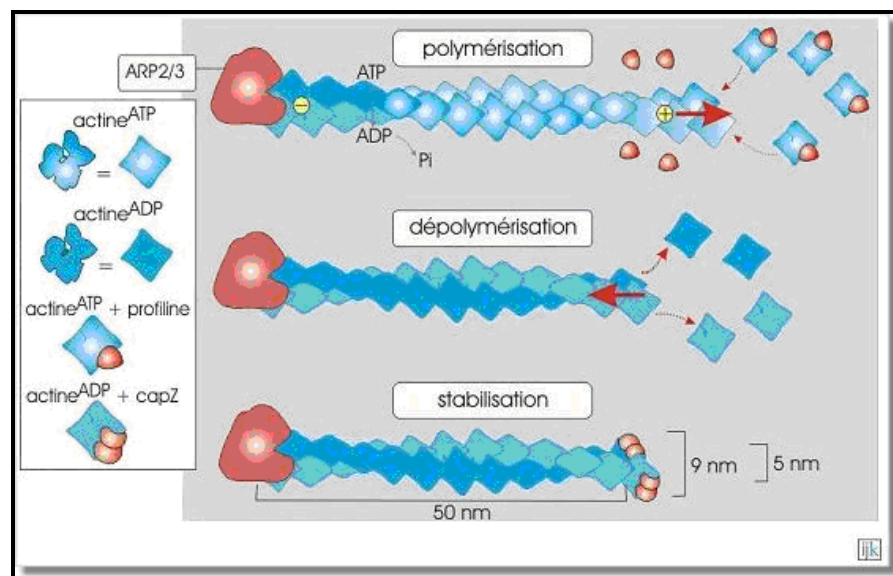


Figure 20. Remaniement du cytosquelette d'actine (tirée de [647])

2.2.4.4.4 Régulation de l'avidité du LFA-1

La réorganisation du cytosquelette d'actine intervient dans plusieurs fonctions biologiques, dont l'adhérence, la signalisation, l'endocytose, la division cellulaire et la migration des

cellules. L'élément périphérique du cytosquelette d'actine (squelette membranaire), localisé sous la membrane plasmique, participe au confinement temporel de molécules transmembranaires et régule la diffusion des phospholipides et des protéines membranaires [654, 655]. Le squelette membranaire régule également la mise en place de plateformes de signalisation (radeaux lipides) et la stabilisation de ces complexes à la membrane plasmique. Le remaniement du réseau d'actine sous-membranaire participe étroitement à l'activation des intégrines, dont le LFA-1. Dans les cellules au repos, les molécules du LFA-1 sont immobilisées dans la membrane plasmique par leur association avec le squelette membranaire. Suite à l'activation cellulaire la cellule remanie son cytosquelette d'actine, libérant ainsi les intégrines de leur confinement. L'engagement des molécules d'ICAM-1 avec les intégrines mobiles entraîne la formation de petit ou de gros amas de LFA-1, un phénomène qui favorise la consolidation de l'adhésion.

2.2.4.5 La phosphorylation de la chaîne β_2

La phosphorylation des protéines (sur les résidus sérine, thréonine ou tyrosine) est un mécanisme généralement employé pour réguler leur fonction. Elle influence la conformation protéique, le recyclage, l'activité enzymatique et/ou les partenariats entre les protéines, lesquels sont nécessaires à la transduction de signaux. Or, la queue intracytoplasmique du CD18 possède des résidus sérines et thréonines sujets à la phosphorylation et régule l'activité adhésive de l'intégrine. L'activation des cellules avec du PMA, de la chimiokine Rantes ou du fMLP (N-formyl-Met-Leu-Phe) entraîne la phosphorylation des sérines 745 et 756, localisées dans la queue intracytoplasmique du CD18 [540, 656-659]. Cette phosphorylation ne participe pas à l'adhésion d'ICAM-1, mais module les signaux *outside-in* déclenchés par l'engagement de l'intégrine [660]. L'ajout de phosphates au triplet de thréonines (758 à 760) constitue par contre un phénomène très important pour l'adhésion d'ICAM-1 et la liaison de l'intégrine avec le cytosquelette d'actine [661]. En effet, deux protéines associées au cytosquelette, la taline et la filamine,

interagissent avec les sous-unités β_2 une fois qu'elles sont phosphorylées. Cette modification post-traductionnelle influence également les événements en aval de la liaison du ligand, comme l'étalement des cellules lors du processus de migration [592]. Tous ces événements de phosphorylation (sérine/thréonine) dépendent de l'activation des PKC [662]. La queue intracytoplasmique du CD18 possède également un résidu tyrosine (Y735) qui peut être phosphorylé. Des études antérieures ont démontré que le CD18 peut subir une phosphorylation sur ce résidu à la suite de l'attachement des neutrophiles sur le collagène [663] ou lorsque les cellules NK sont incubées avec de l'interleukine 2 [664]. Il a récemment été démontré que l'internalisation de l'intégrine LFA-1 se fait grâce au résidu tyrosine, présent à l'intérieur de la séquence YRRF (un motif similaire à celui du signal d'endocytose (YXX Φ où Φ est un gros acide aminé hydrophobe)) [599, 610]. Ce processus de régulation est nécessaire au détachement, un phénomène important lors de la migration cellulaire. Cependant, aucune étude ne fait mention du rôle de la phosphorylation dans le recyclage de l'intégrine. Il est par contre bien établi que la phosphorylation du motif d'endocytose, dans la queue intracytoplasmique de la molécule de costimulation CTLA-4, inhibe l'internalisation médiée par le complexe AP-2 et les puits de clathrines [665, 666]. Selon le modèle de l'activation du LFA-1 élaboré par le Dr M.L. Dustin, l'intégrine n'est soumise au recyclage que lorsqu'elle se trouve dans un état de faible avidité et sous une conformation « fermée » [628]. L'internalisation du LFA-1 intervient dans le recyclage des intégrines libres dans les cellules au repos, le recrutement rapide du LFA-1 au site de contact et le déplacement des intégrines d'une extrémité à une autre lors de la migration cellulaire. D'autres études seraient toutefois nécessaires pour éclaircir le rôle de la phosphorylation du résidu tyrosine dans la régulation du LFA-1.

2.2.4.6 Les interactions moléculaires

Les interactions intermoléculaires influencent fortement l'activité du LFA-1. Ce dernier interagit avec différentes protéines ayant des fonctions diverses : les protéines associées au

cytosquelette d'actine et les protéines de signalisation. Certaines de ces interactions sont cruciales pour les fonctions d'adhésion et de signalisation de l'intégrine (illustrées à la figure 22). Le tableau 4 résume ces associations. La liaison de la taline (protéine adaptatrice de 250 kDa liant des protéines membranaires avec le cytosquelette d'actine) avec le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) augmente considérablement son interaction avec le CD18 [680]. Composée d'une tête de 47 kDa, la taline contient à la fois le site de liaison avec l'intégrine et l'actine à l'intérieur de son domaine FERM (un domaine homologue à celui des protéines FAK, ezrine, radixine et moesine). Cette région précède une séquence reconnue par la protéase calpaïne II (une protéase dépendante du calcium) et une région C-terminale enrichie en acides aminés de 190 kDa [681]. Cette dernière contient aussi plusieurs sites interagissant avec l'actine et la vinculine (une autre protéine associée avec le cytosquelette d'actine). Par conséquent, la taline permet la connexion entre une protéine transmembranaire et le cytosquelette d'actine. La taline participe vigoureusement à l'activation du LFA-1 [643, 682]. En plus de relier l'intégrine au cytosquelette, elle régule son affinité. En effet, la liaison de son domaine N-terminal entraîne la séparation des chaînes α L et β ₂, un processus nécessaire au changement d'affinité [627]. Par ailleurs, il a été démontré que la queue acidifiée de la taline est sensible à la protéolyse par la calpaïne II (une protéase dépendante du calcium) [683] et que son clivage entraîne l'activation de l'intégrine [640, 641].

Tableau 4 Interactions intermoléculaires médiées par les chaînes α L et β ₂

PROTÉINES CYTOPLASMIQUES	SITE D'INTERACTION	RÉFÉRENCES
ACTININE	CD18 (736-746)	[667, 668]
FILAMINE	CD18 (724-747)	[667, 669]
TALINE	CD18 (MEMBRANE DISTALE)	[668, 670]
ILK	CD18	[671]
JAB-1	CD18	[672]
FAK	CD18 (MEMBRANE PROXIMALE)	[673]
CYTOHÉSINE 1	CD18 (723-725)	[674, 675]
RAP-1	CD11A (1097, 1099)	[599]
RAPL	N.D.	[676]
CALRÉTICULINE	CD11A (KXGFFKR)	[595, 597]
SYK/ZAP70	CD18 (NXXF)	[677]
PROTÉINES MEMBRANAIRES	SITE D'INTERACTION	RÉFÉRENCES
RACK-1	724-743	[678]
TM4SF (TÉTRASPANINE)	N.D.	[679]

Chez les cellules au repos, la taline intacte se lie à la queue intracytoplasmique du CD18. Elle maintient le LFA-1 dans un état de faible avidité (immobile de par sa liaison avec le cytosquelette) et sous une conformation d'affinité intermédiaire. Lorsque la cellule s'active, la calpaïne clive la taline libérant l'intégrine du cytosquelette et permettant sa diffusion latérale [628]. D'autres protéines exercent une influence sur le LFA-1, notamment les protéines Rap-1 et RapL. Cette dernière module l'activité de l'intégrine lorsque la GTPase

Rap-1 est activée [676]. Des études démontrent que Rap1 et RapL interviennent dans l'adhésion médiée par le LFA-1 [600, 602, 684-686]. La protéine RapL contient un domaine RBD (de l'anglais *Rap-1 Binding Protein*) et interagit avec Rap-1 lorsque celle-ci est chargée par un GTP [687]. Dans les cellules au repos, les protéines Rap-1 et RapL s'associent respectivement aux membranes internes et dans le cytoplasme [688]. Lorsque la cellule est stimulée, ces deux protéines migrent à la membrane plasmique et co-localisent avec l'intégrine [601, 602]. On connaît peu le rôle de Rap-1/RapL dans l'activation du LFA-1. Certaines études proposent qu'elles participent activement à la formation des conformations d'affinité intermédiaire et de haute affinité par son association avec la chaîne α L [628]. La figure 21 illustre les interactions nécessaires à l'activation du LFA-1.

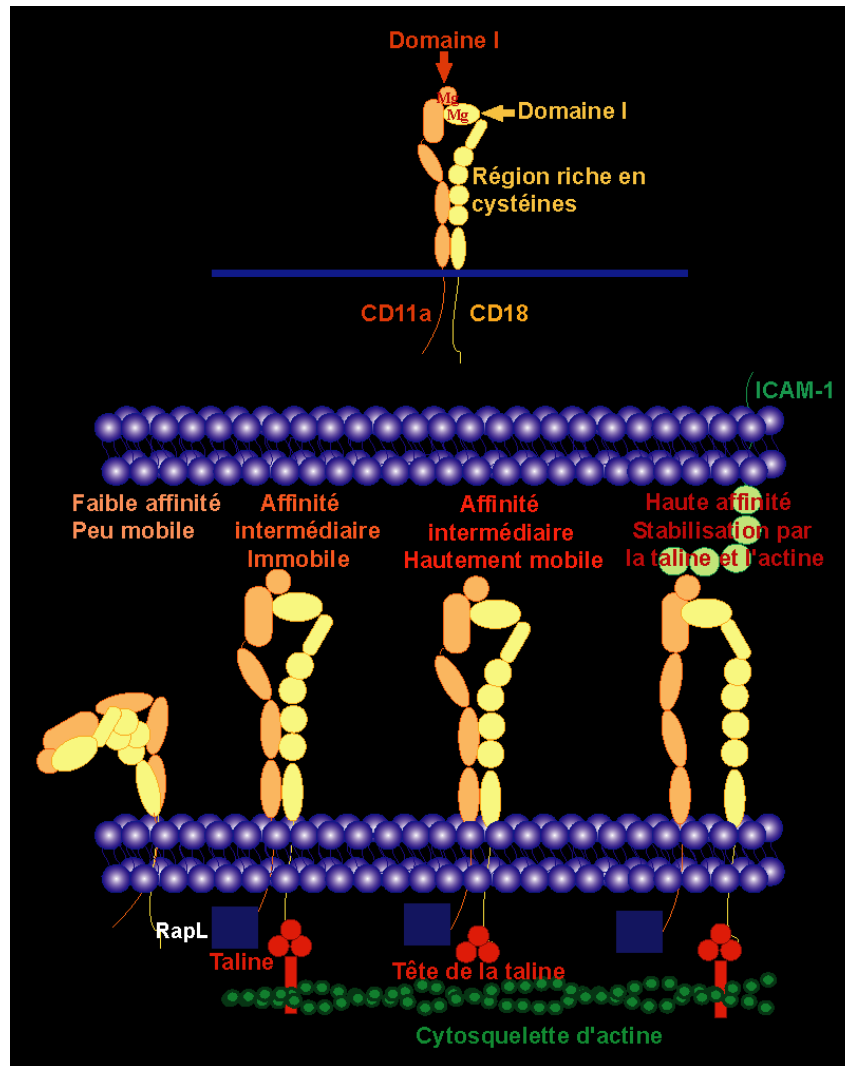


Figure 21. Interactions intermoléculaires influençant l'activité du LFA-1 (adaptée de [628])

2.2.5 La signalisation bidirectionnelle

Le LFA-1, comme toutes les intégrines, ne possède pas d'activité enzymatique intrinsèque. Par contre, il participe activement à la transduction de signaux à travers la membrane plasmique. Le LFA-1 a la capacité de se modifier en fonction des signaux internes ou externes qu'il reçoit.

2.2.5.1 Signaux *inside-out*

L'activité du LFA-1 est modulée par divers signaux intracellulaires menant au recrutement de protéines adaptatrices, de protéines de signalisation ou de protéines de structure (associées au cytosquelette d'actine) aux régions cytoplasmiques des chaînes α et β . Ces événements déclenchent un changement de conformation de l'intégrine et/ou sa mobilité, ce qui favorise la liaison de l'ICAM-1. Ces signaux sont de trois ordres : ceux générés par les chimiokines lors du processus de transmigration, ceux enclenchés par les chimiokines, cytokines ou autres agents chimiotactiques nécessaires à la migration et enfin ceux orchestrés lors de la synapse immunologique via le récepteur des cellules T (RCT). Tous ces stimuli convergent vers la génération de messagers intracellulaires, notamment l'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et la formation de diacylglycérol (DAG). D'autres protéines participant à la stimulation de l'intégrine sont également activées, dont le facteur d'échange de guanine-nucléotide (p.ex. le C3G) et la GTPase Rap1. Ces événements déclenchent l'activation de voies effectrices en aval (tel que l'activation des PKC, de la calpaïne et du RAPL) [601, 627, 628, 640-644, 685, 689]. Ces dernières participent à la mise en œuvre de réponses biologiques, dont le changement de conformation de l'intégrine (affinité faible \rightarrow affinité intermédiaire), la diffusion latérale et l'adhésion cellulaire. La figure 22 résume la cascade de signalisation interne menant à l'activation du LFA-1.

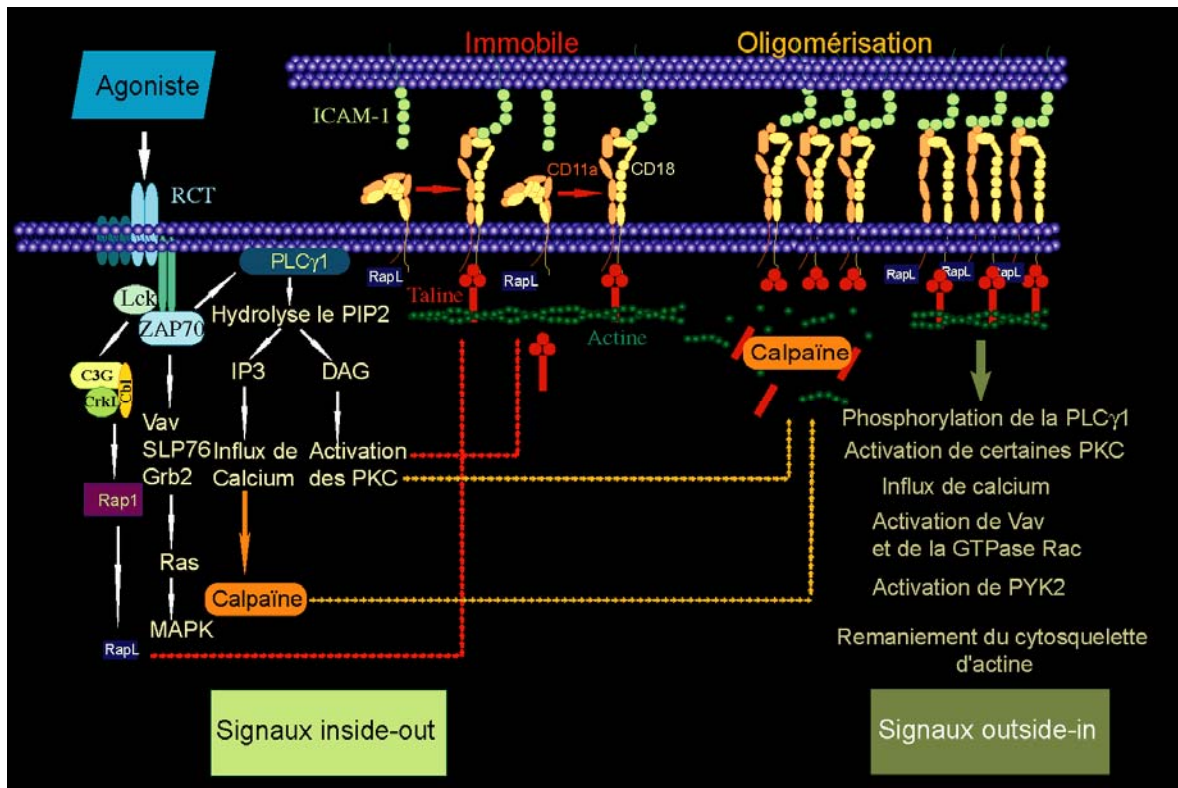


Figure 22. Signalisation *inside-out* et *outside-in* régulant l'activation du LFA-1 (adaptée de [628] et [638])

2.2.5.2 Signaux *outside-in*

La liaison de l'ICAM-1 avec l'intégrine déclenche les signaux *outside-in*. Cette signalisation provoque à la fois une augmentation de l'avidité et un changement de l'affinité [628]. En effet, la liaison d'ICAM-1 avec LFA-1 entraîne le regroupement des intégrines, un phénomène assurant la stabilité de l'interaction. Ces signaux peuvent être induits artificiellement de différentes façons : la multimérisation des intégrines avec des anticorps spécifiques, l'ajout de cations divalents comme le Mn^{2+} [690] ou l'addition d'anticorps activateurs comme le KIM127 [691, 692]. La signalisation induite par le LFA-1 est mal caractérisée chez le lymphocyte T. Les données disponibles démontrent que l'engagement du LFA-1 entraîne la phosphorylation de la PLC γ , l'hydrolyse des phospholipides, l'activation de certaines isoformes de PKC et de la voie PI3K/AKT, la

mobilisation du calcium intracellulaire, la stimulation de la protéine Vav (protéine qui échange des guanines) et l'activation de la GTPase Rac et de certaines protéines tyrosine kinases, dont PYK2 (de l'anglais *Proline-Rich Tyrosine Kinase 2*) [693-699]. L'activation du LFA-1, présent sur les lymphocytes T, entraîne également la réorganisation du cytosquelette d'actine [693]. Ce phénomène assure la stabilité de l'adhésion avec le ligand, processus fondamental pour l'interaction intercellulaire, la polarisation des cellules et la migration. La figure 22 résume globalement les signaux responsables de l'activation du LFA-1 dans les lymphocytes T découlant de la stimulation du RCT.

D'autre part, des études ont démontré que l'engagement de l'intégrine LFA-1 avec l'ICAM-2 induit la phosphorylation de la sérine 745 du CD18 par la PKC δ . Cette phosphorylation entraîne la libération de JAB-1 (de l'anglais *Jun-Activation Domain-Binding Protein 1*) de la chaîne β_2 et sa translocation au noyau [672]. JAB-1 est un co-activateur du c-Jun, lequel interagit avec le c-Fos pour former le facteur de transcription AP-1. Conjointement, la stimulation du LFA-1 amène la phosphorylation des protéines ERK1 et 2 (de l'anglais *Extracellular signal-Regulated Kinase*) et l'activation du c-Fos. La combinaison des deux phénomènes active par conséquent la transcription de gènes sous le contrôle d'AP-1, notamment ceux associés à la progression du cycle cellulaire [700, 701].

2.3 Les pathologies associées à l'intégrine LFA-1

Les fonctions fondamentales de l'intégrine LFA-1 dans la réponse inflammatoire et immunitaire font en sorte que toute anomalie de son expression ou de sa régulation entraîne de profondes immunodéficiences ou une hyperactivation du système immunitaire.

2.3.1 Les maladies héréditaires

Les déficits d'adhérence leucocytaire (LAD) (de l'anglais *Leukocyte Adhesion Deficiency*) sont très rares mais ont des pronostics très peu encourageants. Le déficit LAD-1, affectant une personne sur un million, est causé par des mutations dans le gène du CD18 [702]. Il existe deux formes de la maladie associées à l'expression de l'intégrine β_2 (une forme sévère et une forme modérée) [703] et une forme liée à son activité [704]. Les leucocytes de personnes atteintes de LAD-1 sévère n'expriment pas de CD18. Puisque ces derniers ne peuvent migrer dans les tissus, ils demeurent séquestrés dans le sang. Par conséquent, ces personnes, énormément sujettes aux infections microbiennes (surtout bactériennes), meurent souvent dans les deux premières années de leur vie si elles ne subissent pas de transplantation de la moelle osseuse. Chez les patients atteints de la forme modérée de la maladie, le CD18 est exprimé en faible quantité (entre 5 et 10% du niveau normal) [703] et ils sont, eux aussi, la cible de plusieurs infections récurrentes. D'autres patients LAD-1 expriment de 40 à 60% du niveau normal de CD18, mais leurs intégrines β_2 ne sont pas fonctionnelles. Elles sont incapables d'adopter une conformation de haute affinité et donc de lier leurs ligands. Cette incapacité découle de la présence d'une mutation dans la région MIDAS du CD18 (mutation S138P), alors que la mutation G273R empêche l'expression de la protéine [704]. Un autre déficit LAD, associé à l'activité des intégrines β_1 et β_2 , a été identifié dernièrement [705]. Cette anomalie, nommée LAD-3, est causée par une mutation dans le gène codant pour la GTPase Rap-1, une protéine essentielle à la signalisation *inside-out* [706]. Ces leucocytes expriment les intégrines, répondent à un gradient de chimiokines, ralentissent et roulent sur l'endothélium par l'intermédiaire des L-sélectines, mais sont incapables de s'attacher fermement aux cellules endothéliales et transmigrer dans les tissus périphériques. La mutation dans le gène de Rap-1 n'affecte pas l'expression de la protéine, mais altère sa capacité à charger le GTP.

2.3.2 Les maladies inflammatoires et auto-immunitaires

Les maladies inflammatoires et/ou auto-immunitaires se caractérisent par l'apport important de cellules immunitaires dans les tissus périphériques normaux. Ce phénomène résulte de la reconnaissance des cellules du soi comme étant étrangères ou encore par l'identification par le système immunitaire de particules inoffensives comme étant dangereuses. L'hyperactivation du système immunitaire entraîne l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion et des intégrines, dont le LFA-1. L'asthme, l'ischémie et l'arthrite rhumatoïde sont des exemples de maladies où l'inhibition de l'interaction entre l'ICAM-1 et le LFA-1 procure des effets bénéfiques [707-709]. Le lupus érythémateux, une maladie auto-immunitaire où l'ADN est hypométhylé, entraîne une hyperactivation du système immunitaire. Chez ces patients, l'intégrine LFA-1 est surexprimée et constitutivement active. Cet effet résulte de l'hypométhylation du gène ITGAL, codant pour le CD11a, et contribue certainement à la progression de la maladie [618].

2.4 Les inhibiteurs du LFA-1

Les maladies associées de près ou de loin au LFA-1 sont nombreuses. Beaucoup d'efforts sont déployés afin de trouver des molécules spécifiques bloquant l'interaction entre l'intégrine et ses ligands dans le but de réduire les effets de l'hyperactivation du système immunitaire. Certaines compagnies et laboratoires orientent leurs efforts sur l'ICAM-1 alors que d'autres ciblent le LFA-1.

Plusieurs études démontrent que les peptides dérivés du domaine I du LFA-1 ont la capacité de lier l'ICAM-1 sous forme soluble ou associée avec une cellule. Cette liaison inhibe l'adhésion [710, 711]. D'autres antagonistes sont également à l'étude, dont l'ESM-1

(de l'anglais *Human Endothelial-Cell Specific Molecule 1*), un rival naturel sécrété par les cellules endothéliales, qui fait la compétition à l'ICAM-1 pour la liaison avec l'intégrine [712]. Les antagonistes de la molécule ICAM-1 ont montré leur efficacité dans quelques pathologies inflammatoires, notamment l'asthme et l'arthrite rhumatoïde [713, 714].

Les inhibiteurs dirigés contre le LFA-1 ciblent deux éléments liés à l'interaction avec l'ICAM-1 : le domaine I du CD11a (nécessaire à la liaison de l'ICAM-1) et le changement d'affinité. Dans le premier cas, on utilise des anticorps monoclonaux humanisés (anti-CD11a) ou des peptides. L'efalizumab (Raptiva^{MD}) et l'alefacep (Amevive^{MD}) qui préviennent l'activation des lymphocytes T et leur adhésion à l'endothélium. Ils sont efficaces contre le psoriasis et l'asthme [709,715-717]. L'autre catégorie d'antagoniste cible le changement de conformation de l'intégrine. Le BIRT 377 est une petite molécule qui fortifie la conformation « fermée » de l'intégrine en se liant au domaine I du CD11a. Ce composé inhibe l'adhésion des cellules médiée par LFA-1 ([718, 719]. Le XVA143 est une autre molécule qui se fixe sur la région MIDAS du CD18 et empêche la formation de la conformation de haute affinité de même que l'oligomérisation de LFA-1 [720]. Le mécanisme d'action de ce composé demeure méconnu, mais il semble qu'il empêche la communication entre les deux chaînes de l'intégrine. Certaines statines, dont la lovastatine et la simvastatine, sont une autre classe de molécules inhibant l'activation du LFA-1. La lovastatine s'avère très efficace contre l'adhésion médiée par le LFA-1. Elle se lie au domaine I du CD11a, empêchant son interaction avec l'ICAM-1, et inhibe le changement de conformation de l'intégrine (fermée → ouverte) [721, 722]. Le LFA703, un composé dérivé de la lovastatine mais ciblant uniquement le LFA-1 (et non la réductase HMG-CoA), a fait ses preuves contre l'ischémie-reperfusion induite par l'adhésion des leucocytes et semble prometteur dans le traitement d'autres maladies inflammatoires [707].

2.5 Conclusion

L'adhésion est un phénomène ubiquitaire nécessaire à de nombreuses fonctions biologiques. Les lymphocytes T régulent étroitement les interactions adhésives à chaque étape de la réponse immunitaire. Ces étapes incluent l'attachement ferme aux cellules endothéliales lorsqu'ils sillonnent les vaisseaux sanguins (extravasation), la formation de la synapse immunologique (avec une cellule présentatrice d'antigène) et le contact avec d'autres cellules lorsqu'ils parcourent les tissus périphériques à la recherche d'envahisseurs ou de cellules infectées. L'intégrine LFA-1 se démarque des autres molécules d'adhésion en ce qu'elle participe à chacune de ces étapes. Elle s'ajuste rapidement aux besoins spatio-temporels de chacune d'entre elles en modulant son affinité et son avidité pour l'ICAM-1. Ce chapitre a passé en revue les différents mécanismes régulant l'activation du LFA-1, notamment l'affinité, l'avidité, la réorganisation du cytosquelette d'actine, les interactions intermoléculaires et la signalisation *inside-out* et *outside-in*. Nous ne comprenons encore que très partiellement les événements participant à l'activation du LFA-1. De nombreuses questions demeurent en suspens et leur élucidation mènera sans aucun doute à des perspectives intéressantes en ce qui a trait aux principes immunologiques et au développement d'inhibiteurs (ou agonistes) spécifiques.

Chapitre III. Hypothèse et objectifs de recherche

3.1 Hypothèse de recherche

Il a été démontré que le VIH-1 incorpore la molécule d'adhésion ICAM-1 lors de son bourgeonnement des cellules immunitaires [1, 2, 4]. Plusieurs résultats expérimentaux prouvent que l'ancrage de cette molécule dans l'enveloppe virale augmente la capacité du VIH-1 à infecter les lymphocytes T CD4⁺ [1-3,5]. Toutefois, on ignore toujours le(s) mécanisme(s) responsable(s) de cette augmentation.

L'adsorption du virus à la cellule cible représente la première étape du cycle viral. L'adhésion doit être assez forte pour contrecarrer les phénomènes de répulsion naturellement présents dans le sang périphérique et les tissus. De même, la création du pore de fusion requiert une densité élevée de récepteurs et la stabilisation des interactions entre le virus et la cellule. Plusieurs études démontrent la participation de molécules, autres que le CD4, lors de l'amorce de l'attachement viral. En se fondant sur ces données, nous avons formulé l'hypothèse globale de ce projet sous la forme des questions suivantes :

Est-ce que les molécules d'ICAM-1 ancrées dans l'enveloppe virale facilitent l'attachement du VIH-1 sur les lymphocytes T CD4⁺ par l'intermédiaire de l'intégrine LFA-1 ? Si oui, est-ce que cette interaction stabilise la liaison du virus sur la cellule et favorise la formation du pore de fusion en augmentant la probabilité que les molécules de gp120 rencontrent suffisamment de molécules de CD4 et de co-récepteurs ?

L'hypothèse énoncée se fonde sur les propriétés fonctionnelles des molécules ICAM-1 et LFA-1, deux protéines appartenant à la grande famille des molécules d'adhésion [128]. L'interaction entre les deux molécules intervient normalement lors de l'inflammation et de l'orchestration de la réponse immunitaire spécifique. Ce sont les modifications dans l'affinité et l'avidité du LFA-1 qui régulent étroitement l'interaction de l'intégrine avec son ligand. Chaque paramètre intervient à différentes étapes du processus d'adhésion : l'affinité participe à l'interaction d'un point de vue temporel (interaction rapide en réponse à un gradient de chimiokines) alors que l'avidité intervient dans la force et la consolidation de l'attachement (interaction ferme pour prolonger la signalisation lors de la synapse immunologique). Selon ces renseignements, la présence de molécules de LFA-1 dans un état d'affinité intermédiaire et mobile dans la membrane plasmique des cellules cibles devrait augmenter l'attachement et la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique, un phénomène qui pourrait influencer le tropisme du virus envers des lymphocytes T CD4⁺ contenant du LFA-1 dans un état activé.

3.2 Objectifs de recherche

La caractérisation du ou des mécanisme(s) responsable(s) d'une infectivité supérieure des virus ICAM-1+ à l'égard des lymphocytes T CD4⁺ primaires constitue l'objectif principal de ce projet. Trois objectifs spécifiques ont été énoncés afin d'atteindre le but fixé :

Objectif 1 : Identifier à quelle(s) étape(s) du cycle viral la présence d'ICAM-1 sur l'enveloppe virale procure un avantage distinctif dans l'infection des lymphocytes T CD4⁺ primaires.

Objectif 2 : Caractériser le(s) mécanisme(s) associé(s).

Objectif 3 : Analyser le rôle de ce mécanisme sur le tropisme du VIH-1 à l'égard des cellules naïves et mémoires centrales, les deux sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ abondamment retrouvées dans le sang périphérique et les organes lymphoïdes secondaires.

3.3 Aperçu des résultats et contributions scientifiques

Nos premiers travaux ont permis de démontrer la participation de l'intégrine LFA-1 aux événements précoces de l'infection, soient l'attachement et l'entrée virale. Les virus contenant la molécule ICAM-1 ancrée dans leur enveloppe ont une capacité supérieure à se lier aux lymphocytes T CD4⁺ activés au PHA. Cette aptitude se traduit par une accélération de l'entrée virale, processus critique à l'infection. De plus, l'attachement médié par le LFA-1 favorise l'entrée du virus par fusion plutôt que par endocytose. La fusion, nécessaire à l'infection productive dans les lymphocytes T CD4⁺, requiert les molécules de CD4 et de CXCR4 peu importe la présence ou l'absence de l'ICAM-1 dans l'enveloppe virale. Ces résultats confirment pour la première fois la participation des molécules ICAM-1 et LFA-1 aux processus d'attachement et d'entrée virale du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4⁺ primaires. L'article démontrant ses résultats s'inscrit au chapitre IV de la thèse.

La deuxième partie du travail a permis d'identifier les éléments responsables d'un attachement et d'une entrée par fusion plus rapide et efficace des virus ancrant ou non la protéine ICAM-1 dans leurs enveloppes. Les données obtenues prouvent que l'oligomérisation des intégrines (avidité) et la signalisation *outside-in* sont d'une importance capitale pour l'entrée des virus (ICAM-1+) dans les lymphocytes T CD4⁺ activés. Ce phénomène est intimement lié à la co-localisation des molécules de CD4 et CXCR4 avec les amas de LFA-1. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article au chapitre V.

La dernière portion des travaux a permis de confirmer l'existence d'une relation entre le tropisme viral et l'avidité du LFA-1 sur les cellules cibles. Les expériences consistaient à étudier les étapes majeures du cycle viral dans les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ après leur infection avec différentes préparations virales. Les études comparatives ont permis de démontrer l'apport de l'oligomérisation du LFA-1 dans l'infection préférentielle des cellules T mémoires centrales. L'article correspondant se retrouve au chapitre VI.

Chapitre IV. La présence de la molécule ICAM-1 dans l'enveloppe virale favorise l'entrée du VIH-1 par fusion plutôt que par endocytose dans les lymphocytes T CD4⁺ primaires.

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue *The Journal of Virology* (2003 Nov; 77(22):12299-309) et est constitué de la version finale telle que publiée.

4.1 Résumé

La présence de la molécule ICAM-1 dans l'enveloppe du VIH augmente l'infectivité des virus dans les lymphocytes T CD4⁺. Néanmoins, les mécanismes exacts qui contribuent à ce phénomène demeurent méconnus. Dans le but de résoudre cette énigme, nous avons orienté nos études sur les événements précoces du cycle viral, soit l'attachement et l'entrée des virus arborant ou non la molécule ICAM-1. Des essais d'attachement et d'entrée virale, combinés à des analyses par microscopie confocale, démontrent que les événements précoces de l'infection sont favorisés par l'ancrage de la molécule ICAM-1 dans l'enveloppe virale. D'ailleurs, cette molécule augmente la cinétique d'entrée et privilégie la fusion plutôt que l'endocytose. Ces résultats ont été obtenus par la quantification de la p24 dans les fractions cytosoliques et vésiculaires des cellules infectées et confirmés par la suite par un test de fusion virale. Ces observations prouvent qu'une interaction entre deux protéines d'origine cellulaire, autre que celle entre la gp120 virale et le CD4, influence les processus initiaux du cycle viral et contribue à augmenter l'infection des lymphocytes T CD4⁺.

4.2 Article

Presence of host ICAM-1 into Human Immunodeficiency Virus type 1 increases productive infection of CD4⁺ T lymphocytes by favoring cytosolic delivery of viral material

Mélanie R. Tardif and Michel J. Tremblay*

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

Running title: Cytosolic delivery of HIV-1 is augmented by ICAM-1 incorporation

*Corresponding author. Mailing address:

Laboratoire de Human Immuno-Retrovirologie

Research Center in Infectious Diseases, RC709

CHUL Research Center

2705 boul. Laurier

Quebec (QC), Canada, G1V 4G2

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

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

Abstract

Although there is now convincing evidence that infectivity of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is increased by incorporation of host ICAM-1 in budding virions, the exact mechanism(s) through which ICAM-1 can so significantly affect HIV-1 biology remains obscure. To address this question, we focused our attention on the most proximal events in virus life cycle. We made comparative analyses to estimate attachment and internalization of isogenic HIV-1 particles either lacking or bearing host-derived ICAM-1. Using attachment/entry assays and confocal fluorescence microscopy, we found that virus binding and uptake were both markedly enhanced by insertion of ICAM-1 within the virus envelope when PM1 lymphoid cells and primary human cells (i.e. peripheral blood lymphocytes and purified CD4⁺ T cells) were used as targets. Moreover, ICAM-1-bearing virions entered cells with faster uptake kinetics than viruses devoid of ICAM-1. Experiments conducted with fully competent viruses further confirmed the positive effect of virion-anchored host ICAM-1 on HIV-1 replication. Interestingly, subcellular fractionation assays revealed that ICAM-1 incorporation modifies the HIV-1 entry route by increasing the level of viral material released in the cytosol, a process of internalization known to be mediated mainly by pH-independent membrane fusion and to result in productive infection. A virion-based fusion assay confirmed that the acquisition of ICAM-1 increases the efficiency of productive HIV-1 entry in primary CD4⁺ T lymphocytes. These observations provide new insights into how interactions other than gp120 and CD4/co-receptor complex can modulate the process of productive HIV-1 infection in CD4⁺ T lymphocyte, a cell target highly relevant to HIV-1 pathogenesis.

Introduction

The initial binding of a virus to the surface of target cells represents a determinant factor to achieve an efficient mammalian cell invasion. The first intimate contact between the virion and the cell surface must be rapid and strong to promote stable adhesion and concentrate the virus at the cell surface. It is now well established that infection of CD4⁺ T lymphocytes by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) mainly requires interaction between viral glycoproteins gp120 and gp41 with a cellular complex made of CD4 and an appropriate co-receptor molecule (e.g. CCR5 or CXCR4). However, the importance of these cell surface structures in the process of HIV-1 attachment to host cells is questioned by recent observations. For example, the association between gp120 with CD4 is not sufficient *per se* to capture the virus (30) since the affinity of trimeric gp120 for CD4 is too low to permit a firm adhesion of HIV-1 onto the cell surface (15, 41). Moreover, a number of cell types can bind and/or be infected by the virus in the absence of CD4 expression. In such instances, HIV-1 may attach to these cells by using cell surface constituents other than CD4. It has been shown that sugar groups on the external envelope glycoprotein gp120 interacts with sugar groups or lectin-like domains present on cell surface receptors such as heparan sulfate (3, 26, 32, 39), galactosylceramide (12, 17) and dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 binding C-type lectin (DC-SIGN) (7). It was recently demonstrated that interactions between gp120 and CD4/CXCR4 do not influence attachment of a T cell line-adapted strain of HIV-1 (i.e. NL4-3) to different T lymphoid cell lines and primary cells (30).

The mechanism of HIV-1 entry into susceptible cells is a cooperative process requiring numerous events. First, interaction between gp120 and CD4 leads to conformational changes in gp120 which permits the subsequent ligation with the appropriate co-receptor. Second, a rearrangement of the transmembrane gp41 glycoprotein results in exposure of a fusion domain that is necessary for fusion of viral and cellular membranes. Electron microscopy analyses revealed that HIV-1 can also enter via a clathrin-mediated endocytic pathway in CD4⁺ T lymphocytes following fusion of the virus envelope with the vesicular membrane through a pH-independent mechanism (11, 33, 34). Although both entry

processes seem to occur, data indicate that fusion taking place at the cell surface membrane is the most efficient route leading to a productive HIV-1 infection since endocytosed viruses are directed toward a degradation pathway (25). Viral and/or cellular factors determining the route of virus entry (i.e. fusion between viral and cellular membranes vs vesicular uptake) remains almost undefined.

Despite the fact that productive infection of CD4⁺ T lymphocytes relies heavily on binding of virion-associated gp120 to cellular CD4, the attachment process to these cells clearly implicates others cell surface constituents. Moreover, although CD4⁺ T lymphocytes are considered as the major productive cellular reservoir of HIV-1, few studies have investigated the nature of cell surface molecules other than CD4 which might participate to HIV-1 attachment on such target cells. Several lines of evidence convincingly demonstrate that the association between virally embedded proteins of host origin and their natural ligands on the target cell surface plays a key role in the initial phase of HIV-1 life cycle (13, 14, 30, 31). Considering that multiple CD4 and co-receptor molecules are needed to permit virus entry (9), the additional virus-cell interactions might trigger membrane destabilization leading to redistribution of CD4 and chemokine co-receptors in the cellular membrane, an event that might facilitate creation of the fusion pore.

The cellular membrane contains a diversity of lipid microdomains asymmetrically distributed in the lipid bilayer. Lipid rafts are considered as microdomains enriched in glycosphingolipids, glycosphosphatidylinositol-anchored proteins, signaling molecules and cholesterol. These microdomains are involved in numerous biological functions such as endocytosis, membrane trafficking, cell morphogenesis, and signal transduction (6, 19, 28, 43). Moreover, these structures are also involved in internalization of many pathogens such as *Mycobacterium bovis* (16), *Chlamydia trachomatis* (29), simian virus 40 (35), and Filoviruses (10). Interestingly, it was reported that lipid raft integrity is essential for HIV-1 entry (20, 23, 24, 36, 48). Since cholesterol is crucial for the maintenance of lipid rafts, it was argued that depletion of this molecule from the plasma membrane would impair the process of HIV-1 infection. Fusion requires co-localization of receptor and co-receptor molecules that have been described to accumulate in microvilli on the surface of the T cell

membrane (44, 45). Studies have demonstrated that both molecules are differently located on the plasma membrane. For example, CD4 has been found in lipid rafts whereas CXCR4 was located outside these microdomains. Hence, binding of HIV-1 must trigger lateral movement of membrane proteins to cluster together CD4 and CXCR4. Accordingly, it was demonstrated that binding of HIV-1 to cell surface CD4 present in raft domains disturbs the plasma membrane and promotes the movement of virus-engaged CD4 molecules near to regions outside lipid rafts that are rich in CXCR4 (20). It was also observed that treatment of peripheral blood lymphocytes with a cholesterol-depleting drug reduced co-localization of CD4 and CXCR4 with F-actin in microvilli resulting to an impairment of HIV-1 fusion with the plasma membrane (48). It can thus be proposed that the first steps in HIV-1 replicative cycle (i.e. attachment and fusion) will be favored by virus-associated host molecules that possess a strong affinity for their physiological counter-ligands, especially if such interactions mediate signaling events resulting in cytoskeleton-dependent recruitment of co-receptors to the attachment interface.

It is now well accepted that HIV-1 incorporates a vast array of host membrane molecules during its budding process including the intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (4, 13, 46). The engagement of ICAM-1 with its counter-ligand LFA-1 on the cell surface enhances virus infectivity (13). This phenomenon is in agreement with the role played by LFA-1 in the immune response. Indeed, LFA-1 mediates adhesion and migration of leukocytes during immune and inflammatory processes following its interaction with ICAM-1. In resting cells, integrins exist predominantly in the closed conformation. However, after binding to ICAM-1, the conformation state of LFA-1 changes toward an open conformation that further enhances the affinity of LFA-1 for ICAM-1 (40). Clustering of LFA-1 following cell activation is also an important process to increase ligand binding. Strikingly, LFA-1 acts not only as an adhesion receptor but also as a signaling receptor since the engagement of this integrin with dimeric ICAM-1 initiates both polymerization and reorganization of the F-actin, events that are known to be essential for many biological processes including membranous fluidity (37). The primary objective of this study was to define whether additional interactions between host-derived ICAM-1

within mature HIV-1 particles and cell surface LFA-1 affects the route of virus entry into CD4-expressing T lymphoid cells and primary human cells such as CD4⁺ T lymphocytes.

Materials and Methods

Cells. PM1 cells were obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program (Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Rockville, MD) and 293T cells were provided by W.C. Greene (The J. Gladstone Institutes, San Francisco, CA). 293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) while PM1 cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation, whereas CD4⁺ T cells were purified from freshly isolated PBMCs by immunomagnetic negative selection as indicated by the manufacturer (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). The purity of CD4⁺ T cells was determined by cytofluometry analysis and was always greater than 97%. Isolated PBMCs and purified CD4⁺ T cells were cultured for two days in RPMI medium supplemented with 10% FCS in the presence of phytohemagglutinin (PHA) (1 µg/ml) and recombinant human interleukin-2 (rhIL-2) (50 U/ml).

Antibodies and reagents. Anti-LFA-1 monoclonal antibodies MEM30 and MEM83 were kindly provided by V. Horejsi (Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic). Hybridomas that produce 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 and the American Type Culture Collection (Manassa, VA), respectively. Antibodies obtained from these cells were purified with the mAbTrap protein G affinity columns according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, Inc., Uppsala, Sweden). The R-phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA).

Plasmid and production of viral stocks. pNL4-3 is a full length infectious molecular clone of HIV-1 while pNL4-3 Luc⁺E⁻R⁺ produces Env-deficient reporter HIV-1 particles. These vectors were provided by the AIDS Repository Reagent Program. The pHCMV-G

molecular construct codes for the broad-host-range vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G under the control of human cytomegalovirus promoter. pCD1.8 is an eukaryotic expression vector containing the entire human intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) (a generous gift from T. Springer, The center for Blood Research, Boston, MA). In some experiments, 293T cells were co-transfected with pNL4-3 Luc⁺E⁻R⁺ and pHCMV-G to produce VSV-G pseudotypes. β -lactamase-tagged virions were produced by cotransfection of 293T cells with pNL4-3 and pCMV-BlaM-Vpr, a vector encoding for a β -lactamase-Vpr fusion protein (provided by W.C. Greene). Viruses differing only by the absence or the presence of host-encoded ICAM-1 proteins on their surface were produced by the calcium phosphate co-precipitation method in 293T cells as described previously (13). Virus preparations were normalized for virion content by using an in-house enzymatic assay specific for the major viral p24 protein as described previously. In this test, 183-H12-5C and 31-90-25 are used in combination to quantify p24 levels (4).

Virus binding assay. PM1, PBMCs or purified CD4⁺ T lymphocytes (1 or 3x10⁶) were resuspended in 1 ml of culture medium containing isogenic HIV-1 particles either devoid (called NL4-3) or bearing host-derived ICAM-1 (called NL4-3/ICAM-1) (100 or 300 ng of p24 per 10⁶ cells) and were incubated at 37°C for different time periods. Next, cells were extensively washed with ice-cold phosphate buffered saline (PBS) to remove unbound viruses, transferred to fresh tubes and finally lysed in 150 μ l of ice-cold lysis buffer (20 mM HEPES [pH 7,4], 150 mM NaCl, 0.5 % Triton X-100). Viral content was assessed by monitoring the level of p24.

Virus entry assay. Similar experimental conditions were used to estimate the process of virus entry except that an additional step with trypsin was included to eliminate uninternalized virus. For virus entry kinetic studies, cells were incubated at 37°C with viruses for 5, 15 and 45 min for PM1 cells and 30, 90 and 180 min for PBMCs and purified CD4⁺ T lymphocytes. To monitor the role played by LFA-1 in the process of virus entry, cells were pretreated for 1 h at 37°C with an anti-LFA-1 antibody (MEM30) before

addition of virus. Following infection, cells were washed and trypsinized for 5 min at 37°C to remove uninternalized viruses. Next, cells were first washed once with RPMI supplemented with 10% FCS and then three times with PBS before lysis. The amount of viruses entering cells was estimated by the p24 assay.

Infectivity analysis: PM1, PBMCs and CD4⁺ T cells (10⁵ cells) were incubated for 1 h at 37°C with isogenic NL4-3 or NL4-3/ICAM-1 virions (10 ng of p24). In some experiments, cells were pretreated with an anti-CD4 antibody (i.e. SIM.2 at 10 µg/ml) or SDF-1 (500 ng/ml) for 30 min at 37°C to block either the CD4 primary receptor the CXCR4 co-receptor before infection. Cells were then trypsinized for 5 min at 37°C to remove uninternalized viruses, washed with RPMI supplemented with 10% FCS and extensively washed with PBS. Subsequently, the cells were resuspended in 200 µl of complete culture medium supplemented with rhIL-2 for PBMCs and purified CD4⁺ T cells and transferred into 96-well flat-bottom tissue culture plate. After 48 h of incubation, 150 µl of cell-free supernatant were harvested and frozen at -20°C until assayed by p24 ELISA.

Cell fractionation assay. PM1, PBMCs and CD4⁺ T cells (5 x 10⁶) were resuspended in 2.5 ml of culture medium containing isogenic NL4-3 or NL4-3/ICAM-1 virions (500 ng of p24 per 10⁶ cells) or VSV-G pseudotypes (250 ng of p24) in 6-well tissue culture plate. Cells were incubated at 37°C either for 90 min (PM1 cells) or 4 h (PBMCs and CD4⁺ T lymphocytes). The cells were washed with ice-cold PBS and trypsinized for 5 min at 37°C to eliminate uninternalized viruses. Cells were then washed with RPMI supplemented with 10% FCS followed by three washes with ice-cold PBS. Cellular membranes were disrupted by resuspending cells in 1 ml of ice-cold hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 10 mM KCl and 1 mM EDTA) for 1 min before Dounce homogenization (3 strokes with 7 ml B pestles). Nuclei, cell debris and undamaged cells were pelleted by centrifugation (1,800 rpm for 5 min at 4°C). Supernatants that contained the cytosol and vesicles (including endosomes) were centrifuged at 12,000 rpm for 90 min at 4°C in a Heraeus centrifuge. The supernatant representing the cytosolic fraction was adjusted to

0.5% Triton X-100 while the pellet (i.e. the vesicular fraction) was resuspended in 1 ml of lysis buffer (20 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM NaCl and 0.5% Triton X-100). The level of p24 present in both fractions was measured by ELISA.

Fusion assay. Primary CD4⁺ T lymphocytes (2×10^6) were pretreated with MEM83 and exposed for 2 h at 37°C to BlaM-Vpr-tagged virions (500 ng of p24). The virus-cell mixture was next extensively washed with PBS before incubation with the CCF2/AM dye as described by the manufacturer (Aurora Bioscience, San Diego, CA). Briefly, 2 μ l of CCF2/AM (1 mM) were mixed with 8 μ l of a solution made of 0.1% acetic acid containing 100 mg/ml of Pluronic-F127R in 1 ml of CO₂-independent medium (Gibco) to constitute the loading solution. Cells were incubated for 1 h at room temperature and then washed two times with CO₂-independent medium. The BlaM reaction was maintained for 24 h at room temperature in 200 μ l of CO₂-independent medium supplemented with 10% of FCS and 2.5 mM of probenecid (Sigma), an inhibitor of anion transport. Finally, cells were washed two times with PBS and fixed in 1 ml of a 2% solution of paraformaldehyde. The emission spectra of CCF2/AM (520 nm) and its cleaved product (447nm) upon excitation at 409 nm were monitored with a 8000C spectrofluorometer (SLM AMINCO, SLM instrument Inc., IL).

Confocal microscopy: PM1 cells and purified CD4⁺ T lymphocytes (3×10^5) were pretreated or not with the anti-LFA-1 MEM30 antibody for 30 min on ice and then incubated for 90 min at 37°C with isogenic NL4-3 or NL4-3/ICAM-1 virions (100 ng of p24). Cells were washed three times with PBS, fixed in 2% paraformaldehyde for 20 min and permeabilized for 4 min at 4°C with 0.3% Triton X-100 in PBS. Cells were next incubated with pooled human serum from HIV-1-positive patients for 45 min at 37°C to stain viruses followed by incubation with goat anti-human immunoglobulin secondary antibody conjugated to Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR). After several washes, slides were mounted in 90% glycerol in PBS. Bound and internalized viruses were visualized by confocal laser scanning microscopy (Olympus Fluoview FV300) and digital

images were processed with Adobe Photoshop. All the images were taken under similar experimental conditions (i.e. exposure time) and the processing was also the same for all the images shown in this study.

Statistical analysis. Results presented are expressed as means \pm SD of triplicate samples. Statistical significance between groups was first accomplished by analysis of variance. Calculations were made with Microsoft Excel software. *P* values of <0.05 were considered statistically significant.

Results

Virus attachment and internalization are both increased by the insertion of ICAM-1 into HIV-1 envelope. To decipher the contribution of virus-associated host ICAM-1 to HIV-1 adsorption and entry, isogenic virions either lacking or bearing ICAM-1 were incubated at 37°C with the T lymphoid PM1 cell line and purified CD4⁺ T lymphocytes for 45 min and 90 min, respectively. The non-specific attachment/internalization was measured by using envelope-deficient viruses. The amount of virus that bound to PM1 and primary CD4⁺ T cells was enhanced by ICAM-1 incorporation (Fig. 1). These data indicate that the presence of a protein of host origin such as ICAM-1 on the virion's surface enhances the very first steps in the life cycle of HIV-1. We observed that the modulatory effect of ICAM-1 on virus attachment/entry was more dramatic at 37°C than when the virus-cell mixture was kept at 4°C (data not shown). Experiments aimed at testing the kinetics of virus binding/internalization events revealed that ICAM-1-bearing viruses attach and enter more rapidly than isogenic viruses lacking host ICAM-1 (Fig. 2). Differences at the earliest time point tested (i.e. 30 min) are more pronounced when primary human CD4⁺ T lymphocytes are used as targets. To further confirm the positive up-regulatory effect of ICAM-1 on the most proximal events in HIV-1 biology, we next examined the cellular uptake of HIV-1 by immunofluorescence analysis. PM1 cells and purified CD4⁺ T lymphocytes were again incubated at 37°C for 45 and 90 min, respectively, with equal amounts of p24 for each viral preparation and analyzed by confocal fluorescence microscopy using purified polyclonal anti-HIV-1 antibodies from pooled human serum. The involvement of cell surface LFA-1 in attachment/entry of ICAM-1-bearing viruses was assessed with the use of a blocking anti-LFA-1 antibody (i.e. MEM30). A representative experiment depicted in Fig. 3 shows that virus specific dots are more abundant in both cell types following inoculation with ICAM-1-bearing virions compared with viruses devoid of host ICAM-1. The augmentation of virus-specific dots for ICAM-1-bearing HIV-1 virions is abolished when interactions between ICAM-1 and LFA-1 are inhibited by MEM30. Interestingly, ICAM-1-bearing viruses is concentrated on some specific areas of the target

cell when infection is performed with purified CD4⁺ T lymphocytes at 37°C (Fig. 3B), suggesting that the process of viral entry requires a specific region onto cellular membrane.

Next, we monitored the level of intracellular viral material by removing noninternalized virus particles attached to the cell surface. In agreement with our previous findings, virus entry kinetic studies revealed that ICAM-1-bearing virions entered studied cells more rapidly and efficiently than their ICAM-1-negative counterparts (Fig. 4). Again, the most striking difference between the two isogenic virus preparations was observed in primary CD4⁺ T cells (panel C). The noticed increase in the process of HIV-1 internalization is due to the specific association between virus-associated ICAM-1 and cell surface LFA-1 since it is abolished by the blocking anti-LFA-1 MEM30 antibody (Fig. 5). We also tested the importance of lipid raft integrity in HIV-1 internalization in both PM1 T cells and purified CD4⁺ T lymphocytes. To this end, cells were treated with methyl- β -cyclodextrin (M β CD) in an attempt to induce cholesterol efflux and disturb lipid rafts. Intact lipid rafts were found to be necessary to allow efficient entry of HIV-1 lacking or bearing host-derived ICAM-1 (data not shown).

Productive HIV-1 infection is augmented in established and primary CD4⁺ T cells upon insertion of host ICAM-1 into the viral envelope. Previous works have clearly established that virus-anchored ICAM-1 positively affects HIV-1 infectivity in T lymphocytes (4, 13, 38). These observations were made using recombinant reporter viruses, i.e. incomplete virus into which the *nef* gene was replaced with a reporter gene (either chloramphenicol acetyltransferase or luciferase). To more closely parallel natural infection, fully infectious viruses either bearing or not bearing ICAM-1 were next used to infect PM1, PBMCs, and purified CD4⁺ T lymphocytes and HIV-1 replication was monitored by measuring p24. As illustrated in Fig. 6, virus production was significantly more important for cells inoculated with ICAM-1-bearing virions as compared to cells infected with a similar amount of virus but devoid of ICAM-1. The contribution of ICAM-1/LFA-1 interactions in this phenomenon was proven by demonstrating that a pretreatment of target cells with MEM30 restored virus production to comparable levels (i.e. viruses lacking ICAM-1) independently of the source of virus used for infection. Experiments

performed with an anti-CD4 antibody (i.e. SIM.2), which inhibits the association between gp120 and CD4, and a blocking agent of the chemokine co-receptor CXCR4 (i.e. SDF-1) suggest that interactions between CD4 and CXCR4 with the HIV-1 envelope spike glycoprotein are equally important for the process of infection with viruses lacking or bearing ICAM-1 on their surface. Thus, both receptor and co-receptor are required for an optimal viral entry and productive infection in presence or not of the host ICAM-1 into mature viral entity.

The presence of host ICAM-1 into mature T-tropic HIV-1 particles affects the route of viral entry and promotes fusion at the cellular membrane. It has been demonstrated that HIV-1 enters susceptible cells either via intracellular vesicles that leads to degradation by lysosomal enzymes or cytosolic delivery that results in productive infection (25). In this work, a significant fraction of intracellular p24 was found to be present in intracellular vesicles. In another study, the vesicular uptake of p24 represented 62% of the total intracellular p24 when HIV-1 virions were incubated with Jurkat T lymphoid cells (42) whereas another study using trophoblastic cells have shown that over 85% of the intracellular p24 was found into the vesicular fraction (49). With the aim of testing whether the entry pathway could be modulated into T cells by the insertion of ICAM-1 within HIV-1, virus-infected cells were fractionated to separate subcellular cytosolic and vesicular fractions. Cells inoculated with HIV-1 particles pseudotyped with VSV-G were used as a control because it targets virus entry to an endocytic route (1). Data shown in Fig. 7A demonstrate that following exposure of PM1 cells for 90 min to NL4-3 particles devoid of ICAM-1 approximately 48% of total intracellular p24 appeared in the cytosolic fraction in contrast to 64% when infection is allowed to proceed with isogenic ICAM-1-bearing virions. Cytosolic delivery of NL4-3/ICAM-1 progeny virus was further augmented when PM1 cells were pretreated with an anti-LFA-1 antibody that activates LFA-1 (i.e. MEM83) (data not shown). To eliminate the possibility that a fraction of the observed cytosolic p24 could result from disruption of endosomes while isolating the vesicular fraction, experiments were performed with VSV-G pseudotypes. The validity of our technique is confirmed by the observation that 100% of total intracellular p24 is located into the vesicular fraction once PM1 cells are incubated for 90 min with HIV-1 particles

pseudotyped with VSV-G. Measurements of p24 were made in PBMCs and CD4⁺ T cells following a 4 h exposure time because cytosolic p24 levels were not detectable at the earlier time points tested (i.e. 30 and 90 min) (data not shown). Cytosolic p24 levels were higher when PBMCs were exposed to NL4-3/ICAM-1 progeny virus representing 53% of total intracellular p24, compared to 27% with HIV-1 particles devoid of host ICAM-1 (Fig. 7B). Levels of p24 were also higher in the cytosolic fraction (i.e. 64% vs 36%) when primary human CD4⁺ T lymphocytes were exposed to ICAM-1-bearing virions (Fig. 7C). Unfortunately, comparative analysis could not be made because p24 levels in both fractions were below the detection limit of the p24 assay even following exposure of purified CD4 T lymphocytes for 4 h to isogenic viruses devoid of ICAM-1.

In order to confirm that ICAM-1-bearing viruses are entering more efficiently into biologically relevant target cells (i.e. CD4⁺ T lymphocytes) than isogenic viruses lacking host ICAM-1, we performed a recently developed enzyme-based fusion assay (5, 27). This assay permits to discriminate the process of HIV-1 entry either by fusion or endocytosis. Primary CD4⁺ T cells were left uninfected or inoculated with HIV-1 viruses either Env-deficient, lacking ICAM-1, or bearing ICAM-1 that were also loaded with an enzymatically active β -lactamase-Vpr fusion protein (i.e. BlaM-Vpr). Target cells were next exposed to the CCF2/AM dye, a BlaM substrate that is cleaved by the cytoplasmic BlaM-Vpr (for more details of the BlaM reaction see reference (5)). Emission of the cleaved substrate, upon excitation at 409 nm, was read at 447 nm whereas the uncleaved substrate was read at 520 nm with a spectrofluorometer. The ratio of the intensities of the two wavelengths is the best way to compare result between each condition. It indicates the degree of BlaM-mediated cleavage with minimal interference coming from variations in cell size, probe concentration, excitation and emission intensities (51). Ratios of the intensities at 447 and 520 nm shown in Table 1 indicate that the virus uptake by fusion as monitored by changes in the signal-to-noise ratio was augmented by an average of 22% upon infection with NL4-3/ICAM-1 particles. Under the current experimental conditions, no change in the signal-to-noise ratio was seen when infection was allowed to proceed with either Env-deficient viruses or virions lacking host-encoded ICAM-1. Altogether our data indicate that insertion of ICAM-1 into mature HIV-1 promotes the most proximal events in the virus life

cycle (i.e. attachment and fusion) and favors delivery of the viral material into the cytoplasm.

Discussion

The initial attachment step between HIV-1 and the cell surface is critical for the virus replicative cycle. It is becoming clear that sequential interactions between virus-associated constituents and different cell surface molecules are required to promote adhesion and efficient entry into target cells. Although HIV-1 uses CD4 and CXCR4/CCR5 as primary cellular receptor and co-receptors to infect human T cells, Olinger and co-workers have proposed that other virus-cell interactions are implicated in virus attachment to the surface of CD4-expressing T cells (30). It was postulated that proteins of host origin that are acquired by HIV-1 could play a cardinal role in the early steps of the virus replicative cycle.

ICAM-1 has been reported to be inserted in mature HIV-1 particles and to increase virus infectivity by several fold in different experimental cell systems such as in lymphoid T cell lines, peripheral blood lymphocytes and human lymphoid tissue cultured *ex vivo* (4, 13). The precise mechanism(s) through which the incorporation of this adhesion molecule can augment virus infectivity is still unclear. In this report, we made comparative analyses between isogenic viruses either lacking or bearing ICAM-1 and estimated the attachment/fusion process as well as intracellular p24 in both vesicular and cytosolic fractions. Since lymphoid cells are natural targets of HIV-1, these studies were performed in an established T cell line (i.e. PM1) and primary cells (i.e. unseparated PBMCs and purified CD4⁺ T lymphocytes). We found that the initial attachment step was accentuated by the presence of ICAM-1 in the virion's envelope. Virus internalization was also up-regulated when target cells were exposed to ICAM-1-bearing viruses. Our findings suggest that the enhancing effect is optimal at a temperature that approaches physiologic temperatures (i.e. 37°C). This observation is not a surprise since thermodynamic processes such as inside-out signaling, membrane fluidity and actin cytoskeleton reorganization regulate LFA-1 activity. Moreover, internalization of viruses either devoid or bearing ICAM-1 was more rapid and efficient in PM1 cells as compared to primary cells. This observation is most likely reminiscent of the reported co-localization of CD4 and CXCR4

within the same lipid microdomains in PM1 cells (36), which is in sharp contrast to the situation prevailing in T lymphocytes where both cell surface molecules are segregated into separate membrane microdomains (20).

The use of integrins to gain entry into host cells is not restricted to HIV-1 but is a process shared by several viruses. In fact, echovirus (2), adenovirus (50), rotavirus (18), and human parechovirus (47) have all been shown to use integrins to bind and/or penetrate into target cells. Interestingly, all these viruses are entering cells by endocytosis. Typically, enveloped viruses exploit three distinct pathways to penetrate into target cells: 1) fusion between viral and cellular membranes, a process that uses HIV-1 to gain entry into CD4⁺ T lymphocytes, 2) endocytosis via clathrin-coated pits, and 3) endocytosis through caveolae or rafts. A possible change in HIV-1 entry that would be mediated by virus-associated ICAM-1 was tested by using fusion incompetent viruses. Productive infection of human CD4⁺ T cells with ICAM-1-bearing viruses could not be achieved with fusion-deficient virus (data not shown), therefore suggesting that fusion between viral and cellular membranes remains the principal route by which such viruses are internalized into CD4-expressing T lymphocytes. Moreover, both CD4 and CXCR4 are necessary to achieve a productive infection of CD4⁺ T cells suggesting that viruses bearing ICAM-1 use the same receptor and co-receptor than viruses lacking this adhesion molecule to penetrate into such target cells. Nevertheless, the mechanism through which each virus creates an optimal environment for the formation of the fusion pore might be different and favored when ICAM-1 is located onto the virions' surface.

It has been shown that lipid rafts are microdomains necessary for HIV-1 entry. In fact, depletion of cholesterol as well as targeting CD4 into non-raft domains abolish HIV-1 infection in T cell lines (8, 23, 24). While distribution of CD4 and co-receptors in lipid rafts on purified CD4⁺ T cells has not been investigated yet, it was demonstrated that CXCR4, in contrast to CD4, is almost excluded from raft microdomains in mitogen/IL-2-treated PBMCs (20). Thus, the plasma membrane should allow a lateral movement of CXCR4 close to CD4 for HIV-1 infection to proceed. In order to investigate whether membrane fluidity and lipid raft integrity are still important for infection with ICAM-1-

bearing virions, target cells were treated with M β CD. Penetration of viruses either bearing or not bearing ICAM-1 was affected to the same level following M β CD treatment. These data suggest that both viruses require movement of cellular proteins into membrane microdomains to achieve infection. Experiments are currently underway to define whether LFA-1 is localized near or inside lipid rafts upon binding of HIV-1 either lacking or bearing host ICAM-1. The possible presence of CD4 and CXCR4 in distinct membrane compartments will also be investigated following attachment of these progeny viruses.

Subcellular fractionation assays were performed with the tested virus preparations because HIV-1 internalization leading to productive infection has been shown to result from fusion events at the cell surface and not from endosomal uptake (25). It was proposed that vesicular uptake of HIV-1 does not involve appropriate envelope-receptor interactions and is most likely resulting from non-specific adhesion of HIV-1 particles to the cell surface. Interestingly, the process of ICAM-1 incorporation affected the distribution of intracellular p24 in the cytosolic and vesicular fractions. Indeed, after exposure to ICAM-1-bearing virions, cytosolic p24 represented a higher proportion of total intracellular p24 than following infection with HIV-1 particles devoid of ICAM-1. The increase in cytosolic p24 distribution, which is linked with a true infection process, is corroborated by our virus infectivity studies. Given that the cytosolic p24 value represents an indicator of HIV-1 entry events leading to successful infectious processes (25), our data suggest that ICAM-1 incorporation engages viruses toward a route of entry ending in a more productive infection pathway. The use of virions loaded with β -lactamase-Vpr chimeric proteins confirmed that fusion and delivery into the cytoplasm are both accentuated upon the acquisition of ICAM-1 by HIV-1.

The main difficulty encountered by HIV-1 in achieving successful entry lies in the fact that this process is complex and cooperative since it involves multiple Env proteins as well as numerous CD4 glycoproteins and chemokine co-receptors that have to act in a concerted manner. Another obstacle that HIV-1 has to surmount in T lymphocytes is that CD4 and CXCR4 are segregated into distinct cell surface microdomains (i.e. CD4 in lipid rafts and CXCR4 in nonraft regions). Therefore, the virus must destabilize the plasma membrane

microenvironment to allow the formation of the fusion pore (20). Several hypotheses based on specific properties of the integrin can permit to explain the higher proportion of the viral p24 input that reaches the cytosol once host ICAM-1 is found embedded into mature HIV-1. Since LFA-1/ICAM-1 interactions contribute to T lymphocyte tethering and rolling in shear flow (21), it can be proposed that virus-embedded ICAM-1 promotes rolling of virions onto the surface of target cells until a sufficient number of gp120-CD4 interactions are engaged (Fig. 8A). Alternatively, ligation of virus-anchored host ICAM-1 and cell surface LFA-1 can trigger LFA-1 activation, an event leading to mobilization of LFA-1 to the lipid raft and thus closer to CD4 (Fig. 8B). It can also be hypothesized that signal transduction events initiated by the association between LFA-1 with its ligand (i.e. ICAM-1) can mediate a remodeling of the cytoskeleton resulting in destabilization of the plasma membrane and facilitated secondary interactions with CXCR4 (Fig. 8C). This idea is supported by a recent study showing that the F-actin cytoskeleton is remodeled by ICAM-1-mediated signaling through LFA-1 (37). Finally, LFA-1 has a propensity to form complexes with other proteins and allow their movement into lipid rafts upon cell activation (22). It is thus conceivable that LFA-1, which is excluded from lipid rafts in resting T cells (22), might be located near CXCR4 and this complex could migrate to CD4-containing membrane rafts following binding of ICAM-1-bearing HIV-1 particles to the cell surface (Fig. 8D). It should be emphasized that a possible effect on the lateral movement of cell surface molecules into the plasma membrane is a common denominator to explain how ICAM-1 incorporation can promote HIV-1 fusion and authentic cell infection. Studies are currently in progress to delineate the precise mechanism(s) of action of virus-anchored host ICAM-1 on the early events in HIV-1 biology in CD4⁺ T lymphocytes.

This study confirms previous observations indicating that even though CD4 and an appropriate co-receptor are needed for productive HIV-1 infection, there are other virus-cell interactions that can contribute to a successful infectious process. A better understanding of local factors important for HIV-1 entry and productive virus infection is needed considering that several entry inhibitors are currently under clinical development.

Acknowledgements

We thank Dr. M Dufour for performing flow cytometric analyses. This work was financially supported by an operating grant to M.J. Tremblay from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) HIV/AIDS Research Program (grant #HOP-14438). This work was performed by M.R.T. in partial fulfillment of the Ph.D. degree from the Microbiology-Immunology Program, Faculty of Medicine, Laval University. M.R.T. holds a CIHR Doctoral Award and M.J.T. is the recipient of the Canada Research Chair in Human Immuno-Retrovirology (Tier 1 level).

References

1. **Aiken, C.** 1997. Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *J. Virol.* **71**:5871-5877.
2. **Bergelson, J. M., N. St John, S. Kawaguchi, M. Chan, H. Stubdal, J. Modlin, and R. W. Finberg.** 1993. Infection by echoviruses 1 and 8 depends on the alpha 2 subunit of human VLA-2. *J Virol* **67**:6847-52.
3. **Blanco, J., J. Barretina, A. Gutierrez, M. Armand-Ugon, C. Cabrera, B. Clotet, and J. A. Este.** 2002. Preferential attachment of HIV particles to activated and CD45RO+CD4+ T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:27-38.
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. **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**:1151-4.
6. **Clague, M. J., and S. Urbe.** 2001. The interface of receptor trafficking and signalling. *J Cell Sci* **114**:3075-81.
7. **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**:8356-60.
8. **Del Real, G., S. Jimenez-Baranda, R. A. Lacalle, E. Mira, P. Lucas, C. Gomez-Mouton, A. C. Carrera, A. C. Martinez, and S. Manes.** 2002. Blocking of HIV-1 Infection by Targeting CD4 to Nonraft Membrane Domains. *J Exp Med* **196**:293-301.
9. **Doms, R. W.** 2000. Beyond receptor expression: the influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection. *Virology* **276**:229-37.

10. **Empig, C. J., and M. A. Goldsmith.** 2002. Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses. *J Virol* **76**:5266-70.
11. **Fackler, O. T., and B. M. Peterlin.** 2000. Endocytic entry of HIV-1. *Curr Biol* **10**:1005-8.
12. **Fantini, J., D. G. Cook, N. Nathanson, S. L. Spitalnik, and F. Gonzalez-Scarano.** 1993. Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:2700-4.
13. **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.
14. **Fortin, J. F., R. Cantin, and M. J. Tremblay.** 1998. T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1. *J Virol* **72**:2105-12.
15. **Fouts, T. R., J. M. Binley, A. Trkola, J. E. Robinson, and J. P. Moore.** 1997. Neutralization of the human immunodeficiency virus type 1 primary isolate JR-FL by human monoclonal antibodies correlates with antibody binding to the oligomeric form of the envelope glycoprotein complex. *J Virol* **71**:2779-85.
16. **Gatfield, J., and J. Pieters.** 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* **288**:1647-50.
17. **Harouse, J. M., S. Bhat, S. L. Spitalnik, M. Laughlin, K. Stefano, D. H. Silberberg, and F. Gonzalez-Scarano.** 1991. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* **253**:320-3.
18. **Hewish, M. J., Y. Takada, and B. S. Coulson.** 2000. Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. *J Virol* **74**:228-36.
19. **Ikonen, E.** 2001. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* **13**:470-7.

20. **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**:1802-15.
21. **Lawrence, M. B., E. L. Berg, E. C. Butcher, and T. A. Springer.** 1995. Rolling of lymphocytes and neutrophils on peripheral node addressin and subsequent arrest on ICAM-1 in shear flow. *Eur. J. Immunol.* **25**:1025-1031.
22. **Leitinger, B., and N. Hogg.** 2002. The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *J Cell Sci* **115**:963-72.
23. **Liao, Z., L. M. Cimasky, 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.
24. **Manes, S., G. del Real, R. A. Lacalle, P. Lucas, C. Gomez-Mouton, S. Sanchez-Palomino, R. Delgado, J. Alcamí, E. Mira, and A. C. Martínez.** 2000. Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Rep* **1**:190-6.
25. **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.
26. **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**:3623-34.
27. **Munk, C., S. M. Brandt, G. Lucero, and N. R. Landau.** 2002. A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:13843-8.
28. **Nichols, B. J., and J. Lippincott-Schwartz.** 2001. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* **11**:406-12.
29. **Norkin, L. C., S. A. Wolfrom, and E. S. Stuart.** 2001. Association of caveolin with *Chlamydia trachomatis* inclusions at early and late stages of infection. *Exp Cell Res* **266**:229-38.

30. **Olinger, G. G., M. Saifuddin, M. L. Hart, and G. T. Spear.** 2002. Cellular factors influence the binding of HIV type 1 to cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:259-67.
31. **Paquette, J. S., J. F. Fortin, L. Blanchard, and M. J. Tremblay.** 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.
32. **Patel, M., M. Yanagishita, G. Roderiguez, D. C. Bou-Habib, T. Oravec, V. C. Hascall, and M. A. Norcross.** 1993. Cell-surface heparan sulfate proteoglycan mediates HIV-1 infection of T-cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**:167-74.
33. **Pauza, C. D.** 1991. The endocytic pathway for human immunodeficiency virus infection. *Adv Exp Med Biol* **300**:111-38.
34. **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.
35. **Pelkmans, L., J. Kartenbeck, and A. Helenius.** 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* **3**:473-83.
36. **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.
37. **Porter, J. C., M. Bracke, A. Smith, D. Davies, and N. Hogg.** 2002. Signaling through integrin LFA-1 leads to filamentous actin polymerization and remodeling, resulting in enhanced T cell adhesion. *J Immunol* **168**:6330-5.
38. **Rizzuto, C. D., and J. G. Sodroski.** 1997. Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization. *J Virol* **71**:4847-51.
39. **Roderiguez, G., T. Oravec, M. Yanagishita, D. C. Bou-Habib, H. Mostowski, and M. A. Norcross.** 1995. Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of cell surface heparan sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J Virol* **69**:2233-9.

40. **Salas, A., M. Shimaoka, S. Chen, C. V. Carman, and T. A. Springer.** 2002. Transition from rolling to firm adhesion is regulated by the conformation of the I domain of the integrin LFA-1. *J Biol Chem*.
41. **Sattentau, Q. J., J. P. Moore, F. Vignaux, F. Traincard, and P. Pognard.** 1993. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J Virol* **67**:7383-93.
42. **Schaeffer, E., R. Geleziunas, and W. C. Greene.** 2001. Human immunodeficiency virus type 1 Nef functions at the level of virus entry by enhancing cytoplasmic delivery of virions. *J Virol* **75**:2993-3000.
43. **Simons, K., and D. Toomre.** 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**:31-9.
44. **Singer, H., S. Scott, D. W. Kawka, J. Chin, B. L. Daugherty, J. A. DeMartino, J. DiSalvo, S. L. Gould, J. E. Lineberger, L. Malkowitz, M. D. Miller, L. Mitnaul, S. J. Siciliano, M. J. Staruch, H. R. Williams, H. J. Zweerink, and M. S. Springer.** 2001. CCR5, CXCR4, and CD4 are clustered and closely apposed on microvilli of human macrophages and T cells. *J Virol* **75**:3779-90.
45. **Steffens, C. M., and T. J. Hope.** 2003. Localization of CD4 and CCR5 in living cells. *J Virol* **77**:4985-91.
46. **Tremblay, M. J., J. F. Fortin, and R. Cantin.** 1998. The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunol Today* **19**:346-51.
47. **Triantafylou, K., M. Triantafylou, Y. Takada, and N. Fernandez.** 2000. Human parechovirus 1 utilizes integrins α v β 3 and α v β 1 as receptors. *J Virol* **74**:5856-62.
48. **Viard, M., R. Blumenthal, and Y. Raviv.** 2002. Improved separation of integral membrane proteins by continuous elution electrophoresis with simultaneous detergent exchange: application to the purification of the fusion protein of the human immunodeficiency virus type 1. *Electrophoresis* **23**:1659-66.
49. **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**:15832-41.

50. **Wickham, T. J., P. Mathias, D. A. Cheresh, and G. R. Nemerow.** 1993. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**:309-19.
51. **Zlokarnik, G., P. A. Negulescu, T. E. Knapp, L. Mere, N. Burren, L. Feng, M. Whitney, K. Roemer, and R. Y. Tsien.** 1998. Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science* **279**:84-8.

Figures legends

Fig. 1. Insertion of ICAM-1 into mature progeny virus enhances HIV-1 adsorption/entry. PM1 cells and purified CD4⁺ T lymphocytes (10⁶) were incubated at 37°C for 45 min and 90 min, respectively, with similar amounts of the indicated virus stocks (100 ng of p24). Cells were next extensively washed, lysed, and tested for p24. Experiments were performed in triplicate and standard deviations are indicated. Data shown are representative of two separate experiments.

Fig. 2. Kinetics of early steps in HIV-1 life cycle is accelerated upon ICAM-1 incorporation. PM1 cells (A), PBMCs (B), and purified CD4⁺ T lymphocytes (C) (3x10⁶) were incubated at 37°C for the indicated time periods with similar amounts of isogenic NL4-3 particles either bearing or not bearing ICAM-1 (300 ng of p24). Cells were next extensively washed, lysed, and tested for p24. Experiments were performed in triplicate and standard deviations are indicated. Data shown are representative of three separate experiments.

Fig. 3. Confocal microscopy analyses confirm that the most proximal events in virus replicative cycle are more efficient upon insertion of host ICAM-1 into HIV-1. PM1 cells (panel A) and purified CD4⁺ T lymphocytes (panel B) were exposed at 37°C for 45 min and 90 min, respectively, to the studied virus preparations. Next, cells were extensively washed, fixed, and labeled as described in Materials and Methods. (Top panels) Immunofluorescence analysis. (Bottom panels) Phase contrast of the same fields.

Fig. 4. Virus-anchored host ICAM-1 confers faster kinetics of HIV-1 internalization. PM1 cells (A), PBMCs (B), and purified CD4⁺ T lymphocytes (C) (3x10⁶) were incubated at 37°C for the indicated time periods with similar amounts of isogenic NL4-3 particles either bearing or not bearing ICAM-1 (300 ng of p24). Cells were next extensively washed with PBS, treated with trypsin to remove uninternalized virions, before lysis to quantify the amount of viruses that has entered the cells. Experiments were performed in triplicate and

standard deviations are indicated. Data shown are representative of three separate experiments.

Fig. 5. ICAM-1/LFA-1 interactions are responsible for more rapid attachment and fusion of ICAM-1-bearing virions. PM1 cells (A), PBMCs (B), and purified CD4⁺ T lymphocytes (C) were initially pretreated for 60 min at 37°C with the blocking anti-LFA-1 antibody MEM30. Cells were next incubated at 37°C for 30 min with similar amounts of isogenic NL4-3 particles either bearing or not bearing ICAM-1 (100 ng of p24). Cells were extensively washed with PBS, treated with trypsin to remove uninternalized virions, before lysis to quantify the amount of viruses that has entered the cells. Experiments were performed in triplicate and standard deviations are indicated. Data shown are representative of three separate experiments. The asterisk indicates a significant difference from cells inoculated with NL4-3/ICAM-1 that are not treated with MEM30 ($p < 0.02$).

Fig. 6. Replication of fully competent HIV-1 particles is augmented by ICAM-1 incorporation through interactions between ICAM-1 and LFA-1. PM1 cells (A), PBMCs (B) and purified CD4⁺ T lymphocytes (C) were either left untreated or were treated with MEM30, SIM.2, or SDF-1. Cells were next incubated at 37°C for 60 min with similar amounts of isogenic NL4-3 particles either bearing or not bearing ICAM-1 (10 ng of p24). The cells were trypsinized to remove uninternalized virus and were resuspended in complete culture medium. After 48 h, cell-free supernatants were collected and virus production was estimated by assessing p24 production. Experiments were performed in triplicate and standard deviations are indicated. Data shown are representative of three separate experiments. The asterisk indicates a significant difference from cells infected with the listed virus preparations and left untreated (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.025$).

Fig. 7. ICAM-1 incorporation favors cytosolic delivery of internalized virions. (A) PM1 cells (3×10^6) were incubated at 37°C for 90 min with similar amounts of isogenic NL4-3 particles either bearing or not bearing ICAM-1 (300 ng of p24). PM1 cells were also exposed to HIV-1 particles pseudotyped with VSV-G envelope (100 ng of p24). In some

instances, (B) PBMCs and (C) purified CD4⁺ T lymphocytes (7×10^6) were incubated at 37°C for 240 min with similar amounts of isogenic NL4-3 particles either bearing or not bearing ICAM-1 (700 ng of p24) or with HIV-1 pseudotyped with VSV-G envelope (100 ng of p24). After viral exposure, cells were washed, trypsinized and resuspended in a swelling buffer. Cells were next disrupted by dounce homogenization and cellular fractions (i.e. cytosolic and vesicular) were separated as described in Materials and Methods. The level of p24 in each fraction was monitored by a p24 assay. The percentage of cytosolic (white bars) and vesicular (gray bars) p24 is indicated inside each bar. Experiments were performed in triplicate and data shown are representative of three separate experiments.

Fig. 8. Proposed hypothetical models to explain how insertion of host ICAM-1 within HIV-1 results in an enhancement of virus attachment/fusion/internalization and cytosolic delivery. (A) Rolling of virus entity onto the cell surface due to the association between ICAM-1 and LFA-1 permits to achieve a sufficient number of interactions between gp120 and CD4. (B) Binding of virus-associated ICAM-1 to cell surface LFA-1 triggers activation of LFA-1 leading ultimately to a displacement of LFA-1 and thus of associated viruses toward lipid rafts that contain CD4. (C) Attachment of ICAM-1-bearing viruses to the surface of LFA-1-expressing cells can result in intracellular signal transduction events that facilitate interactions with the appropriate chemokine co-receptor. (D) A complex made of LFA-1 and CXCR4 can move into raft microdomains following binding of ICAM-1-bearing virions, leading to a co-localization with CD4.

TABLE 1. Fusion of BlaM-Vpr-tagged virions into primary CD4+ T cells is enhanced by incorporation of host ICAM-1 into HIV-1.

Experiments	447/520 ratio				Fold change over uninfected cells*		
	Mock	NL4-3 Env-	NL4-3	NL4-3/ICAM-1	NL4-3 Env-	NL4-3	NL4-3/ICAM-1
# 1	0.28	0.283	0.282	0.34	1	1	1.21
# 2	0.35	0.35	0.34	0.437	1	0.97	1.25
# 3	0.23	0.23	0.23	0.274	1	1.05	1.19

*The fold change is the ratio of the infected cell population divided by the ratio of the mock-infected cells.

Figure 1

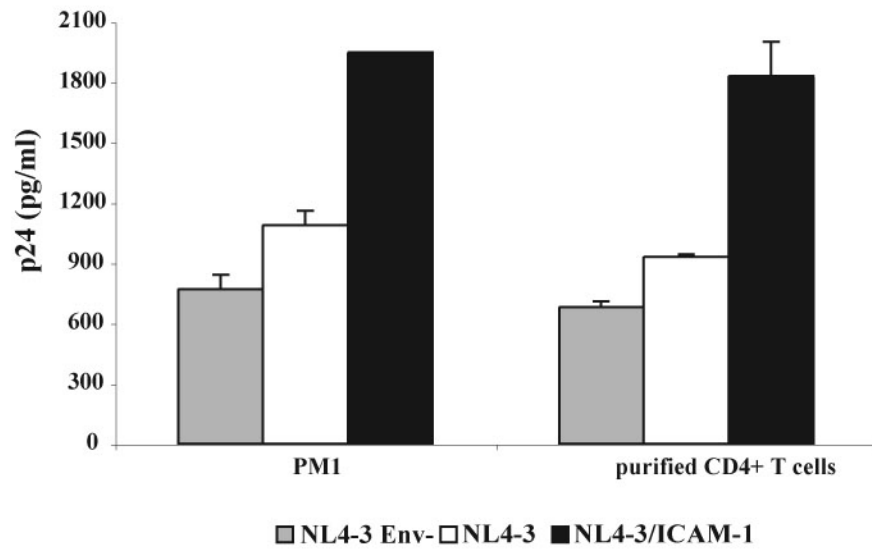
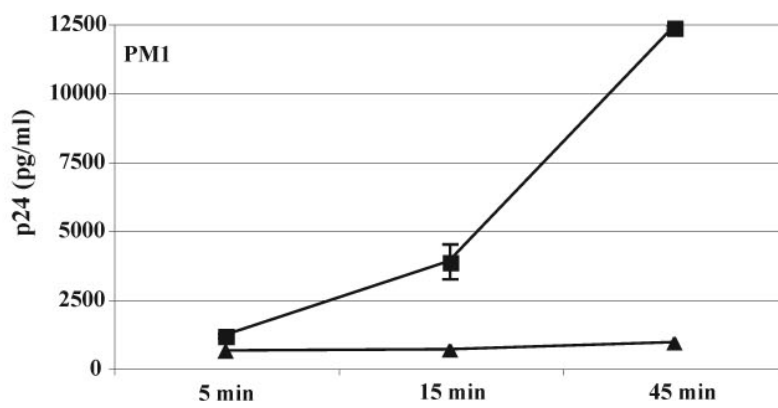
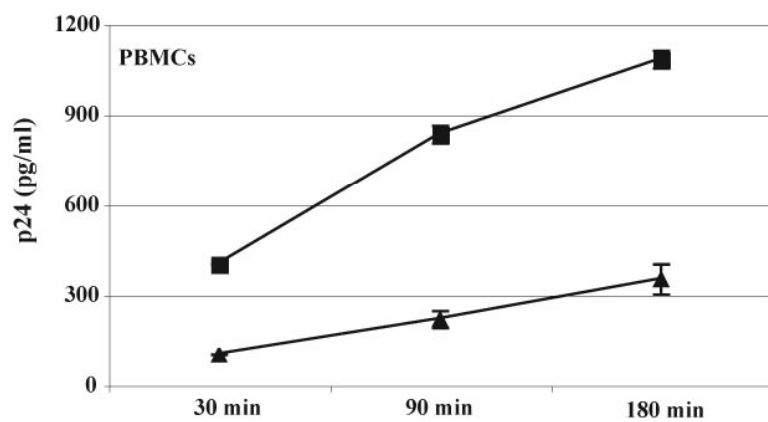


Figure 2

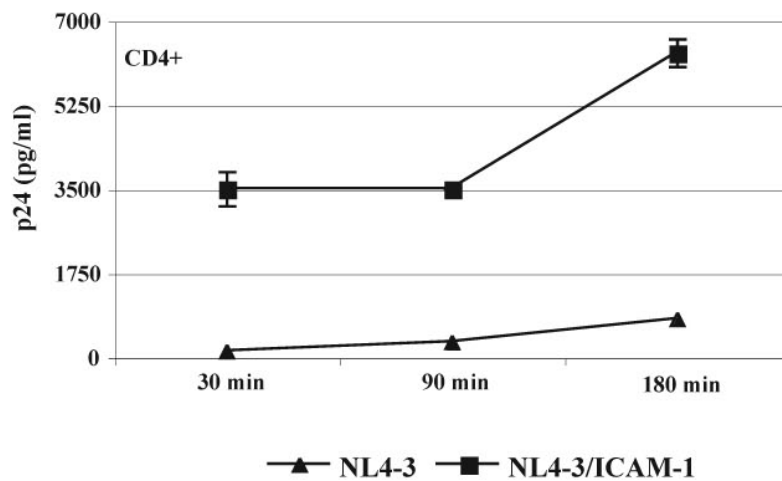
A



B



C



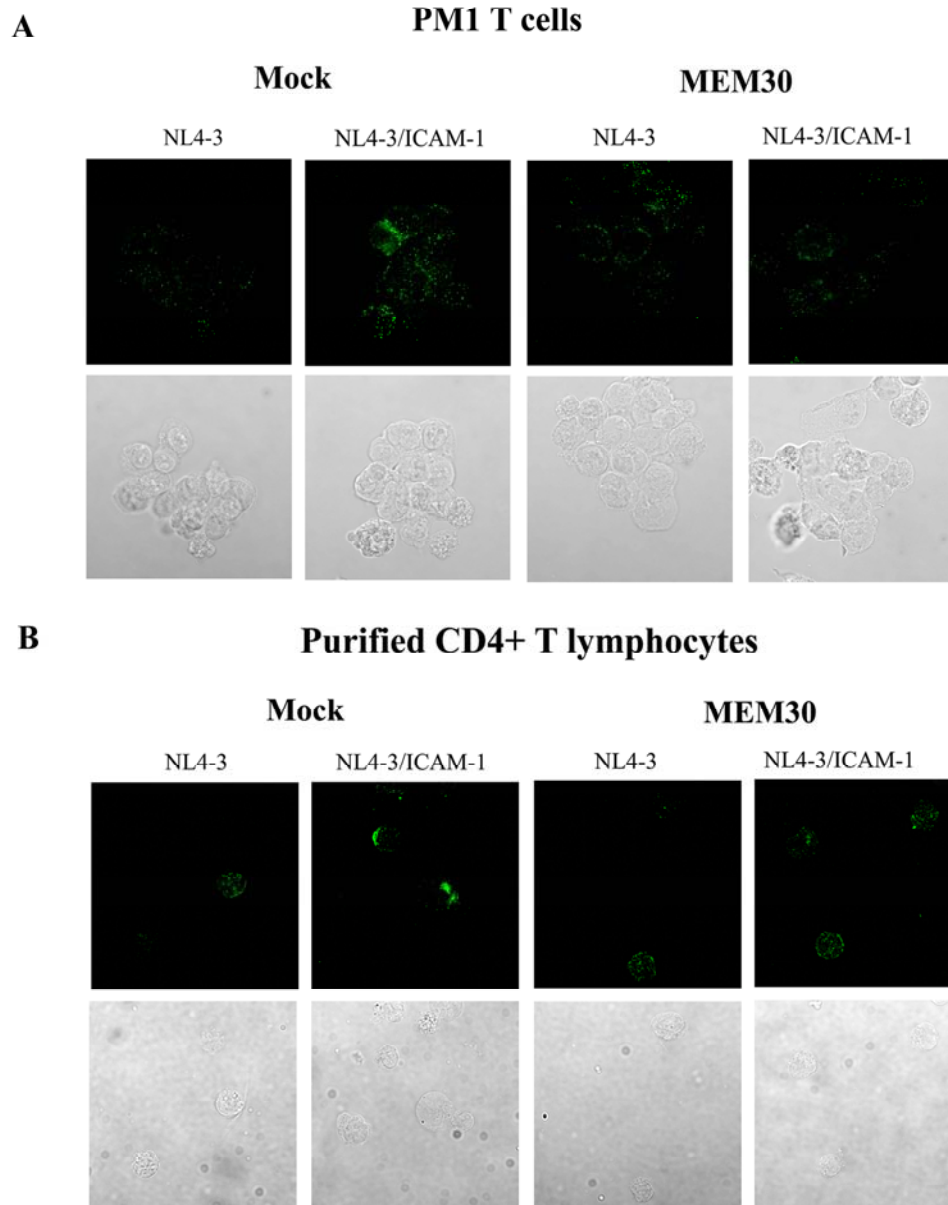
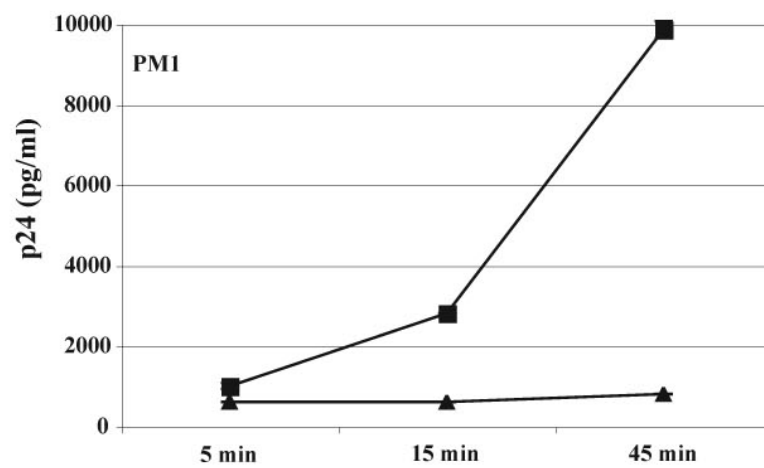
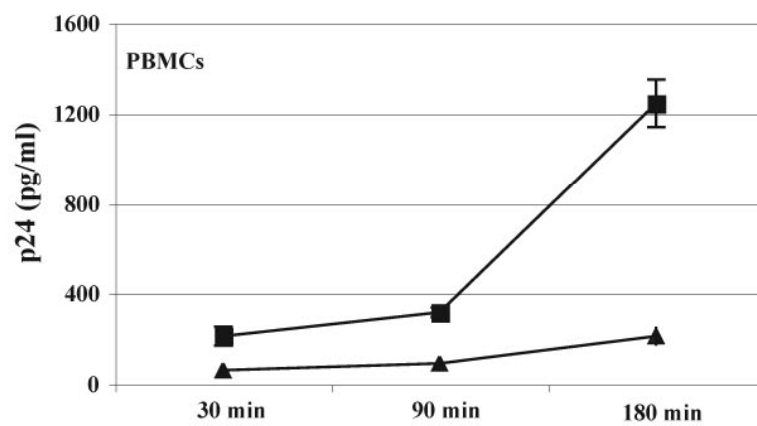


Figure 4

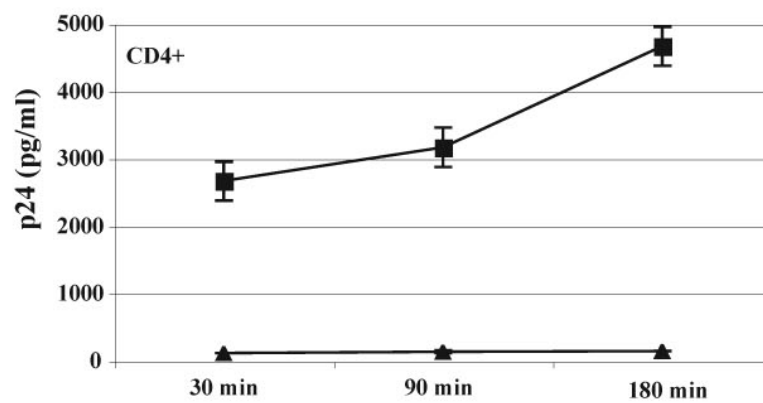
A



B



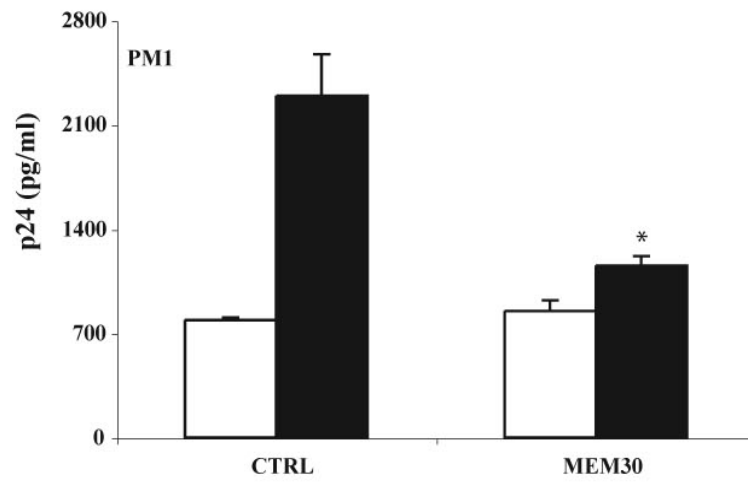
C



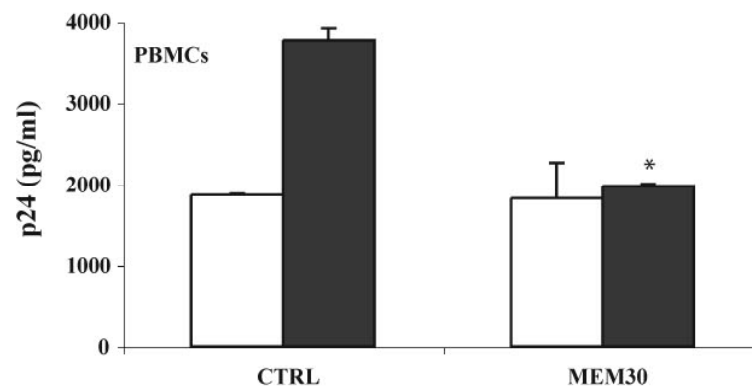
—▲— NL4-3 —■— NL4-3/ICAM-1

Figure 5

A



B



C

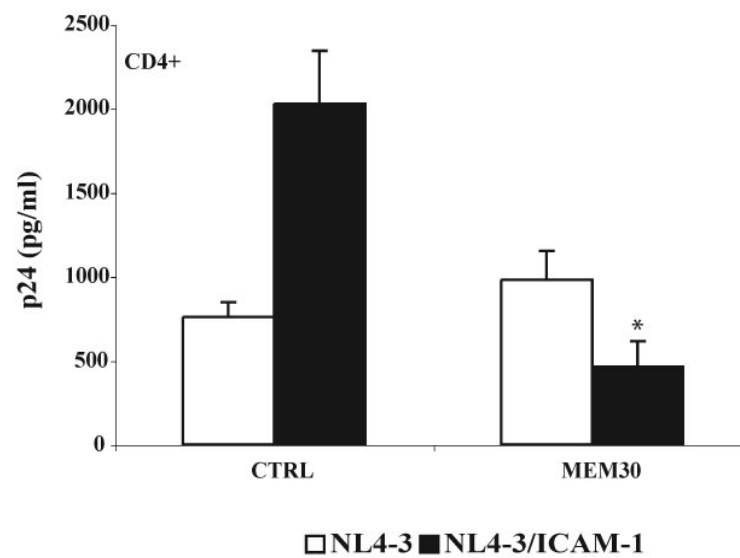
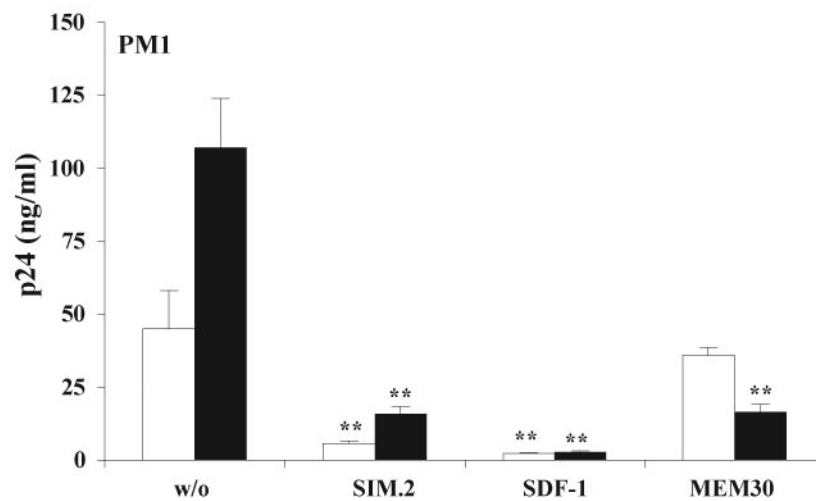
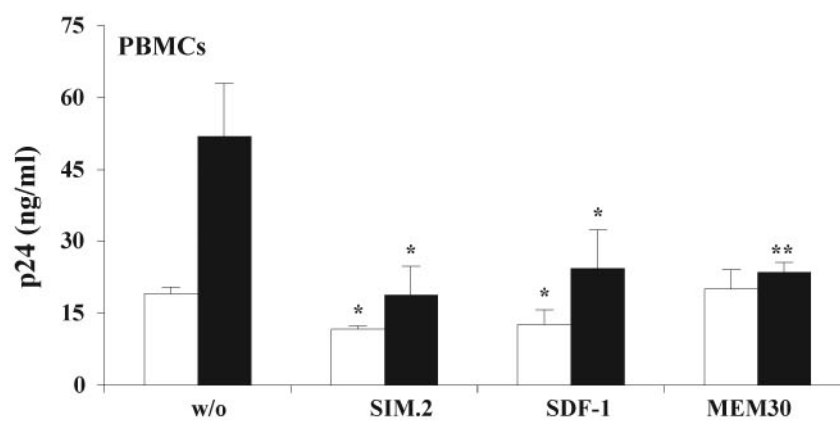


Figure 6

A



B



C

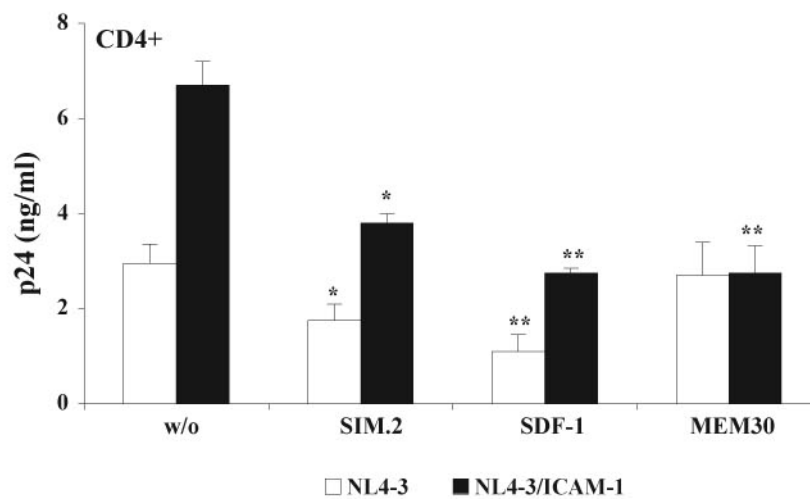
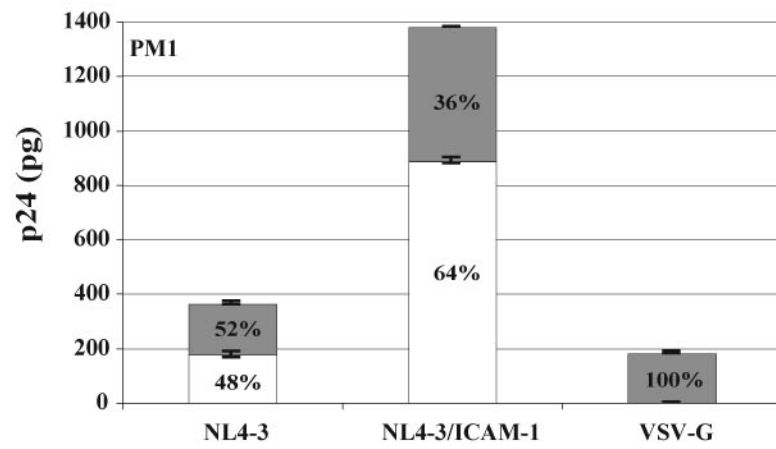
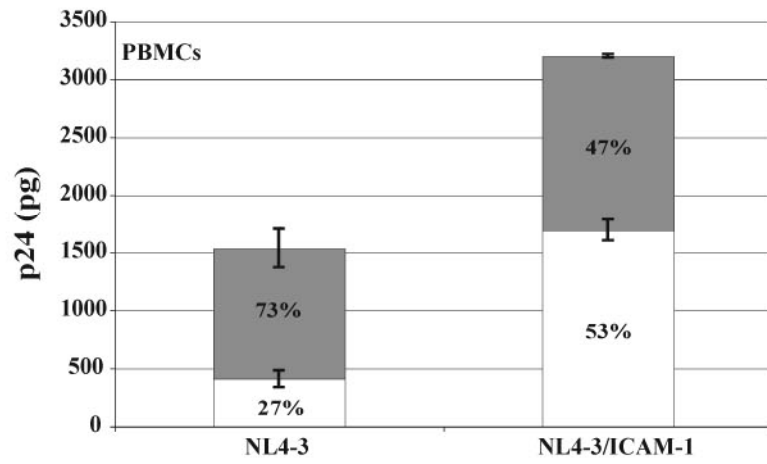


Figure 7

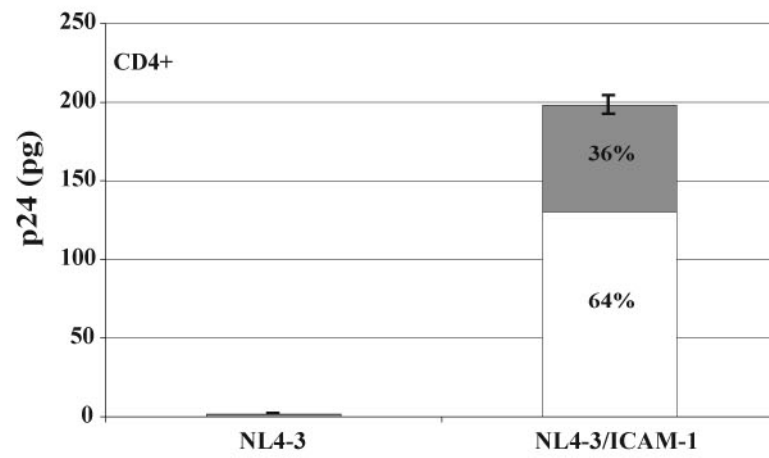
A



B

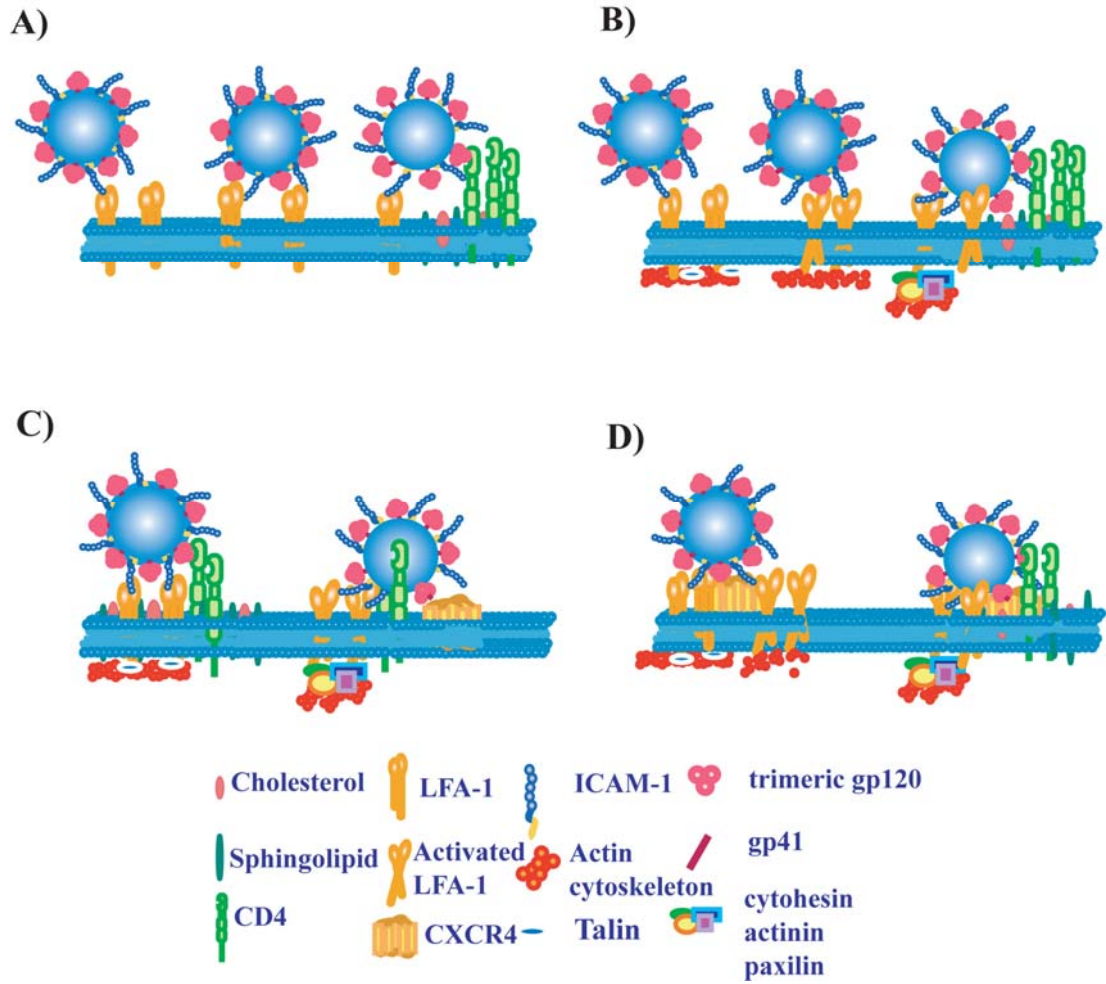


C



□ Cytosol ■ Vesicles

Figure 8



Chapitre V. Les éléments participant à la régulation du LFA-1 influencent l'entrée du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4⁺ activés.

Ce chapitre présente un manuscrit publié dans la revue *The Journal of Immunology* (2005 Jul 15;175(2) :926-35) et est constitué de la version finale telle que publiée.

5.1 Résumé

La fusion du VIH-1 est un processus complexe et dynamique qui requiert la concentration de plusieurs molécules de CD4 et de CXCR4/CCR5 au pore de fusion. D'autres molécules, telles que les molécules de l'hôte incorporées par le VIH-1 lors du bourgeonnement, peuvent cependant favoriser les étapes initiales du cycle viral, permettant une meilleure infection. Notre équipe a récemment démontré que l'interaction entre l'ICAM-1, présent dans l'enveloppe du VIH-1, et le LFA-1, exprimé sur les lymphocytes T CD4⁺, augmente la rapidité et l'efficacité d'adhésion de même que l'entrée du virus par fusion. Or, les mécanismes moléculaires orchestrant ce phénomène demeuraient jusqu'alors méconnus. Dans ces travaux, nous démontrons que la réorganisation du cytosquelette et les événements de signalisation participant au regroupement des molécules de LFA-1 dans la membrane sont nécessaires à l'augmentation de l'entrée des virus ancrant l'ICAM-1 dans leurs enveloppes. La formation des liens initiaux entre le VIH-1_{ICAM-1+} et la cellule T, de même que la formation du pore de fusion requièrent un enrichissement du LFA-1 au site de contact. Les amas de LFA-1 forment en effet un environnement favorable à la fusion puisqu'ils contiennent des molécules de CD4 et CXCR4. En conclusion, ces données amènent de nouveaux éléments à la conceptualisation du modèle décrivant les événements précoces du cycle de vie du VIH-1.

5.2 Article

Regulation of LFA-1 activity through cytoskeleton and signaling components modulates the efficiency of HIV-1 entry in activated CD4⁺ T lymphocytes

Mélanie R. Tardif[¶] and Michel J. Tremblay^{¶¶*}

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

Running title: LFA-1 clusters promote HIV-1 entry in CD4⁺ T cells

Key words: HIV, LFA-1, avidity, cytoskeleton, signaling

[¶] M.R.T. holds a Doctoral Award from the Canadian Institute of Health Research (CIHR)

^{¶¶} This work was financially supported by an operating grant to M.J. Tremblay from the CIHR HIV/AIDS Research Program (grant no. HOP-14438). M.J.T. is the recipient of the Canada Research Chair in Human Immuno-Retrovirology (senior level).

*Corresponding author, mailing address:

Laboratory of Human Immuno-Retrovirology

Research Center in Infectious Diseases, RC709

CHUL Research Center

2705 Laurier Blvd., Quebec (QC), Canada, G1V 4G2

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

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

Abstract

Besides interactions between the viral envelope glycoproteins with cell surface receptors, interactions between cell-derived molecules incorporated onto virions and their ligand could also modulate HIV-1 entry inside CD4⁺ T lymphocytes. Although incorporation of host ICAM-1 within HIV-1 increases both virus attachment and fusion, the precise mechanism through which this phenomenon is occurring is still unclear. We demonstrate here that activation of primary human CD4⁺ T lymphocytes increases LFA-1 affinity and avidity states, two events promoting the early events of HIV-1 replication cycle through interactions between virus-embedded host ICAM-1 and LFA-1 clusters. Confocal analyses suggest that HIV-1 is concentrated in microdomains rich in LFA-1 clusters that also contain CD4 and CXCR4 molecules. Experiments performed with specific inhibitors revealed that entry of HIV-1 in activated CD4⁺ T cells is regulated by LFA-1-dependent ZAP-70, PLC γ 1 and calpain enzymatic activities. By using laboratory and clinical strains of HIV-1 produced in primary human cells, we demonstrate the importance of LFA-1 activation state and cluster formation in the initial step of virus life cycle. Overall, these data provide new insights into the complex molecular events involved in HIV-1 binding and entry.

Introduction

Entry of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) into susceptible target cells is a complex and dynamic process involving several micro-events. Besides the normal association between the external envelope gp120 and the appropriate cell surface receptors, it has been proposed that interactions between host-derived molecules present on the virion and their cognate receptors on the target cell surface can also contribute to the formation of a fusion-competent environment. It is well established that HIV-1 incorporates a vast array of host cell membrane molecules during budding, including the InterCellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) (1-3). Interestingly, engagement of ICAM-1 with its natural counter-ligand LFA-1 increases viral infectivity by several folds. In CD4⁺ T lymphocytes that express functional LFA-1, this phenomenon is associated with an enhancement of both HIV-1 attachment and virus-cell fusion. It has been shown that the presence of host ICAM-1 onto virions favors fusion rather than endocytosis, the former being associated with a more productive HIV-1 infection process (4). Moreover, CD4 and CXCR4 molecules are essential to achieve an efficient infection with viruses lacking host ICAM-1 as well as with isogenic ICAM-1-bearing virions (4). The presence of virus-anchored host ICAM-1 confers also resistance to neutralization by antibodies and to the fusion inhibitor T-20 (5, 6). This reduced susceptibility to the antiviral activity of T-20 illustrates the critical role played by ICAM-1/LFA-1 interaction in the initial steps of the virus replication cycle. The exact molecular process by which ICAM-1-bearing virions are more efficiently entering LFA-1-expressing cells remains to be more clearly defined.

LFA-1-mediated adhesion is playing a key role in immune surveillance and the mounting of a potent immune response. More specifically, LFA-1 is involved in the arrest of rolling lymphocytes along blood vessels facilitating extravasation and migration of the activated T cells to infection sites. The β 2 integrin LFA-1 participates to the formation of the immunological synapse between T cells and antigen-presenting cells. These events require a rapid modulation of adhesion/de-adhesion and the adhesion needs to be stable for hours in order to sustain the immunological synapse. Hence, activation of LFA-1 must be tightly

regulated. Two mechanisms have been proposed for the regulation of LFA-1-mediated adhesion that include modulation of affinity and avidity (7-9). Affinity regulation refers to changes in individual $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ heterodimer that are linked to modifications in LFA-1 conformation. Recently, it has been discovered that LFA-1 can take three binding affinities, i.e. low, intermediate and high (10). In the low affinity conformation, the integrin adopts a bent state for which the head domain points toward cell membrane and cannot interact with its ligand. The acquisition of the intermediate and high affinity conformational states involves the unbending of both subunits to form the extended state. The intermediate binding affinity is induced by inside-out signaling triggered by an immunological synapse, chemokine or phorbol ester treatment (11), whereas the induction of LFA-1 under a high affinity state is achieved upon ligand binding and involves separation of the α and β subunits at their cytoplasmic, transmembrane and leg domains (12, 13). The high affinity state can be also generated in vitro by exposing cells to divalent cations such as manganese or magnesium (8). The avidity state of LFA-1 refers to distribution of the integrins in plasma membrane. Reorganization of LFA-1 into micro and macro-clusters on cell surface follows ligand binding and requires the release of the integrin tail to the actin cytoskeleton. Engagement of ICAM-1 induces outside-in signaling that triggers lateral diffusion of heterodimers in plasma membrane, a process regulating the adhesion strengthening (14-18). In naïve T cells, LFA-1 is maintained under a low affinity/avidity state (19, 20). Upon T cell activation, the inside-out signaling generates the intermediate affinity state and activates the cysteine protease calpain that releases LFA-1 from its cytoskeleton constraint and favors lateral diffusion of LFA-1 (12, 18, 21, 22). These phenomena trigger homotypic adhesion which induces in turn the formation of micro and macroclusters of LFA-1 at cell-cell contact interfaces (11). While affinity and avidity are differently controlled, the two mechanisms act in a concerted manner to achieve and maintain stable cell-to-cell adhesion (23-25). Furthermore, ligand-mediated signaling events have been shown to be important for the creation of new linkages with the actin cytoskeleton that reinforce and maintain stable adhesion (18).

Considering that LFA-1 is tightly regulated and its activation state is crucial to permit a firm and stable ICAM-1 binding, we addressed whether the LFA-1 activation state, intermediate lateral mobility and clustering can lead to a more efficient virus attachment and entry. Our results show that capture and internalization of ICAM-1-bearing virions are more efficient in cells expressing activated LFA-1 molecules. Moreover, LFA-1-mediated cytoskeleton remodeling and signaling events were found as key events to achieve an increase in HIV-1 entry in primary CD4⁺ T lymphocytes. We provide evidence that the noticed augmentation in virus entry is associated with an enrichment of CD4 and CXCR4 molecules in LFA-1 clusters, a process that increases the likelihood of virus-cell fusion upon stable HIV-1 adhesion.

Materials and Methods

Antibodies and reagents. The anti-LFA-1 monoclonal antibodies MEM25 (anti-CD11a) was provided by Dr. V. Horejsi (Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic). The anti-LFA-1 antibody mAb24, which is specific for an activation epitope, was obtained from Dr. N. Hogg (Cancer Research UK London Research Institute, London, UK). Recombinant human SDF-1 α (rhSDF-1 α) was purchased from Peptotech Canada Inc. (Ottawa, ON, Canada). The anti-CXCR4 12G5 and the hybridoma cell line that produces the anti-CD4 SIM.2 monoclonal antibody were provided by the AIDS Repository Reagent Program (Germantown, MD) while polyclonal anti-CD4 antibodies were produced in rabbits following immunization with recombinant soluble CD4 (kindly provided by Dr. R. Sweet, SmithKline Beecham). The hybridoma cell lines producing the anti-CD3 ζ OKT3 and anti-ICAM-1 R6.5 monoclonal antibodies were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). Purified anti-CD28 antibody (clone 9.3) was kindly provided by Dr. J.A. Ledbetter (Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute, Princeton, NJ). The goat anti-mouse was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratory Inc. (West Grove, PA). The hybridomas that produce 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 and ATCC, respectively. The R-phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Alexa 488-, Alexa 546- and Cy5- conjugated antibodies were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Jasplakinolide, calpeptin, U73122, piceatannol and PP2 were obtained from Calbiochem (San Diego, CA) and cytochalasin D from Sigma (St. Louis, MO). The fusion inhibitor T-20 was provided by Roche Bioscience (Palo Alto, CA).

Cells. 293T cells were provided by Dr. W.C. Greene (The J. Gladstone Institutes, San Francisco, CA) and were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

supplemented with 10% foetal calf serum (FCS). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation and CD4⁺ T cells were purified from freshly isolated PBMCs by immunomagnetic negative selection as indicated by the manufacturer (Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC). The purity of CD4⁺ T cells was determined by cytofluorometry analysis and was always greater than 97%. Purified CD4⁺ T cells were cultured for two days in RPMI medium supplemented with 10% FCS in the presence of phytohemagglutinin (PHA) (1 µg/ml) and recombinant human interleukin-2 (rhIL-2) (50 U/ml).

Plasmids and virus production. pNL4-3 is a full length infectious molecular clone of HIV-1. This vector was provided by the AIDS Repository Reagent Program. The pCD1.8 is an eukaryotic expression vector containing the entire human ICAM-1 (a generous gift from Dr. T. Springer, The Center for Blood Research, Boston, MA). Viruses differing only by the absence or the presence of host-encoded ICAM-1 proteins on their surface were produced by the calcium phosphate co-precipitation method in 293T cells as described previously (1). Production of laboratory (NL4-3) and clinical (92HT599) X4-tropic isolates of HIV-1 was achieved by infecting PBMCs for 7 days. Virus preparations were normalized for virion content by using an in-house enzymatic assay specific for the major viral p24 protein as described previously (3). In this test, 183-H12-5C and 31-90-25 are used in combination to quantify p24 levels.

Virus capture assay. The presence of host-encoded ICAM-1 on the surface of HIV-1 particles either produced by 293T cells or PBMCs was investigated using magnetic beads (BioMag, Fc specific; Perspective Diagnostics Inc., Cambridge, MA) coated with an anti-ICAM-1 (R6.5) or an isotype-matched irrelevant antibody (IgG_{2a}). Briefly, 12.5 µl of beads were incubated with virions (3 ng of p24) in a final volume of 1 ml of binding buffer (phosphate-buffered saline supplemented with 0.5% bovine serum albumin) and incubated for 1 h at 4°C on a rotating plate. Beads were then washed three times with binding buffer

with a magnetic separation unit and resuspended in 200 μ l of binding buffer. The amount of captured viruses was evaluated by the p24 assay.

Virus entry assay. PHA/IL-2-treated CD4⁺ T lymphocytes (5×10^5) were resuspended in 0.1 ml of culture medium containing isogenic HIV-1 particles either lacking (called NL4-3) or bearing host-derived ICAM-1 (called NL4-3/ICAM-1) (2.5 ng of p24 per 10^5 cells) or laboratory and clinical viruses produced in PBMCs (20 ng of p24 per 10^5 cells) and were incubated at 37°C for 1 or 2 h. To monitor the role played by the cytoskeleton and signaling proteins in the process of HIV-1 entry, cells were pretreated for 30 min at 37°C with various inhibitors before adding viruses. As a control, cells were pretreated with DMSO, the dissolving agent for the tested compounds. In some experiments, PHA activated CD4⁺ T cells were pretreated with an anti-LFA-1 (MEM25), an anti-CD4 antibody (i.e. SIM.2 at 20 μ g/ml), rhSDF-1 α (500 ng/ml) or T-20 (10 μ g/ml) for 30 min at 37°C to block either ICAM-1/LFA-1 interaction, the CD4 primary receptor the CXCR4 co-receptor or virus fusion. In other conditions, resting CD4⁺ T cells were incubated with viruses and rhSDF-1 α (1ng/ml), Mn²⁺ (2mM) or OKT3/9.3/goat anti-mouse (GAM) combination (1:1:10 μ g/ml) to activate LFA-1. After an incubation of 2 h with viruses at 37°C, cells were washed and trypsinized for 5 min to remove uninternalized viruses. Next, cells were first washed once with RPMI supplemented with 10% FCS and then twice with PBS before lysis in 200 μ l of ice-cold lysis buffer (20 mM HEPES [pH 7,4], 150 mM NaCl, 0.5 % Triton X-100). The amount of viruses entering cells was estimated by the p24 assay. This virus entry assay has been shown to allow measurements of viruses entering target cells through both cytosolic delivery (i.e. productive infection) and endocytosis (i.e. abortive infection) (4).

FACS analysis. To monitor LFA-1 affinity change in PHA/IL-2-treated CD4⁺ T lymphocytes, cells were incubated at 37°C for 15 min with mAb24 or an isotype-matched irrelevant antibody in the presence or absence of Mn²⁺. Cells were next washed with PBS and then incubated with a secondary antibody conjugated to R-phycoerythrin for 30 min at

4°C. After two washes, cells were fixed in 2% paraformaldehyde and analyzed by cell sorting (Epics ELITE ESP, Coulter Electronics, Burlington, ON).

Confocal microscopy. To evaluate the role of the cytoskeleton and of some signaling proteins in LFA-1 distribution in PHA/IL-2-treated CD4⁺ T lymphocytes, cells were either left untreated or treated with various drugs for 30 min at 37°C. Cells were then washed with binding buffer before incubation with an anti-LFA-1 (MEM25) (5 µg/ml) for 30 min on ice followed by a FITC-conjugated secondary antibody. For co-localization of LFA-1 and CD4, cells were also incubated with a polyclonal anti-CD4 (5 µg/ml) followed by an Alexa 633-conjugated secondary antibody. Next, cells were washed three times with binding buffer, fixed in 2% paraformaldehyde for 20 min at 4°C and slides were mounted in 90% glycerol in PBS. To localize bound and internalized HIV-1 particles, cells (1 x 10⁶ cells) were incubated for 90 min at 37°C with isogenic NL4-3 particles either lacking or bearing host ICAM-1 (100 ng of p24). Cells were fixed, permeabilized with 0.05% saponin, and incubated with rhodamine-conjugated phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR) and pooled human serum from HIV-1-positive patients for 45 min on ice to stain actin cytoskeleton and HIV-1, respectively. Cells were next washed and incubated for 30 min with goat anti-human IgG secondary antibody conjugated to Alexa 488. Slides were mounted as described above. To colocalize LFA-1 and HIV-1, CD4 and HIV-1, or CXCR4 and HIV-1, infected cells were incubated with anti-LFA-1 (mouse), anti-CD4 (rabbit), or anti-CXCR4 (mouse) antibodies for 30 min on ice followed by the appropriate secondary antibody (i.e. Cy5-, FITC- or Alexa 633-conjugated). Cells were washed 3 times with binding buffer, fixed in 2% paraformaldehyde for 20 min and permeabilized for 5 min at 37°C with 0.025% saponin in binding buffer. HIV-1 particles were stained as described above except for the secondary antibody which was conjugated with Alexa 546 instead of Alexa 488. LFA-1, CD4, CXCR4 and bound/internalized viruses were visualized by confocal laser scanning microscopy (Olympus Fluoview FV300, Melville, NY) and digital images were processed with Adobe Photoshop. All the images were taken under similar experimental conditions (i.e., exposure time, magnification and intensification) and the processing was also the same for all the images shown. Co-localization was analyzed with

the Metamorph Offline software version 6.1 (Universal Imaging Corp., West Chester, PA). The size of the slices used to acquire the confocal images was 1 μM .

Statistical analysis. Results presented are expressed as percentage of inhibition compared to untreated cells from 3 to 5 experiments. Statistical significance between groups was computed by Wilcoxon analysis. Calculations were made with InStat3 software. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Entry of laboratory and clinical strains of HIV-1 produced in primary human cells within activated CD4⁺ T cells is promoted by cell surface LFA-1. We initially monitored the presence of host-derived ICAM-1 in progeny virus produced in human embryonic kidney 293T cells, expressing or not ICAM-1, and in laboratory (NL4-3) and clinical (92HT599) X4-tropic variants of HIV-1 produced in PBMCs through the use of a virus capture assay. As expected, ICAM-1 is efficiently acquired by viruses produced in ICAM-1-expressing 293 T cells but not in ICAM-1-negative parental 293T cells (Fig. 1A). Moreover, both virus strains that were amplified in PBMCs were found to incorporate host-derived ICAM-1 (Fig. 1B). Next, to address whether the interaction between virus-anchored ICAM-1 and cell surface LFA-1 is contributing to the process of virus entry, a neutralizing anti-LFA-1 antibody (i.e., MEM25) was used to abolish this interaction. It should be noted that purified CD4⁺ T cells were used as targets to parallel in vivo situations. Since it has been shown that infection of quiescent peripheral CD4⁺ T cells by HIV-1 is non-productive and results in incomplete, labile, reverse transcripts, those target cells were treated with the lectin phytohemagglutinin (PHA), a powerful mitogenic agent used to mimic the activation from the immunological synapse. This treatment induces the LFA-1 intermediate affinity state and its release from the cytoskeleton, two events known to be required for an optimal interaction with ICAM-1. Results depicted in Fig. 1C indicate that entry of virions carrying host-derived ICAM-1 into PHA-stimulated primary CD4⁺ T cells is higher compared to virions lacking this adhesion molecule. Furthermore, internalization of viruses produced in ICAM-1-expressing 293T cells is significantly diminished upon treatment with an antibody that blocks the ICAM-1/LFA-1 interaction (i.e., MEM25), in contrast to viruses produced in ICAM-1-negative 293T cells. Interestingly, entry of virions amplified in primary human cells was also reduced upon treatment with the blocking anti-LFA-1 antibody (Fig. 1D). We evaluated also the possible role played by CD4 and CXCR4 in entry of the studied virus preparations. Results demonstrate that entry of virions lacking ICAM-1 in activated CD4⁺ T cells are not affected by agents that block gp120/CD4 (i.e. SIM.2) and gp120/CXCR4 interactions (i.e. SDF-1 α)

as well as by a fusion inhibitor (i.e. T-20) (Fig. 2). These data suggest that, at least under the tested experimental conditions (i.e. virus entry monitored 2 hours following infection), virions lacking host ICAM-1 are mainly internalized by endocytosis and not through fusion in the studied target cells. In contrast, isogenic ICAM-1-bearing viruses were found to be sensitive to all blocking agents studied including MEM25. These results are in agreement with our previous work demonstrating that the presence of host ICAM-1 favors entry of HIV-1 particles through fusion, a process known to result in productive infection (4). Overall, our data indicate that the association between virus-anchored host ICAM-1 and cell surface LFA-1 plays a key role in the initial steps of HIV-1 life cycle in activated CD4⁺ T cells by increasing virus attachment and fusion as described previously (4, 26).

Activation of LFA-1 by distinct stimuli leads to a more efficient HIV-1 entry in CD4⁺ T lymphocytes. Before the recent discovery of the intermediate LFA-1 affinity state, it was proposed that PHA does not modify the conformational state of LFA-1 but induces rather the formation of LFA-1 clusters on the plasma membrane (8, 21). Based on recently described findings (10), it seems that PHA induces both the intermediate LFA-1 affinity state as well as lateral mobility of LFA-1, two events that are required for integrin clustering. Under physiological conditions, activation of LFA-1 is triggered by an inside-out signal via T-cell receptor (TCR)-mediated signal transduction that leads to activation of protein kinase C (PKC) and intracellular calcium mobilization (27-29). PHA is used here because it cross-links the TCR complex and triggers signaling cascades similar to the one engaged by the immunological synapse or through the use of anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. As shown in Fig. 3A, LFA-1 molecules are randomly dispersed and expressed at lower levels on resting compared to activated CD4⁺ T cells (i.e. PHA-treated). As expected, addition of PHA resulted also in cell size expansion (19, 20). Moreover, micro and macroclusters of LFA-1 can be seen onto PHA-treated CD4⁺ T lymphocytes, thus indicating an earlier ICAM-1/LFA-1-mediated homotypic cell-cell adhesion. Next, we investigated whether PHA stimulation can also modulate the affinity state of LFA-1 and expose the high-affinity epitope. To this end, a series of investigations was performed with the mAb24 antibody that is specific for the high affinity epitope of LFA-1 but not the

intermediate one. As expected, cytofluorometry analyses indicated that PHA does not induce the high affinity state of the integrin as opposed to cells treated with the manganese (Mn^{2+}) cation that were used as a positive control (Fig. 3B). These results suggest that the capture of ICAM-1-bearing HIV-1 particles by PHA-activated $CD4^+$ T cells does not involve LFA-1 under a high affinity state but rather when LFA-1 is under an intermediate affinity state and its mobility induced. In order to investigate the impact of more physiologic stimuli on LFA-1 activation and consequently on the initial steps of HIV-1 life cycle, resting $CD4^+$ T cells were incubated with viruses and various stimuli such as rhSDF-1 α (using a final concentration smaller than the one necessary to inhibit infection with X4-tropic virus) and Mn^{2+} , which induce the intermediate and high affinity LFA-1 state, respectively. Moreover, antibody-mediated engagement of both TCR and CD28 was also tested based on the idea that it induces the intermediate LFA-1 affinity state, releases the integrins from their cytoskeleton constraint and triggers cell-to-cell adhesion. Results depicted in Fig. 4 indicate that entry of ICAM-1-bearing virions is enhanced upon engagement of TCR and CD28 when using OKT3 and 9.3 antibodies while internalization of isogenic viruses lacking host ICAM-1 was unaffected. A less significant enhancement of entry of ICAM-1-bearing viruses was seen when using SDF-1 α and Mn^{2+} .

Clustering of LFA-1 can be seen after cell-to-cell contact that is resulting from PHA, PMA, or OKT3/9.3 treatment. Reorganization of integrins in plasma membrane is regulated by their links with the actin cytoskeleton. The association of LFA-1 with the cytoskeleton has been reported to regulate cluster formation, preserve the physical integrity of such structures and strengthen cell-to-cell adhesion (12, 18, 21-25). To assess whether cytoskeleton remodeling is critical for formation and preservation of LFA-1 clusters, cells were subjected to drugs affecting the actin cytoskeleton before LFA-1 labeling and confocal analysis. Results from this set of experiments demonstrate that a functional actin cytoskeleton is vital for the formation and preservation of LFA-1 clusters as both jasplakinolide and cytochalasin D diminished LFA-1 clustering (Fig. 5A), findings that are confirmed by a previous study (30). These two drugs can disperse LFA-1 clusters through different mechanisms. Jasplakinolide triggers uncontrolled actin polymerization and stabilization of pre-existing F-actin, thus restraining LFA-1 lateral motility, whereas

cytochalasin D promotes actin depolymerization and induces lateral diffusion of the integrin. In the latter case, LFA-1 is no longer tethered to the cytoskeleton and formation of new links is rendered not feasible. To assess whether an intact cytoskeleton and LFA-1 movement within the plasma membrane are required for a more efficient internalization of HIV-1 in primary human CD4⁺ T cells, the degree of virus entry was measured in cells treated with jasplakinolide and cytochalasin D. Infection was first performed with isogenic NL4-3 particles produced in 293T cells that differed only by the absence or presence of host-derived ICAM-1. The process of entry of progeny virus bearing host ICAM-1 is significantly diminished by both drugs (i.e., 48 and 43% reduction upon treatment with jasplakinolide and cytochalasin D, respectively) while entry of isogenic virions lacking ICAM-1 is almost unaffected (Fig. 5B). These results are not due to a reduction in surface expression of CD4 and CXCR4 since entry of virions lacking host-derived ICAM-1 is unaffected by the tested compounds. Such observations are expected considering that these drugs usually block recycling of receptors (e.g. internalization of CCR5) (31). The entry process of HIV-1 variants that were amplified in PBMCs was also greatly reduced by the tested compounds (Fig. 5C), therefore confirming that the lateral motility of LFA-1 as well as a dynamic cytoskeleton are both important to allow entry in CD4⁺ T cells of viruses produced in a physiological cellular reservoir.

LFA-1-mediated augmentation of HIV-1 entry necessitates ZAP-70 and PLC γ 1 activities. In order to characterize signaling events involved in formation and preservation of LFA-1 clusters, we evaluated LFA-1 distribution in PHA-activated CD4⁺ T cells upon treatment with inhibitors specific for some signal transducers. We focused on c-Src kinases (e.g. Lck, Fyn), SYK/ZAP-70 kinases and phospholipase C gamma 1 (PLC γ 1) since they have been demonstrated to play an important role in LFA-1 activation. As shown in Fig. 6A, clustering of LFA-1 was weakly sensitive to the c-Src kinase inhibitor PP2 and ZAP-70 inhibitor piceatannol. In contrast, LFA-1 clusters were dispersed upon treatment of CD4⁺ T lymphocytes with U73122, a PLC-specific inhibitor. This is consistent with a recent work showing that PLC γ 1 is crucial for spatial regulation of LFA-1 through Rap1 and RapL (32). However, even though clustering of LFA-1 is unaffected upon inhibition of c-Src kinases and ZAP-70, there is a possibility that such inhibitors could inhibit the signaling cascade

required to stabilize ligand attachment and subsequent LFA-1 activation. This scenario was studied by monitoring virus entry in cells treated with the tested compounds. Results from Fig. 6B illustrate that the c-Src kinase activity is not involved in HIV-1 entry since PP2 exerts a minimal effect on HIV-1 uptake. However, ZAP-70 and PLC γ 1 are playing a key role in entry of ICAM-1-bearing virions (40 and 60% reduction upon treatment with piceatannol and U73122, respectively) but not of viruses lacking host ICAM-1 in CD4⁺ T lymphocytes. More importantly, similar observations were made when experiments were performed with laboratory (NL4-3) and clinical (92HT599) strains HIV-1 that were produced in PBMCs (Fig. 6C). The contribution of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in the LFA-1-mediated enhancement of HIV-1 entry was next tested because PI3K acts as a potent activator of LFA-1 (33). Entry of ICAM-1-bearing HIV-1 particles in primary human CD4⁺ T cells was unaffected by a treatment with the PI3K inhibitor wortmannin (data not shown), thus indicating that this intracellular signaling protein is not involved as it is the case for ZAP-70 and PLC γ 1.

Cystein protease calpain is important for HIV-1 internalization in CD4⁺ T cells.

Cluster formation requires lateral mobility of LFA-1 molecules, a process that increases the frequency of interactions with dispersed ICAM-1. The cystein protease calpain is crucial for promoting rapid LFA-1-mediated adhesion by allowing lateral movement of this integrin on the plasma membrane when ICAM-1 is present at a low density (33). It was reported that treatment of T cells with a calpain inhibitor reduces both PMA- and TCR-stimulated cell-to-cell adhesion (21). Furthermore, it was shown that calpain is essential in regulating LFA-1 affinity by cleavage of talin, a protein that links the integrin with the actin cytoskeleton and induces LFA-1 activation (12, 22). To assess the implication of calpain-mediated LFA-1 activation and lateral mobility in the observed enhancement of virus entry, target cells were treated with the calpain inhibitor calpeptin after PHA treatment. Calpeptin does not affect the distribution of LFA-1 in clusters on the surface of PHA-activated CD4⁺ T lymphocytes (Fig. 7A). Interestingly, entry of ICAM-1-bearing NL4-3 particles is reduced by 24% while internalization of isogenic viruses lacking ICAM-1 is not affected (Fig. 7B). Similarly, entry of NL4-3 and 92HT599 that were produced in PBMCs was diminished by 43 and 32%, respectively (Fig. 7C). This confirms that

internalization of ICAM-1-bearing virions in primary CD4⁺ T cells requires a lateral mobility of the integrin LFA-1.

HIV-1 co-localizes with LFA-1 clusters in activated CD4⁺ T lymphocytes. Our previous observations suggest that the initial steps in HIV-1 life cycle when put in contact with activated CD4⁺ T lymphocytes require a dynamic clustering of LFA-1 to achieve an efficient virus entry process. These results imply that virions are most likely patched on the plasma membrane and co-localized with LFA-1 clusters. This possibility was first tested by analyzing the distribution of viruses either lacking or bearing host ICAM-1 on the studied target cells. Confocal microscopic analyses revealed that a barely detectable amount of virions lacking ICAM-1 is found associated with activated CD4⁺ T cells, whereas large quantities of ICAM-1-bearing viruses are concentrated in some specific areas on target cells (Fig. 8). Localization of LFA-1, CD4 and HIV-1 was then monitored in an attempt to detect possible co-localization events through the use of the Metamorph® Imaging System. This is a powerful system for performing operations such as quantitative measurement of co-localization events. This tool allows measurements for the area, averages gray scale intensity and integrates gray scale intensity of regions for which different fluorescent probes are overlapped. Results were thus generated using the most recent bio-imaging technology. Co-localization images represent the superposition of pixels from two and/or three colors calculated by the Metamorph algorithms. As depicted Fig. 9, very few co-localization events between CD4 and HIV-1 (panel F, magenta color), CXCR4 and HIV-1 (panel L, white color) CXCR4, CD4 and HIV-1 (panel N, pink color) are seen upon infection of activated CD4⁺ T lymphocytes with ICAM-1-bearing virions. However, a high proportion of HIV-1 particles carrying host ICAM-1 colocalizes with LFA-1 following incubation with PHA-activated CD4⁺ T lymphocytes (panel E, yellow color). Moreover, a large fraction of CD4 molecules is present into LFA-1 clusters (around 40%) (panel D, white color). However, co-localization of HIV-1 particles with CD4 relies primarily on the co-localization of virions with LFA-1. Indeed, co-localization of LFA-1, CD4 and ICAM-1-bearing viruses (panel G, pink color) is similar to co-localization of CD4 and virions (panel F, magenta color). Given that attachment of virions lacking host ICAM-1 is barely

detectable, co-localization events cannot be detected (data not shown). It should be stated that the very low amounts of ICAM-1-negative viruses were not concentrated in LFA-1 clusters but were randomly distributed around surface of CD4⁺ T lymphocytes (data not shown). Altogether, these data indicate that a high amount of ICAM-1-bearing viruses is captured by LFA-1 under an activated state and only a small fraction of progeny virus is also attached to CD4 and CXCR4.

Discussion

Intermediate affinity, lateral mobility and clustering of LFA-1 are thought to play a dominant role in cell-to-cell adhesion since these two processes facilitate the interaction between LFA-1 and ICAM-1 as well as the transport of molecules to the cell-to-cell contact area. The data shown in the present work indicate that LFA-1-mediated adhesion is also important for HIV-1 to attach to and gain entry within activated CD4⁺ T lymphocytes, a cell type considered as a major cellular reservoir in infected individuals. It can be proposed that molecular events involved in attachment of HIV-1 to LFA-1-expressing cells might be different from events required for the more traditional ICAM-1/LFA-1-mediated cell-to-cell adhesion. Indeed, when one considers the small diameter of HIV-1 (100 nm compared to at least 10 nm for most cells of the immune system), viruses carrying host ICAM-1 on their exterior surface might behave as a multivalent soluble ligand. We provide evidence that activation of LFA-1 which results in induction of intermediate binding affinity state, lateral mobility and clustering of the integrins is the mechanism through which PHA-activated CD4⁺ T cells capture more efficiently ICAM-1-bearing viruses compared to isogenic virions lacking host-derived ICAM-1. The physiological relevance of such findings is high considering that the adhesion molecule ICAM-1 is efficiently acquired by all tested clinical strains of HIV-1 bearing different tropisms (R5 and X4) that were produced in primary human cells (3, 34-37). Data presented in this work were confirmed with a X4-tropic variant of HIV-1 (92HT599) expanded in PBMCs that was used to inoculate primary CD4⁺ T lymphocytes. Thus, the overall importance of the interaction between virus-anchored host ICAM-1 and cell surface LFA-1 has been established with a primary isolate of HIV-1, which provides clinical relevance to these observations. An indirect proof of the relative contribution of the ICAM-1/LFA-1 association when natural cellular reservoirs of HIV-1 are infected with primary viral isolates has been obtained in previous works. For example, it was demonstrated that infection of human lymphoid tissue cultured *ex vivo* with primary R5- and X4-tropic isolates of HIV-1 that were expanded in PBMCs was severely reduced by a treatment with a blocking anti-ICAM-1 antibody (3). More recently, a reduction in virus replication was seen when R5- and X4-tropic field

isolates of HIV-1 amplified in PBMCs were used to infect mitogen-stimulated PBMCs that were treated this time with a blocking anti-LFA-1 antibody (3).

Previous studies have indicated that changes in binding affinity, lateral mobility and clustering of the β_2 integrins such as LFA-1 is influenced by a number of molecular events including polymerization/depolymerization of actin, generation of intracellular second messengers (calcium and diacylglycerol/DAG), activation of protein kinase C (PKC), PI3K and the small GTPases Rap1 and RapL (38-41). The formation and lateral movement of LFA-1 clusters on the plasma membrane are active processes that require the release from cytoskeleton constraints. Conversely, actin polymerization is crucial for stabilizing clusters and maintaining cell-to-cell adhesion (12, 18, 21, 22); (23-25). While the involvement of cytoskeleton remodeling in LFA-1 activation is well established, we wanted to investigate its role in the early steps of HIV-1 life cycle. We found that alteration of polymerization/depolymerization of actin cytoskeleton disrupts LFA-1 patches and reduces the ability of HIV-1 to enter inside activated CD4⁺ T lymphocytes. The importance of ICAM-1/LFA-1 interaction in the observed phenomenon is depicted by the observation that entry of isogenic virions lacking ICAM-1 is not modulated by agents that affect actin cytoskeleton. An intact cytoskeleton is thus essential for maintaining the dynamic structure of LFA-1 clusters, which are subjected to a rapid turnover. Changing the equilibrium between free and cytoskeleton-linked LFA-1 impairs the ability of the integrin to efficiently bind to its natural ligand ICAM-1. LFA-1-mediated signaling also requires a dynamic cytoskeleton to cluster together to enhance T cell adhesion upon ligand binding (30).

It is well established that engagement of LFA-1 by ICAM-1 triggers a signaling cascade leading to activation of c-Src kinases and ZAP-70, tyrosine phosphorylation of PLC γ 1, phospholipids hydrolysis, activation of different isoforms of PKC and mobilization of intracellular calcium (42-47). Those signaling events are important for the establishment of new linkages with the actin cytoskeleton that reinforce and maintain stable cellular adhesion through clustering. Our results demonstrate for the first time the contribution of ZAP-70 but not c-Src kinases in entry of HIV-1 particles in primary human CD4⁺ T cells.

Therefore, LFA-1-mediated activation of ZAP-70 that is mediated upon HIV-1 attachment seems to be important for the entry process. Even though inhibition of ZAP-70 has no effect on LFA-1 distribution, it can perturb some more downstream events. PLC γ 1, a known effector of receptor tyrosine kinase signaling, is also recognized as a signal transducer that is acting downstream from ZAP-70. This protein is essential for spatial organization of LFA-1 in clusters and the induction of intermediate and high affinity states. Inhibition of PLC γ 1 leads to disruption of LFA-1 clusters and results in a reduced entry of HIV-1 particles harboring ICAM-1 in their envelope. By hydrolyzing phosphatidylinositol-4',5'-bisphosphate (PIP2), PLC γ 1 generates two important second messengers, calcium and DAG, that are crucial for LFA-1 activation through Rap1 (32). On the other hand, PIP2 is an important regulator of the actin cytoskeleton. Several lines of evidence indicate that accumulation of PIP2, following inactivation of PLC γ 1, increases actin polymerization and cytoskeleton constraints of LFA-1 are enhanced through the activation of the actin-linker talin (48). The cleavage of talin by the protease calpain is known to lead to LFA-1 activation (20,21). Calpain is a cysteine protease activated by calcium; a second messenger produced by the activation of PLC γ 1. Inhibition of calpain has no effect on preformed LFA-1 clusters, but might considerably affect subsequent cluster formation and strengthen adhesion since its inhibition diminishes entry of ICAM-1-bearing virions. Together, our results indicate that clustering of LFA-1 is a key event to allow an efficient HIV-1 attachment to and entry in CD4-expressing T cells. Given that we provide evidence that most ICAM-1-bearing HIV-1 particles colocalize with LFA-1 clusters, it can be postulated that attachment of such virions to cell surface LFA-1 clusters might occur even before engagement of CD4 molecules. Binding of viruses to LFA-1 might in turn trigger outside-in signaling that might favor a firmer docking of the viral entity onto the target cell surface, a process that might facilitate the subsequent encounter with an appropriate number of CD4 and co-receptors.

The formation of an immunological synapse is always accompanied by clustering of LFA-1. It was recently reported that HIV-1 dissemination through a direct cell-to-cell transfer is efficiently achieved upon the creation of a virological synapse (49). This structure relies on rapid recruitment to the cellular interface of CD4, CXCR4, talin and LFA-1 on the target

cell, and of virus-produced Env and Gag proteins on the effector cell. We hypothesize here that the presence of ICAM-1 onto HIV-1 particles and of LFA-1 clusters on target cells can have a similar positive effect on virus-cell interactions as it does for cell-to-cell transfer of the virus. By using LFA-1 clusters to firmly attach to the surface of target cells, HIV-1 particles may not have to reorganize CD4 and CXCR4 distribution on the cellular membrane and fusion can thus be facilitated. Interestingly, data from confocal analyses aimed at localizing LFA-1 and CD4 molecules on PHA-activated CD4⁺ T cells revealed that CD4 is primarily located in LFA-1 clusters, independently of viral infection. Therefore, microdomains that contain LFA-1 clusters represent ideal environments on the cell surface membrane to gain entry into target cells. This hypothesis is confirmed by the observation that ICAM-1-bearing virions colocalize with LFA-1 clusters and also partly with CD4. Among viral particles colocalizing with the CD4 glycoprotein, a small proportion also colocalizes with the chemokine coreceptor CXCR4. Once strongly attached to LFA-1, HIV-1 may bind CD4 leading to a conformational change in the viral envelope permitting its engagement with the appropriate coreceptor. Since clustering of LFA-1 might lead to enrichment of CD4 and CXCR4 molecules in close vicinity, the process of fusion of viral and cellular membranes might be facilitated.

In summary, this study confirms the key role played by interactions between virus-associated host ICAM-1 and cell surface LFA-1 in HIV-1 biology. These results provide additional clues for the understanding of the very complex nature of the initial steps in the life cycle of HIV-1. A better knowledge of cellular factors relevant for the initiation of infection is crucial for the development of new pharmacological approaches targeting HIV-1 permissive cells. Considering that statins, a family of drugs commonly used for the treatment of hypercholesterolemia, selectively blocked LFA-1-mediated adhesion to ICAM-1 (50), it can be postulated that statins should be considered as additional compounds in the current arsenal that is used for the treatment of HIV-1-infected individuals. Interestingly, two members of the statins family (i.e., lovastatin and simvastatin) were recently shown to diminish the process of HIV-1 infection by impairing the association between virus-associated host ICAM-1 and cell surface LFA-1 (51). Statins

were also found to reduce viral load and increase CD4⁺ T cells counts in chronically HIV-1-infected patients (52), thus providing additional credence to the importance of interactions between ICAM-1 and LFA-1 in the pathogenesis of HIV-1 infection.

Acknowledgements

We are grateful to S. Méthot for editorial assistance and M. Imbeault for his assistance with the Metamorph software. We thank Dr. M. Dufour for performing flow cytometric analyses.

References

1. 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.
2. Fortin, J. F., R. Cantin, and M. J. Tremblay. 1998. T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1. *J Virol* 72:2105.
3. 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.
4. 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.
5. Fortin, J. F., R. Cantin, M. G. Bergeron, and M. J. Tremblay. 2000. Interaction between virion-bound host intercellular adhesion molecule-1 and the high-affinity state of lymphocyte function-associated antigen-1 on target cells renders R5 and X4 isolates of human immunodeficiency virus type 1 more refractory to neutralization. *Virology* 268:493.
6. 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.
7. Bazzoni, G., and M. E. Hemler. 1998. Are changes in integrin affinity and conformation overemphasized? *Trends Biochem Sci* 23:30.
8. Stewart, M., and N. Hogg. 1996. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J Cell Biochem* 61:554.
9. van Kooyk, Y., and C. G. Figdor. 2000. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 12:542.

10. Shimaoka, M., T. Xiao, J. H. Liu, Y. Yang, Y. Dong, C. D. Jun, A. McCormack, R. Zhang, A. Joachimiak, J. Takagi, J. H. Wang, and T. A. Springer. 2003. Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell* 112:99.
11. Kim, M., C. V. Carman, W. Yang, A. Salas, and T. A. Springer. 2004. The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin {alpha}L{beta}2. *J Cell Biol* 167:1241.
12. Kim, M., C. V. Carman, and T. A. Springer. 2003. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* 301:1720.
13. Takagi, J., B. M. Petre, T. Walz, and T. A. Springer. 2002. Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 110:599.
14. van Kooyk, Y., P. Weder, F. Hogervorst, A. J. Verhoeven, G. van Seventer, A. A. te Velde, J. Borst, G. D. Keizer, and C. G. Figdor. 1991. Activation of LFA-1 through a Ca²⁺(+)-dependent epitope stimulates lymphocyte adhesion. *J Cell Biol* 112:345.
15. van Kooyk, Y., P. Weder, K. Heije, and C. G. Figdor. 1994. Extracellular Ca²⁺ modulates leukocyte function-associated antigen-1 cell surface distribution on T lymphocytes and consequently affects cell adhesion. *J Cell Biol* 124:1061.
16. van Kooyk, Y., S. J. van Vliet, and C. G. Figdor. 1999. The actin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes. *J Biol Chem* 274:26869.
17. Krauss, K., and P. Altevogt. 1999. Integrin leukocyte function-associated antigen-1-mediated cell binding can be activated by clustering of membrane rafts. *J Biol Chem* 274:36921.
18. Dustin, M. L., T. G. Bivona, and M. R. Philips. 2004. Membranes as messengers in T cell adhesion signaling. *Nat Immunol* 5:363.
19. Smith, C. W., S. D. Marlin, R. Rothlein, C. Toman, and D. C. Anderson. 1989. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* 83:2008.

20. Sampath, R., P. J. Gallagher, and F. M. Pavalko. 1998. Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin. *J Biol Chem* 273:33588.
21. Stewart, M. P., A. McDowall, and N. Hogg. 1998. LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca²⁺-dependent protease, calpain. *J Cell Biol* 140:699.
22. Yan, B., D. A. Calderwood, B. Yaspan, and M. H. Ginsberg. 2001. Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 276:28164.
23. Erb, E. M., K. Tangemann, B. Bohrmann, B. Muller, and J. Engel. 1997. Integrin alphaIIb beta3 reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding. *Biochemistry* 36:7395.
24. Tadokoro, S., S. J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R. C. Liddington, J. M. de Pereda, M. H. Ginsberg, and D. A. Calderwood. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302:103.
25. Calderwood, D. A. 2004. Integrin activation. *J Cell Sci* 117:657.
26. Beausejour, Y., and M. J. Tremblay. 2004. Susceptibility of HIV type 1 to the fusion inhibitor T-20 is reduced on insertion of host intercellular adhesion molecule 1 in the virus membrane. *J Infect Dis* 190:894.
27. Lub, M., Y. van Kooyk, and C. G. Figdor. 1995. Ins and outs of LFA-1. *Immunol Today* 16:479.
28. van Kooyk, Y., P. van de Wiel-van Kemenade, P. Weder, T. W. Kuijpers, and C. G. Figdor. 1989. Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature* 342:811.
29. Dustin, M. L., and T. A. Springer. 1989. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341:619.
30. Porter, J. C., M. Bracke, A. Smith, D. Davies, and N. Hogg. 2002. Signaling through integrin LFA-1 leads to filamentous actin polymerization and remodeling, resulting in enhanced T cell adhesion. *J Immunol* 168:6330.
31. Mueller, A., and P. G. Strange. 2004. Mechanisms of internalization and recycling of the chemokine receptor, CCR5. *Eur J Biochem* 271:243.

32. Katagiri, K., M. Shimonaka, and T. Kinashi. 2004. Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C-gamma1. *J Biol Chem* 279:11875.
33. Constantin, G., M. Majeed, C. Giagulli, L. Piccio, J. Y. Kim, E. C. Butcher, and C. Laudanna. 2000. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 13:759.
34. Bastiani, L., S. Laal, M. Kim, and S. Zolla-Pazner. 1997. Host cell-dependent alterations in envelope components of human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* 71:3444.
35. Cantin, R., J. F. Fortin, and M. Tremblay. 1996. The amount of host HLA-DR proteins acquired by HIV-1 is virus strain- and cell type-specific. *Virology* 218:372.
36. Capobianchi, M. R., S. Fais, C. Castilletti, M. Gentile, F. Ameglio, and F. Dianzani. 1994. A simple and reliable method to detect cell membrane proteins on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Infect Dis* 169:886.
37. Frank, I., H. Stoiber, S. Godar, H. Stockinger, F. Steindl, H. W. Katinger, and M. P. Dierich. 1996. Acquisition of host cell-surface-derived molecules by HIV-1. *Aids* 10:1611.
38. Calderwood, D. A., S. J. Shattil, and M. H. Ginsberg. 2000. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem* 275:22607.
39. Yamada, K. M., and S. Miyamoto. 1995. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol* 7:681.
40. Katagiri, K., M. Hattori, N. Minato, S. Irie, K. Takatsu, and T. Kinashi. 2000. Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Mol Cell Biol* 20:1956.
41. Sebzda, E., M. Bracke, T. Tugal, N. Hogg, and D. A. Cantrell. 2002. Rap1A positively regulates T cells via integrin activation rather than inhibiting lymphocyte signaling. *Nat Immunol* 3:251.

42. Kanner, S. B., L. S. Grosmaire, J. A. Ledbetter, and N. K. Damle. 1993. Beta 2-integrin LFA-1 signaling through phospholipase C-gamma 1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:7099.
43. Petruzzelli, L., M. Takami, and R. Herrera. 1996. Adhesion through the interaction of lymphocyte function-associated antigen-1 with intracellular adhesion molecule-1 induces tyrosine phosphorylation of p130cas and its association with c-CrkII. *J Biol Chem* 271:7796.
44. Pyszniak, A. M., C. Carpenito, and F. Takei. 1997. The role of LFA-1 (CD11a/CD18) cytoplasmic domains in binding to intercellular adhesion molecule-1 (CD54) and in postreceptor cell spreading. *Exp Cell Res* 233:78.
45. Wacholtz, M. C., S. S. Patel, and P. E. Lipsky. 1989. Leukocyte function-associated antigen 1 is an activation molecule for human T cells. *J Exp Med* 170:431.
46. Rodriguez-Fernandez, J. L., M. Gomez, A. Luque, N. Hogg, F. Sanchez-Madrid, and C. Cabanas. 1999. The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes. *Mol Biol Cell* 10:1891.
47. Rodriguez-Fernandez, J. L., L. Sanchez-Martin, M. Rey, M. Vicente-Manzanares, S. Narumiya, J. Teixido, F. Sanchez-Madrid, and C. Cabanas. 2001. Rho and Rho-associated kinase modulate the tyrosine kinase PYK2 in T- cells through regulation of the activity of the integrin LFA-1. *J Biol Chem* 276:40518.
48. Yin, H. L., and P. A. Janmey. 2003. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol* 65:761.
49. Jolly, C., K. Kashefi, M. Hollinshead, and Q. J. Sattentau. 2004. HIV-1 Cell to Cell Transfer across an Env-induced, Actin-dependent Synapse. *J Exp Med* 199:283.
50. Weitz-Schmidt, G., K. Welzenbach, V. Brinkmann, T. Kamata, J. Kallen, C. Bruns, S. Cottens, Y. Takada, and U. Hommel. 2001. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 7:687.
51. Giguere, J. F., and M. J. Tremblay. 2004. Statin Compounds Reduce Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by Preventing the Interaction between

Virion-Associated Host Intercellular Adhesion Molecule 1 and Its Natural Cell Surface Ligand LFA-1. *J Virol* 78:12062.

52. del Real, G., S. Jimenez-Baranda, E. Mira, R. A. Lacalle, P. Lucas, C. Gomez-Mouton, M. Alegret, J. M. Pena, M. Rodriguez-Zapata, M. Alvarez-Mon, A. C. Martinez, and S. Manes. 2004. Statins inhibit HIV-1 infection by down-regulating Rho activity. *J Exp Med* 200:541.

Figure legends

Figure 1. Virions produced in primary human cells incorporate host ICAM-1, which plays an important role in the early steps of HIV-1 life cycle. Virus stocks were produced either in 293T cells (A) or PBMCs (B) and subjected to a virus capture assay as described in Materials and Methods. Purified CD4⁺ T lymphocytes (1×10^6 cells) were first treated for two days with PHA and IL-2 and were either left untreated or treated for 30 min at 37°C with the blocking anti-LFA-1 antibody MEM25. Cells were next incubated at 37°C for 90 min with NL4-3 and 92HT599 (200 ng of p24) that were produced in 293T cells (C) and PBMCs (D), respectively. Cells were then extensively washed with PBS, treated with trypsin to remove bound viruses, and lysed to measure the p24 content. The data shown represent the means \pm standard deviations (SD) from triplicate samples and are representative of three separate experiments.

Figure 2. Entry of ICAM-1-bearing virions in CD4⁺ T cells requires CD4 and CXCR4 molecules. Activated CD4⁺ T lymphocytes were either left untreated or treated with SIM.2 (20 μ g/ml), rhSDF-1 α (500 ng/ml), T-20 (10 μ g/ml), or MEM25 (10 μ g/ml) and then inoculated with NL4-3 virions either lacking or bearing host-derived ICAM-1. Cells were incubated with virus stocks for 90 min at 37°C, washed, trypsinized and lysed to estimate p24 contents. The data shown represent the means \pm standard deviations (SD) from triplicate samples and are representative of three separate experiments.

Figure 3. Treatment of CD4⁺ T cells with PHA leads to LFA-1 clustering. Purified CD4⁺ T lymphocytes were either left untreated or treated with PHA and IL-2 for two days. (A) Resting and PHA-activated CD4⁺ T cells were labeled with a mouse anti-CD11a/FITC-conjugated goat anti-mouse combination. Cells were visualized by confocal microscopy. The images are 3D reconstructed Z series and the individual sections are taken along the x-y axes. Arrows indicate LFA-1 clusters. Bars: 10 μ m. Data shown are representative of three separate experiments. (B) Resting and PHA/IL-2-treated CD4⁺ T cells were incubated

with mAb24. In some instance, cells were also treated with EGTA and Mn^{2+} . Finally, cells were subjected to flow cytometry to monitor the percentage of cells expressing the mAb24 epitope.

Figure 4. Attachment and entry of ICAM-1-bearing viruses are also increased upon LFA-1 activation by stimuli other than PHA. First, resting $CD4^+$ T cells were either left untreated or treated with rhSDF-1 α (1 ng/ml), Mn^{2+} (2 mM), or OKT3/9.3 combination (1/1/10 μ g/ml). Next, cells were inoculated with NL4-3 particles either lacking or bearing host-derived ICAM-1. Cells were incubated for 2 h at 37°C, washed, trypsinized and lysed to estimate p24 contents. The data shown represent the means \pm standard deviations (SD) from triplicate samples and are representative of two separate experiments.

Figure 5. HIV-1 entry in $CD4^+$ T cells requires an intact cytoskeleton and a free lateral movement of LFA-1. (A) Activated $CD4^+$ T lymphocytes were either left untreated or treated with jasplakinolide (5 μ M) or cytochalasin D (10 μ M) for 30 min at 37°C and labeled with a mouse anti-CD11a/FITC-conjugated goat anti-mouse combination. Distribution of LFA-1 was assessed by confocal microscopy. The images are 3D reconstructed Z series and the individual sections are taken along the x-y axes. Arrows indicate LFA-1 clusters. One experiment representative of three is shown. Bars: 10 μ m. (B) PHA/IL-2-treated $CD4^+$ T cells were pretreated with jasplakinolide or cytochalasin D and then inoculated with NL4-3 virions either lacking or bearing host-derived ICAM-1. (C) Cells were inoculated with NL4-3 or 92HT599 that were produced in PBMCs. Cells were incubated with virus stocks for 90 min at 37°C, washed, trypsinized and lysed to estimate p24 contents. The data shown represent the means \pm standard deviations (SD) of the percentage of inhibition of HIV-1 entry from 3 to 6 separate experiments. Asterisks denote a statistical significance as computed with a Wilcoxon test ($P < 0.05$).

Figure 6. Entry of HIV-1 in activated $CD4^+$ T cells involves ZAP-70 and PLC γ 1 activities. (A) PHA/IL-2-treated $CD4^+$ T cells were either left untreated or treated with PP2 (20 μ M), piceatannol (40 μ M), or U73122 (5 μ M) for 30 min at 37°C. Next, cells were labeled with a mouse anti-CD11a/FITC-conjugated goat anti-mouse combination. Distribution of LFA-1

was observed by confocal microscopy. The images are 3D reconstructed Z series and the individual sections are taken along the x-y axes. Arrows indicate LFA-1 clusters. One experiment representative of three is shown. Bars: 10 μm . (B) PHA/IL-2-treated CD4^+ T cells were pretreated with the listed inhibitors and then inoculated with NL4-3 virions either lacking or bearing host-derived ICAM-1. (C) Cells were inoculated with NL4-3 or 92HT599 that were produced in PBMCs. Cells were incubated with virus stocks for 90 min at 37°C, washed, trypsinized and lysed to estimate p24 contents. The data shown represent the means \pm standard deviations (SD) of the percentage of inhibition of HIV-1 entry from 3 to 6 separate experiments. Asterisks denote a statistical significance as computed with a Wilcoxon test ($P < 0.05$).

Figure 7. The cystein protease calpain plays a key role in the process of HIV-1 entry. (A) PHA/IL-2-treated CD4^+ T cells were either left untreated or treated with calpeptin (100 μM) for 30 min at 37°C. Next, cells were labeled with a mouse anti-CD11a/FITC-conjugated goat anti-mouse combination. Distribution of LFA-1 was observed by confocal microscopy. The images are a 3D reconstructed Z series and the individual sections are taken along the x-y axes. Arrows indicate LFA-1 clusters. One experiment representative of three is shown. Bars: 10 μm . (B) PHA/IL-2-treated CD4^+ T cells were pretreated with calpeptin and then inoculated with NL4-3 virions either lacking or bearing host-derived ICAM-1. (C) Cells were inoculated with NL4-3 or 92HT599 that were produced in PBMCs. Cells were incubated with virus stocks for 90 min at 37°C, washed, trypsinized and lysed to estimate p24 contents. The data shown represent the means \pm standard deviations (SD) of the percentage of inhibition of HIV-1 entry from 3 to 5 separate experiments. The asterisks denote a statistical significance as computed with a Wilcoxon test ($P < 0.05$).

Figure 8. High concentrations of ICAM-1-bearing virions are concentrated in patches on the surface of CD4^+ T cells. PHA/IL-2-treated CD4^+ T cells were inoculated with isogenic NL4-3 viruses either lacking (A) or bearing ICAM-1 (B). Cells were incubated with virus stocks for 90 min at 37°C, washed, fixed and permeabilized. Bound and internalized

viruses were revealed using purified human anti-HIV-1 followed by Alexa 488-conjugated goat anti-human and F-actin was revealed with phalloidin rhodamine. The images are 3D reconstructed Z series and the individual sections are taken along the x-y axes. The images were obtained under similar magnification and intensification. Arrows indicate virions concentrated in microclusters. Data shown are representative of three separate experiments. Bars:10 μm .

Figure 9. HIV-1 colocalizes with LFA-1 clusters. PHA-activated CD4⁺ T lymphocytes were incubated with ICAM-1-bearing NL4-3 viruses for 90 min at 37°C. Cells were next labeled with anti-CD11a, anti-CD4 and/or anti-CXCR4 as indicated. After several washes, cells were incubated with the appropriate secondary antibodies. Finally, cells were fixed, permeabilized and viruses were labeled as described above. Co-localization events were monitored with the Metamorph software. The images are 3D reconstructed Z series and the individual sections are taken along the x-y axes. Data shown are representative of three separate experiments. Bars: 10 μm .

Figure 1

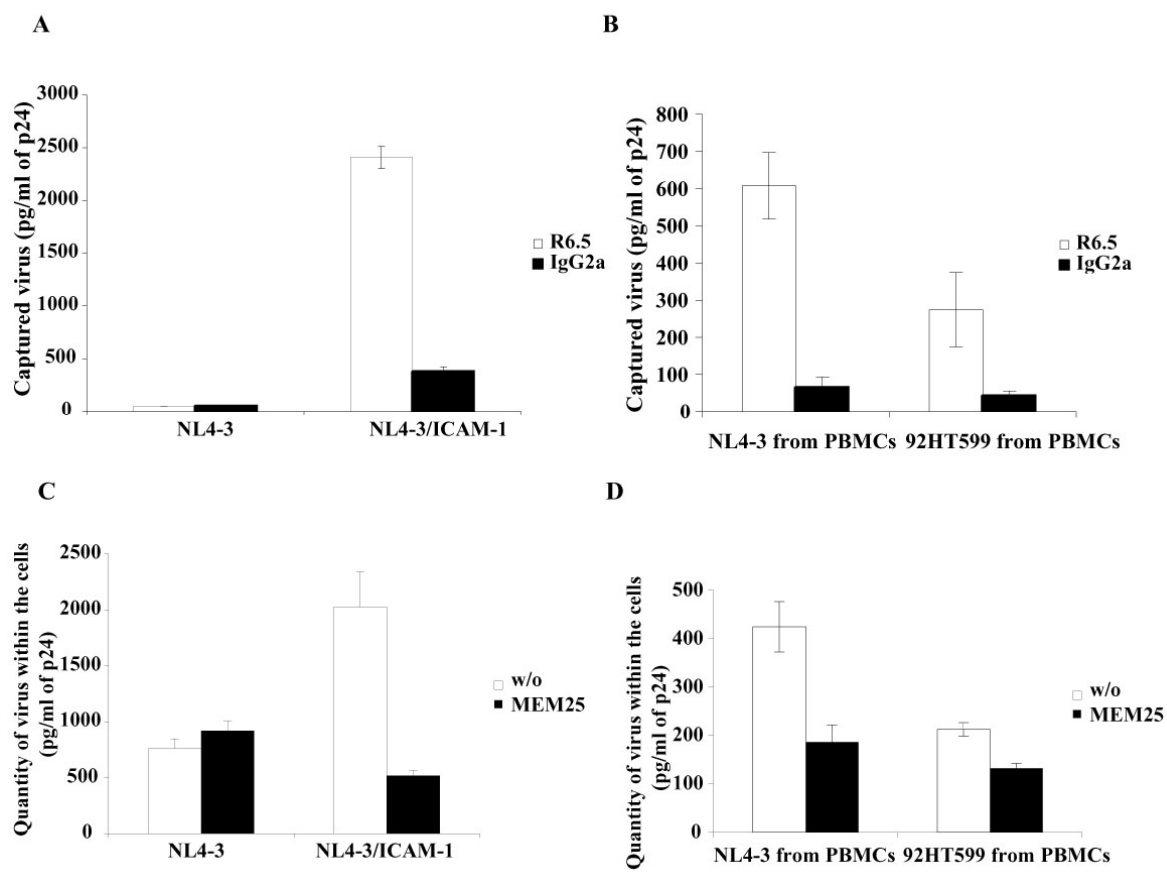


Figure 2

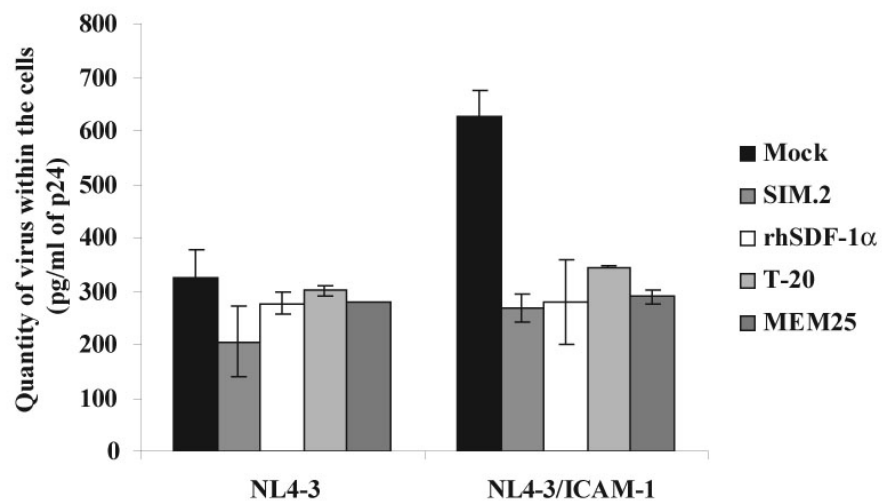
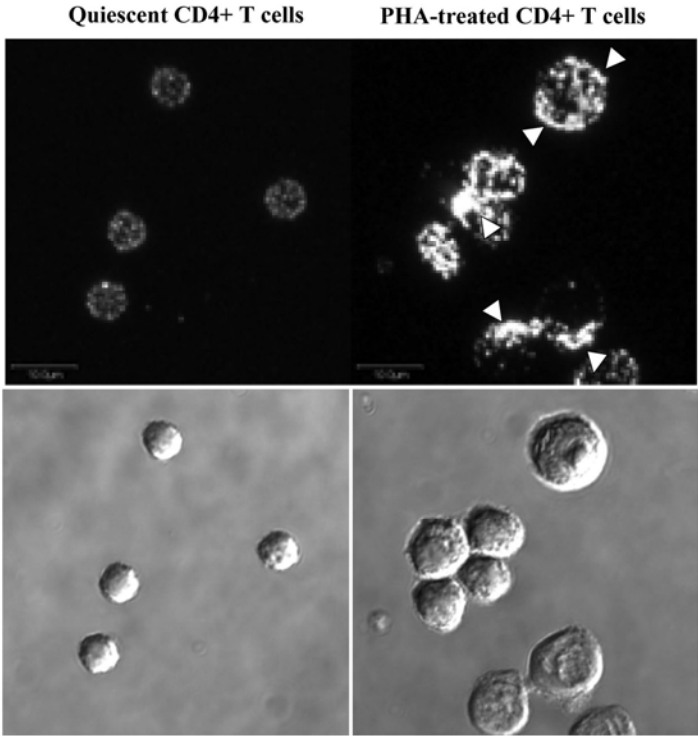


Figure 3

A



B

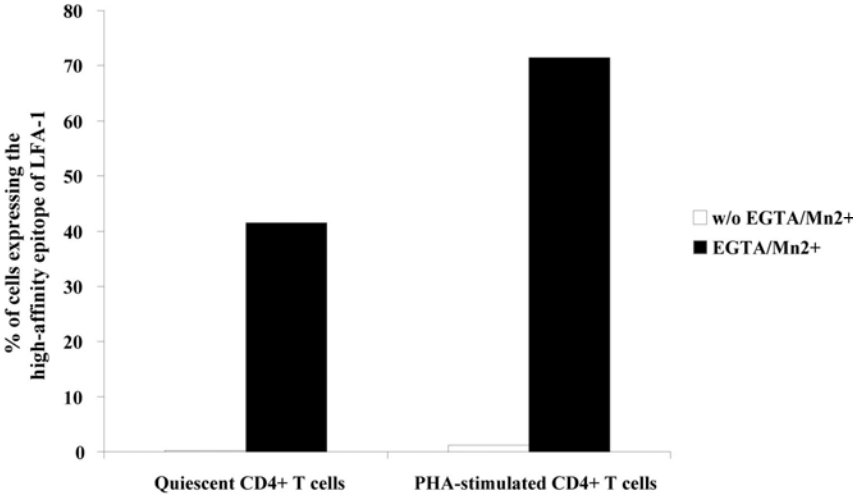


Figure 4

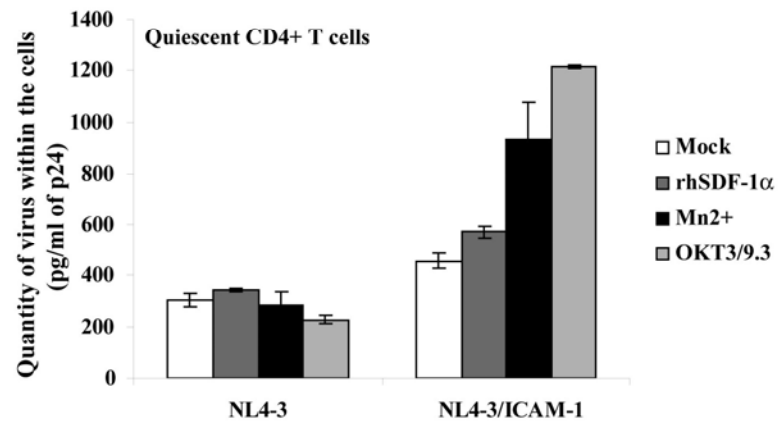
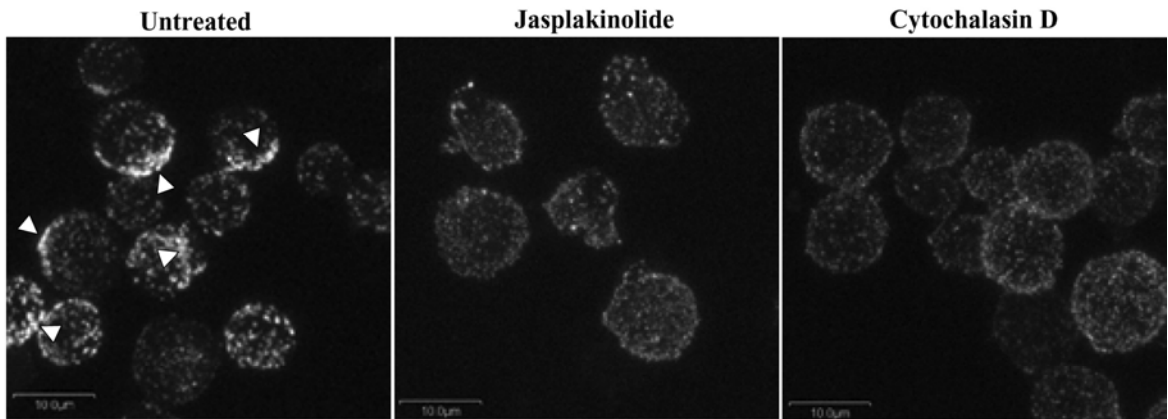
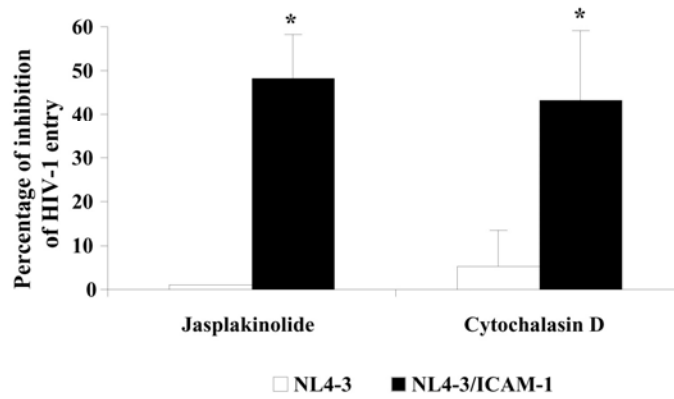


Figure 5

A



B



C

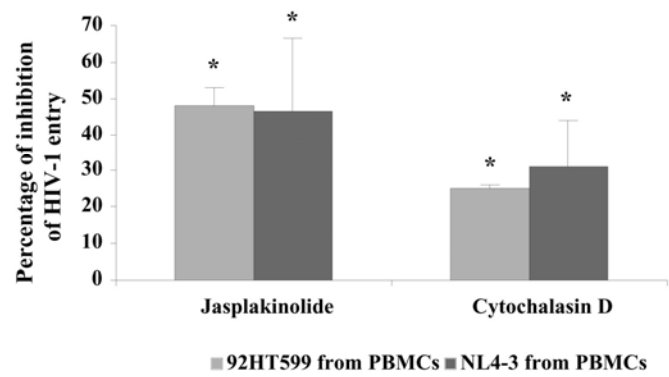
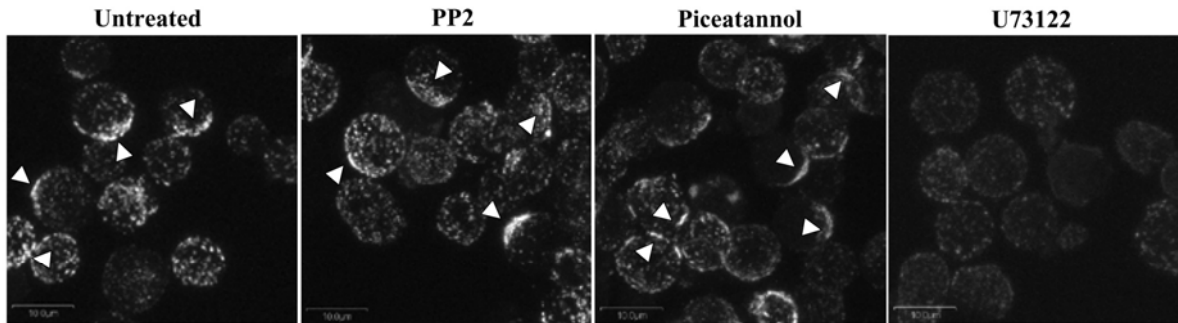
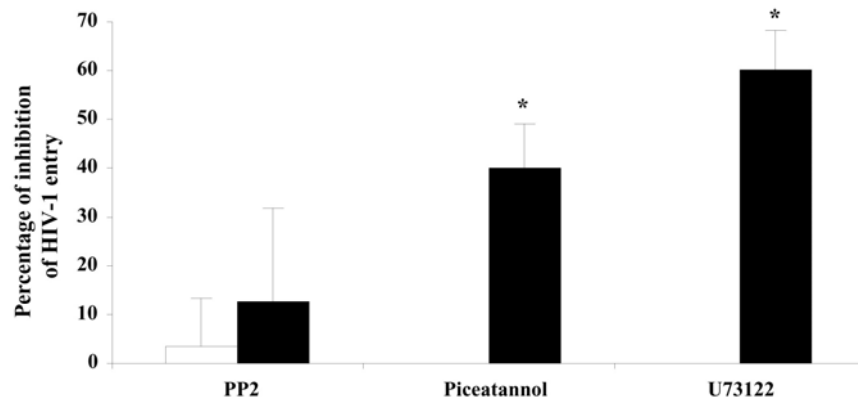


Figure 6

A



B



C

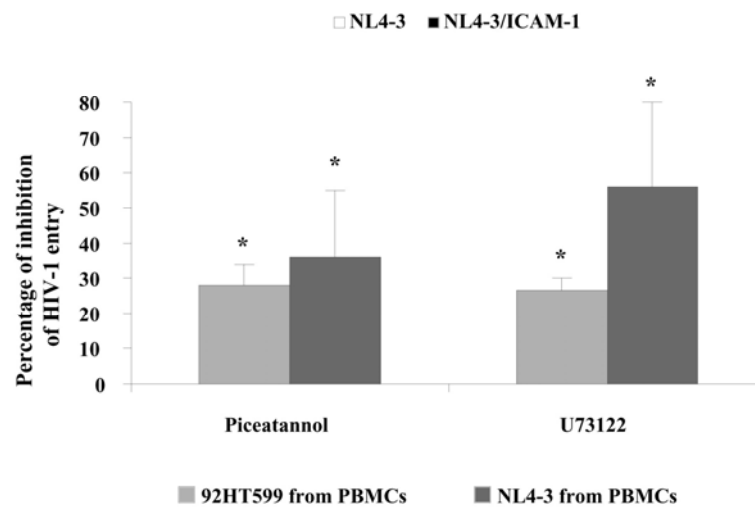


Figure 8

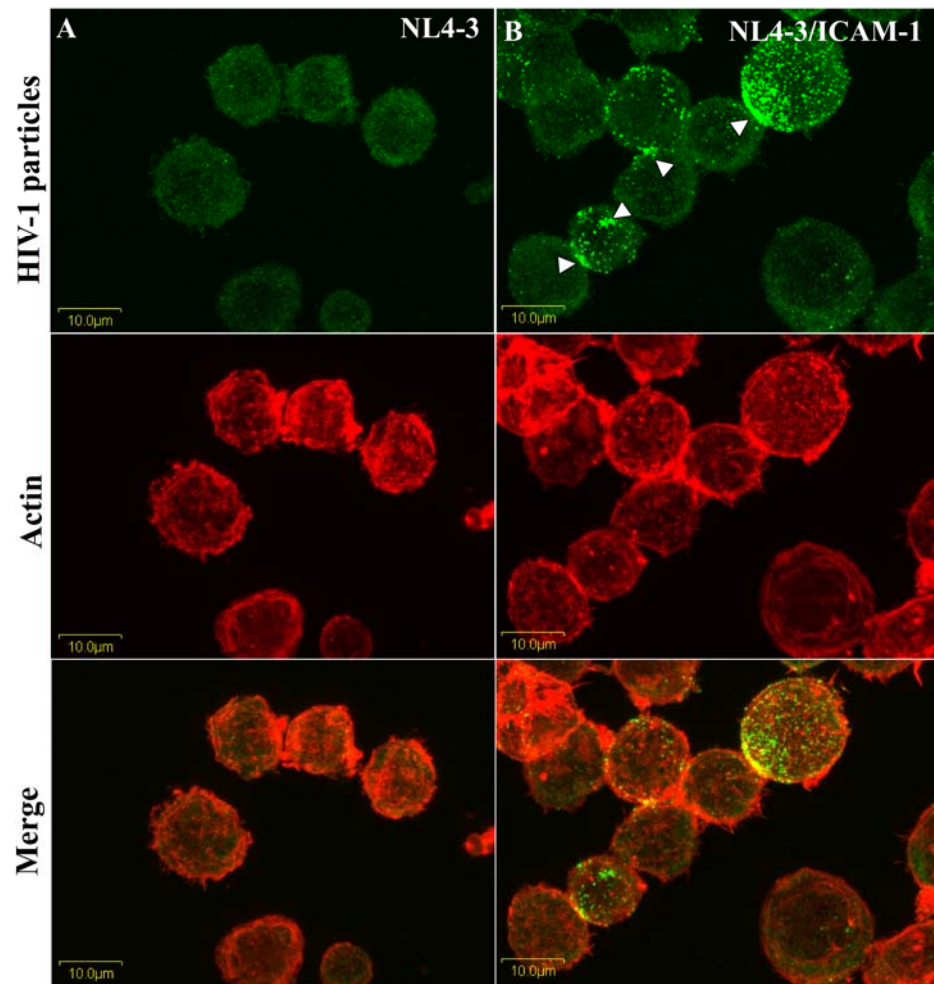
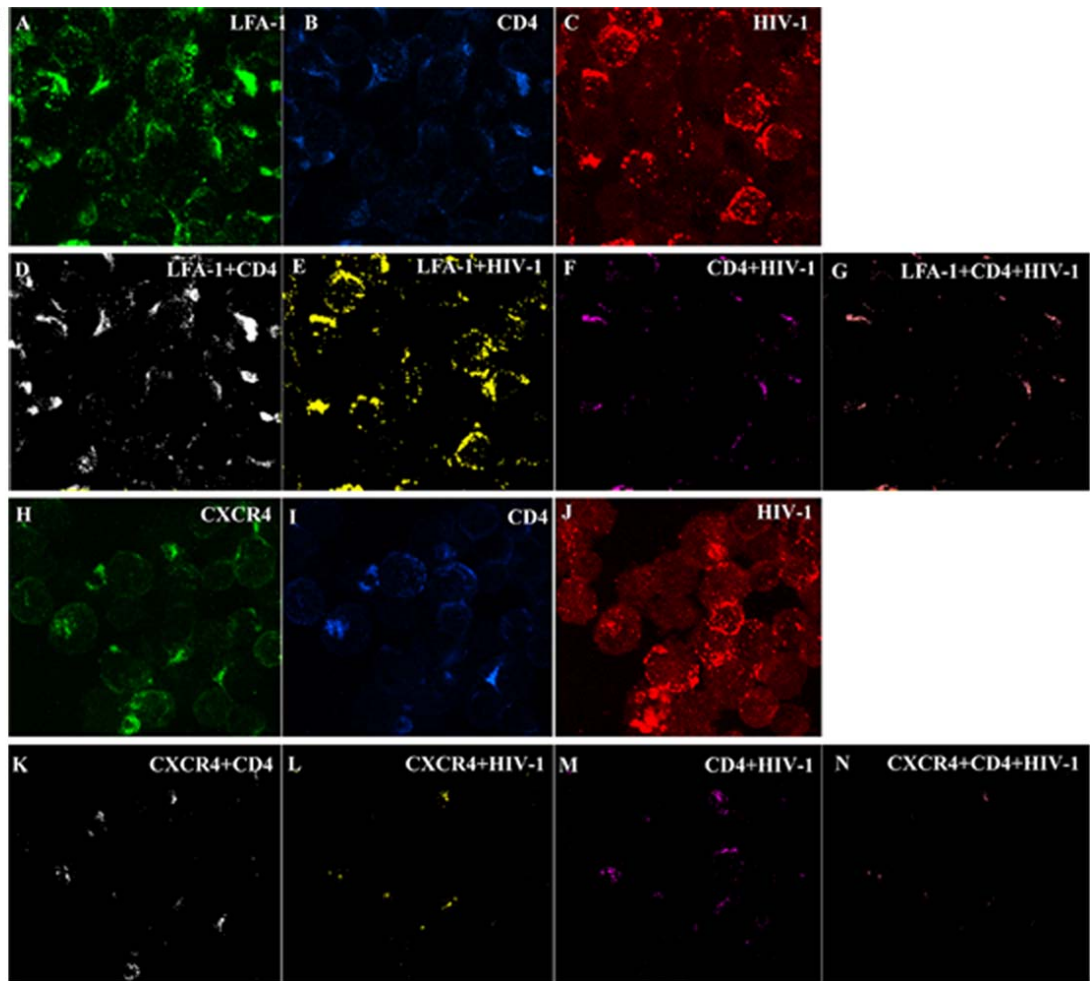


Figure 9



Chapitre VI. Le LFA-1 est un élément clé dans l'infection préférentielle des lymphocytes T CD4+ mémoires par le VIH-1.

Ce chapitre présente un manuscrit accepté pour la publication en juillet 2005 dans la revue *The Journal of Virology*. Le texte ci-dessous constitue la version soumise.

6.1 Résumé

Chez les patients séropositifs, la majorité des lymphocytes T CD4⁺ infectés correspondent à des cellules « mémoire ». Or, les raisons pour lesquelles le VIH-1 infecte principalement ces cellules demeurent obscures. Nous avons récemment démontré que, dans les cellules T CD4⁺ activées, l'avidité du LFA-1 est un élément clé dans l'infection par le VIH-1 ayant incorporé le ligand du LFA-1, l'ICAM-1. En effet, la capture des particules virales dans les régions riches en LFA-1 mène à une fusion plus rapide et plus efficace, puisque ces endroits contiennent également les molécules CD4 et CXCR4. Or, les cellules T CD4⁺ « mémoire centrale » proviennent d'une sous-population de cellules naïves ayant été stimulées et exprimant fortement les molécules LFA-1 dans un état activé. Nous avons donc comparé l'attachement, l'entrée, la transcription inverse, l'intégration et la réplication des virus ICAM-1+ dans les cellules T CD4⁺ « mémoire centrale » et les cellules naïves. Les résultats de ces études prouvent que le virus ICAM-1 positif entre préférentiellement dans les lymphocytes T « mémoire » plutôt que dans les cellules naïves. Par contre, les deux types cellulaires capturent en proportions similaires les virus sans ICAM-1. La susceptibilité accrue des cellules « mémoire » à l'infection par le virus ICAM-1 positif est liée à la quantité et le degré d'oligomérisation des molécules de LFA-1 sur ces dernières. En conclusion, ces résultats confirment le rôle joué par l'intégrine LFA-1 lors des étapes précoces du cycle viral et font la lumière sur un mécanisme expliquant l'infection préférentielle des cellules T « mémoire » par le VIH-1.

6.2 Article

LFA-1 is a key determinant for preferential infection of memory CD4⁺ T cells by HIV-1

Mélanie R. Tardif and Michel J. Tremblay

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

*Corresponding author. Mailing address:
Laboratory of Human Immuno-Retrovirology
Research Center in Infectious Diseases, RC709
CHUL Research Center
2705 Laurier Blvd, Quebec (QC)
Canada, G1V 4G2
Phone: (418) 654-2705; Fax: (418) 654-2212
E-mail: michel.j.tremblay@crchul.ulaval.ca

Key words: HIV-1, ICAM-1, LFA-1, clustering, memory T cells

Abstract

Memory CD4⁺ T cells are considered as a stable latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and a barrier to eradication of this retroviral infection in patients under therapy. It has been shown that memory CD4⁺ T cells are preferentially infected with HIV-1 but the exact mechanism(s) responsible for this higher susceptibility remains obscure. Previous findings indicate that incorporation of host-derived ICAM-1 in HIV-1 increases virus infectivity. To measure the putative involvement of virus-anchored ICAM-1 in the preferential infection of memory cells by HIV-1, quiescent and activated naive and memory T cell subsets were exposed to isogenic virions either lacking or bearing ICAM-1. Memory CD4⁺ T cells were found to be more susceptible than naive CD4⁺ T cells to infection with ICAM-1-bearing virions as exemplified by a more important virus replication, an increase in integrated viral DNA copies and a more efficient entry process. Interactions between virus-associated host ICAM-1 and cell surface LFA-1 under a cluster formation seem to be responsible for the preferential HIV-1 infection of the memory cell subset. Altogether, these data shed light on a potential mechanism by which HIV-1 preferentially targets long-lived memory CD4⁺ T cells.

Introduction

There is an extensive diversity displayed by CD4⁺ T cells in terms of phenotype, function and anatomical distribution. This cellular subtype is heterogeneous and can be subdivided into naive (CD45RA⁺) and memory (CD45RO⁺) subsets (reviewed in ref. (44)). Naive T lymphocytes exit the thymus, enter into bloodstream and get in lymphoid tissues through high endothelial venules (HEVs). They circulate in both compartments until they encounter their cognate antigen. Maintained in a G₀ state, naive T cells require a stimulation of ~ 20 hours from dendritic cells (DCs) exposing the related antigen to be committed to proliferate (26). Depending of the duration of T-cell receptor stimulation mediated by DCs in combination with some cytokines, the activated T cells differentiate and reach distinct effector functions, homing and survival capacity. Cells receiving a weak stimulation die by apoptosis, whereas those receiving a strong stimulation become effector or enter the memory pool. The memory subset remains in a non-dividing state (quiescent), express lymph node homing receptors and has a higher sensitivity to antigenic stimulation compared to the naive one. Enhanced expression of adhesion molecules and cellular factors is mainly involved in their ability to rapidly undergo terminal differentiation upon exposure to a recall antigen (32, 46).

Although human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replicates predominantly in activated CD4⁺ T lymphocytes (35), quiescent CD4⁺ T cells likely represent the major target for initial infection among T cells. Indeed, most T cells in the body are in a quiescent G₀ state with a low metabolic rate. However, numerous studies have reported that quiescent

T cells are mainly non-permissive to HIV-1 replication. In spite of this, integrated HIV-1 DNA has been largely found in resting CD4⁺ T lymphocytes from infected individuals (7, 16, 39). Interestingly, the majority of quiescent T cells carrying integrated HIV-1 genome displays a memory phenotype (10). While it is recognized that memory CD4⁺ T cells constitute the main cellular reservoir for HIV-1, it remains unclear whether these cells are more susceptible to the initial steps of viral life cycle.

Based on comparable surface levels of both primary cellular receptor and coreceptor (i.e., CD4 and CXCR4) on naive and memory T lymphocytes (43), it is usually thought that entry of HIV-1 occurs at similar rates in these two distinct cell subsets. However, beside interactions between the external virus-encoded envelope glycoprotein gp120 and CD4/CXCR4, it has been recognized that other interactions can promote the initial events in HIV-1 replication. Indeed, convincing studies have revealed that HIV-1 incorporates a plethora of host-derived cell surface molecules during the budding process, including the InterCellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) (9, 21, 57). Interestingly, the adhesion molecule ICAM-1 is efficiently acquired by all tested laboratory and clinical variants of HIV-1 bearing different tropisms (i.e., R5, X4 and R5X4) once amplified either in established cell lines or primary human cells (2, 9, 12, 14, 23, 36). Moreover, it has also been demonstrated that virus-associated ICAM-1 influences HIV-1 biology since the natural ability of ICAM-1 to associate with its natural counter-ligand LFA-1 is preserved and leads to a several folds increase of virus infectivity (21, 22, 55). Such a significant enhancement of HIV-1 infectivity is due to a more efficient virus adsorption onto target cells and a preferential entry process by fusion rather than through endocytosis (16).

Considering that memory CD4⁺ T cells express a higher surface level of LFA-1 compared to the naive subset, we tested the possibility that they might be preferentially targeted by ICAM-1-bearing HIV-1 particles. Our data indicate that memory CD4⁺ T lymphocytes are indeed more susceptible to a productive HIV-1 infection than the naive population, a process that seems to be due partly to the presence of LFA-1 clusters. This study provides novel insights on the identity of cellular factors responsible for the reported preferential HIV-1 infection of memory CD4⁺ T cells and highlights the dominant role played by LFA-1 in the first step of the virus life cycle.

Materials and Methods

Antibodies and reagents. The anti-CD11a (clone MEM25) was purchased from EXBIO Praha (Vestec, Czech Republic), whereas the anti-CD18 (CTB104) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). The hybridoma cell line that produces the anti-CD4 SIM.2 monoclonal antibody was provided by the AIDS Repository Reagent Program (Germantown, MD). Anti-CD45RA (clone 5H9) and anti-CD45RO (clone UHCL-1) were purchased from BD Pharmingen (Mississauga, ON). The R-phycoerythrin (R-PE)-conjugated and FITC-tagged goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). The following antibodies were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR): Cy5 goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor® 488 goat anti-human IgG and Alexa Fluor® 546 goat anti-human IgG. Azidothymidine (AZT) was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). The fusion inhibitor T-20 was provided by Roche Bioscience (Palo Alto, CA) while lovastatin and pravastatin were purchased from Calbiochem (San Diego, CA).

Cells. 293T cells were provided by W.C. Greene (The J. Gladstone Institutes, San Francisco, CA). These cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation and CD4⁺ T cells were purified from freshly isolated PBMCs by immunomagnetic negative selection as indicated by the manufacturer (Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, BC). Purified CD4⁺ cells were further separated into pure

CD45RA and CD45RO populations by negative selection as described by the manufacturer (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA). The purity of the T-cell subsets was determined by cytofluorometry analyses and was always $\geq 98\%$. Lymphocytes were cultured for 24 h in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS in the absence or presence of phytohemagglutinin (PHA) (1 $\mu\text{g/ml}$) and recombinant human interleukin-2 (rhIL-2) (50 U/ml).

Plasmids and production of viral stocks. pNL4-3 is a full-length infectious molecular clone of HIV-1 (provided by the AIDS Repository Reagent Program). The pNLENG1-EGFP is a full length infectious molecular clone of HIV-1 containing EGFP between the *env* and *nef* genes. This vector was kindly given by D.N. Levy (The Howard Hughes Medical Institute, Birmingham, AL). pCD1.8 is an eukaryotic expression vector containing the entire human ICAM-1 (a generous gift from Dr. T. Springer, The center for Blood Research, Boston, MA). Viruses differing only by the absence (called NL4-3) or the presence of host-derived ICAM-1 proteins on their surface (called NL4-3/ICAM-1) were produced by the calcium phosphate co-precipitation method in 293T cells as described previously (21). Virus preparations were normalized for virion content using an in-house enzymatic assay specific for the major viral p24 protein (9).

FACS analysis. Naive and memory CD4⁺ T cells were incubated with anti-CD11a, anti-CD18 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 with a secondary 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 cell sorting (Epics ELITE ESP, Coulter Electronics, Burlington, ON).

Virus capture assay. We used a modified version of our previously described virus precipitation assay which is based on the capture of HIV-1 particles using immunomagnetic beads (13). Briefly, commercially available streptavidin-coated magnetic beads (8.4×10^6 beads) (Dynal Biotech Inc., Brown Deer, WI) were mixed with 2 μg of biotinylated monoclonal antibodies in a final volume of 1 ml PBS plus 10% bovine serum albumin (PBSA) for 1 h at room temperature on a rocking plate. Immunomagnetic beads were next washed three times in PBSA with a magnet support (Dynal Biotech Inc.) and resuspended in 50 μl PBSA. HIV-1 (2 ng of p24) was added to the antibodies/beads mixture (50 μl) and the mixture was incubated overnight at 4°C on a rocking plate. Thereafter, immunomagnetic beads were washed four times in 200 μl PBSA and finally resuspended in 200 μl of PBSA. Viruses captured on magnetic beads were disrupted by incubation for 30 min at room temperature in 50 μl of lysis buffer (PBS containing 2.5% Triton-X-100). Magnetic beads were pelleted with a magnetic plate (Dynal Biotech Inc.) and 125 μl of the cleared supernatants were loaded on an ELISA plate for p24 measurement as mentioned above.

Virus entry assay. Quiescent and activated naive and memory CD4⁺ T lymphocytes (5×10^5) were resuspended in 0.1 ml of culture medium containing isogenic HIV-1 particles, either lacking or bearing host-derived ICAM-1 (2.5 ng of p24 per 10^5 cells), and were incubated at 37°C for 1 h or 3h as indicated. To monitor the role played by LFA-1 in

the process of virus entry, cells were pretreated for 30 min at 37°C with an antibody known to abolish ICAM-1/LFA-1 interactions (i.e., MEM25) before addition of viruses. In some experiments, T cell subsets were pretreated with an anti-CD4 antibody (i.e., SIM.2 at 20 µg/ml) for 30 min at 37°C to abrogate interactions between gp120 and CD4 while virus fusion was blocked by using the fusion inhibitor T-20 (20 µg/ml). Following virus exposure, cells were washed and trypsinized for 5 min at 37°C to remove non-internalized viruses. Next, cells were first washed once with RPMI-1640 supplemented with 10% FCS and then twice with PBS before lysis in 200 µl of ice-cold lysis buffer (20 mM HEPES [pH 7.4], 150 mM NaCl and 0.5 % Triton X-100). The amount of viruses entering cells was estimated by the p24 assay.

Detection of integrated HIV-1 DNA by real-time PCR. Naive and memory CD4⁺ T cells were infected with isogenic NL4-3 or NL4-3/ICAM-1 particles for three days before extraction of genomic DNA using the Qiagen kit (Mississauga, ON). DNA was quantified and subjected to a combined *Alu*-HIV-1 PCR and real-time PCR as described by Suzuki and co-workers (17). Briefly, genomic DNA (100 ng) was first amplified with an *Alu*-sequence-specific sense primer (16) and HIV-1-specific antisense primer (i.e., M661). Next, the PCR products were diluted 25-fold and subjected to a real-time PCR assay with the sense primer M667, the antisense primer AA55 and the Taqman probe HIV-FAM (54, 58). The cycling conditions included a hot start (95°C 5 min), followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 1 min) and extension (63°C for 1 min). NL4-3 DNA was used for the standard curve (i.e., from 938 to 60,000 copies). HIV-1 standards contain 1 ng of DNA

from uninfected cells as carrier. Real-time PCR was performed with a Rotor Gene RG-3000 (Corbett Research, distributed by Montreal Biotech Inc., QC).

Infectivity analysis. Quiescent and activated T-cell subsets (10^5 cells) were incubated for 2 h at 37°C with isogenic NL4-3 or NL4-3/ICAM-1 virions (2.5 ng of p24). Cells were then extensively washed with PBS and resuspended in 200 μl of culture medium supplemented with rhIL-2. Cells were then transferred into 96-well flat-bottom tissue culture plates and incubated at 37°C . In some experiments, cells were treated with 10 μM AZT after an incubation of 4 h with viruses. Following an additional incubation time period of 16 h, cells were washed with culture medium and resuspended in 200 μl of culture medium supplemented with rhIL-2. Supernatants (100 μl) were harvested at different time points and frozen at -20°C until assayed for p24 contents.

Separation of naive and memory CD4^+ T cells following exposure to HIV-1. Quiescent CD4^+ T lymphocytes (2×10^6 cells) were incubated for 6 h at 37°C with HIV-1 particles either lacking or bearing host-derived ICAM-1 (5 ng of p24 per 10^5 cells in a final volume of 0.5 ml of culture medium). In some experiments, cells were pretreated with lovastatin (50 μM) for 30 min at 37°C to block the interaction between LFA-1 and ICAM-1 or with the control compound pravastatin (50 μM) before exposure to viruses. Cells were washed twice with ice cold PBS/2% FCS (binding buffer) and next incubated with magnetic beads to achieve isolation of cell subpopulations (Dynabeads M-450 from Dynal Biotech Inc., Brown Deer, WI). Briefly, magnetic beads (1.5 μl per assay) were first coated with an anti-CD45RA or anti-CD45RO (1 ng per assay) for 1 h at room temperature on a rotating plate.

Beads were next washed twice with binding buffer through the use of a magnetic separation unit and resuspended in 100 μ l of binding buffer. Beads were then mixed with unseparated CD4⁺ T cells that were exposed to the tested virus preparations. The beads-cell mixture was incubated for 1 h at room temperature on a rotating plate in a final volume of 1 ml of binding buffer. Beads were finally washed twice with binding buffer with a magnetic separation unit. Naive and memory quiescent CD4⁺ T lymphocytes, which were positively selected, were resuspended in 400 μ l of culture medium containing PHA and IL-2 and incubated at 37°C. Supernatants were harvested after three days and the amount of released viruses was quantified by measuring p24 contents.

Confocal microscopy. To analyze the distribution of LFA-1 on CD4⁺ T cells, quiescent and activated naive and memory CD4⁺ T cells were incubated with MEM25 for 30 min on ice followed by incubation with a Cy5-conjugated secondary antibody for 30 min on ice. After several washes, slides were mounted in 90% glycerol in PBS before confocal microscopy analysis. HIV-1 was labelled as described previously (55). Bound and internalized viruses were visualized by confocal laser scanning microscopy (Olympus Fluoview FV300, Melville, NY). Digital images were processed with Adobe Photoshop (version 8). All the images were taken under similar experimental conditions (i.e., exposure time, magnification and intensification) and processing was also the same for all the images shown in this study.

Results

To define the possible contribution of virus-anchored host ICAM-1 in the reported ability of HIV-1 to replicate preferentially within memory CD4⁺ T lymphocytes, we produced isogenic HIV-1 particles (NL4-3 strain/X4-tropic) differing only by the absence or presence of host-derived ICAM-1 using a well-established transient transfection-and-expression system (21). The efficient incorporation of the adhesion molecule ICAM-1 onto progeny virus was monitored by a previously described virus capture assay (data not shown) (13).

Susceptibility of quiescent and activated CD4⁺ T cell subsets to HIV-1 infection.

Previous studies have clearly demonstrated that interactions between virus-associated ICAM-1 and cell surface LFA-1 plays a dominant role in the initial steps of HIV-1 life cycle once infection is allowed to proceed in PHA/IL-2-activated CD4⁺ T lymphocytes (9, 21, 41). However, given that CD4⁺ T cells are heterogeneous, both functionally and phenotypically, we were interested in monitoring whether insertion of host ICAM-1 within HIV-1 can direct infection toward a specific cellular subset. Data from studies on HIV-1 replication kinetics demonstrated that levels of virus replication in activated naive and memory CD4⁺ T cells were comparable when using virions lacking ICAM-1 (Fig. 1A). Interestingly, a more massive virus production in the memory subset compared to the naive subpopulation was seen following infection with isogenic ICAM-1-bearing HIV-1 particles. Although the panel A shows that infection of activated naive T cells with ICAM-1-bearing virions is lower than ones infected with HIV-1 lacking the adhesion molecule, this result is not representative since we have not observed it with other donors. Next, we

have analyzed the impact of virus-associated ICAM-1 on infection of quiescent naïve and memory T cell subsets. Even though virus production was significantly reduced when infections were carried out in quiescent CD4⁺ T cells, similar observations than ones obtained with activated cells were made. Indeed, resting memory CD4⁺ T lymphocytes produced an average of 3.4-fold more viruses than did the naïve subpopulation at 6 days post-infection (Fig. 1B).

Upon infection with ICAM-1-bearing virions, memory CD4⁺ T cells in a resting state carry more integrated HIV-1 DNA than the naïve subset. Integration represents an essential step in the replicative cycle of retroviruses (19, 34, 62). It is generally considered that reverse transcription is impaired in naïve CD4⁺ T cells and that no integration can be detected *in vitro*. Nevertheless, it has been shown that, in HIV-1 seropositive patients, both quiescent naïve and memory CD4⁺ T lymphocytes carry integrated proviral DNA that can support virus replication (39). Thus, we next estimated the levels of integrated HIV-1 DNA in quiescent naïve and memory CD4⁺ T cells. This goal was achieved by performing a first round of PCR amplification using primers specific for *Alu* and HIV-1 sequences. The first PCR product was subsequently subjected to real-time PCR using primers specific for HIV-1 R/U5 regions. The *Alu* sequence is a ubiquitous repeat element found in the human genome (about 10⁶ copies). By amplifying the junction between the nearest *Alu* sequence and the viral LTR, followed by a second round of LTR amplification, the presence of integrated HIV-1 genome can be specifically demonstrated. As shown in Fig. 2, the numbers of integrated viral DNA copies per ng of total DNA were comparable in resting naïve (6,343 ± 1,987) and memory (11,218 ± 7,027) CD4⁺ T cells following infection with

NL4-3 lacking host ICAM-1 as well as in quiescent naive CD4⁺ T cells inoculated with virions bearing the adhesion molecule ($2,781 \pm 3,932$). However, a significant increase in the levels of integrated viral DNA was detected in memory CD4⁺ T cells that were infected with NL4-3/ICAM-1 particles (i.e., a mean increase of 22-fold; $254,000 \pm 138,592$). These data were confirmed when using samples from a second healthy donor since memory CD4⁺ T cells infected with ICAM-1-bearing viruses carried about 14-fold more integrated HIV-1 DNA copies than did the three other samples tested (data not shown).

Reverse transcription of ICAM-1-bearing virions is more efficient in memory CD4⁺ T cells. Following virus-cell fusion and uncoating, HIV-1 RNA undergoes reverse transcription to a DNA intermediate that can remain either under a non-integrated or integrated form. It has been recently suggested that the non-integrated HIV-1 DNA can serve as a template for viral gene expression and has the full capacity to produce all classes of viral transcripts (50, 51, 63). However, it was shown that reverse transcription of HIV-1 genome in quiescent T cells remains incomplete. Thus, if we detect integrated HIV-1 genome into memory CD4⁺ T cells infected with NL4-3/ICAM-1, it would imply a more efficient reverse transcription process in this particular cell subset. To address this question, naive and memory CD4⁺ T cells were incubated with the studied virus preparations (i.e., NL4-3 and NL4-3/ICAM-1) for a time period sufficient to allow binding, entry and formation of partially or completely reverse-transcribed DNA before addition of AZT (i.e., 4 h). Treatment with AZT will impair DNA synthesis from partially reverse-transcribed forms of viral genomic RNA, but not from completely synthesized viral DNA. Studies performed with this experimental strategy indicated that the release of progeny virus was

observed only in AZT-treated memory CD4⁺ T cells that were infected with ICAM-1-bearing virions but not in the other samples subjected to AZT treatment (Fig. 3).

Higher levels of LFA-1 clusters are found on memory compared to naive CD4⁺ T cells. Reorganization of LFA-1 molecules into clusters represents the major mechanism that regulates ICAM-1 binding (18, 31, 59-61). In naive CD4⁺ T cells, LFA-1 is maintained in a low avidity state (45, 48). Cellular activation favours lateral diffusion of the integrin and formation of LFA-1 clusters (18, 28, 52, 64). Since memory CD4⁺ T cells originate from activated naive CD4⁺ T cells, on which LFA-1 molecules are found in clusters, we wanted to investigate whether this patching is preserved and can play a role in the observed higher susceptibility of memory CD4⁺ T cells to a productive infection with ICAM-1-bearing virions. FACS analyses demonstrate that all naive and memory CD4⁺ T cells express LFA-1 subunits (CD11a and CD18) but at different levels (Fig. 4A). The mean fluorescence intensities (MFI) of CD11a and CD18 are higher on memory subset (blue line) than on naive ones (red line) as it was previously demonstrated by others groups (reviewed in (4, 11)). Distinct spatial distribution of LFA-1 on naive and memory T cells is observed when performing confocal microscopy analyses. Indeed, a weak but homogenous distribution of LFA-1 was found on the surface of naive CD4⁺ T cells (Fig. 4B). Interestingly, LFA-1 was localized in patches on memory CD4⁺ T lymphocytes in a quiescent state as well as on the two studied activated T cell subpopulations. These results suggest that LFA-1 is distributed in clusters onto resting memory CD4⁺ T cells. To compare densities of LFA-1 clusters upon stimulation of both CD4⁺ T cell subsets, cells were stimulated with PHA for 24 and 48 h prior to analysis by flow cytometry. Results

depicted in Fig. 4C demonstrate that levels of LFA-1 clusters are only marginally augmented following activation of naive CD4⁺ T lymphocytes, which is in sharp contrast to the situation seen with the activated memory cell subset.

ICAM-1-bearing viruses attach to and enter more efficiently in memory compared to naive CD4⁺ T cells. Given that higher amounts of integrated HIV-1 DNA complete are found in memory CD4⁺ T lymphocytes, we addressed the possibility that entry of ICAM-1-bearing virions is more efficient in this cellular subtype. To this end, entry of the studied virus preparations in purified CD4⁺ T cell subsets was estimated in the absence or presence of an anti-LFA-1 antibody that can abrogate ICAM-1/LFA-1 interactions (MEM25). The process of entry of viruses lacking the adhesion molecule ICAM-1 was not affected by the anti-LFA-1 antibody and slight differences were detected between naive and memory CD4⁺ T cells (Fig. 5A). On the opposite, higher amounts of isogenic ICAM-1-bearing virions were found inside memory CD4⁺ T cells compared to cells bearing the naive phenotype (4.7-fold increase). The contribution of ICAM-1/LFA-1 interactions in the observed enhancement of virus entry is clearly illustrated through the use of the LFA-1 neutralizing antibody. Cellular activation of both naive and memory CD4⁺ T cells led to an increase in the rate of entry of NL4-3/ICAM-1, suggesting that enhanced activation of LFA-1 as well as LFA-1 expression might be responsible for this phenomenon. Differences observed in the entry of ICAM-1-bearing virions into activated naive and memory T cells are linked to the levels of LFA-1 clusters. Indeed, resting memory and activated naive CD4⁺ T cells (24 h post-stimulation) contains similar amount of LFA-1 clusters (Fig. 4C). Interestingly, similar amounts of ICAM-1-bearing viruses are detected inside these cell subpopulations.

In contrast, the amount of virions detected within activated memory CD4⁺ T lymphocytes is the highest among samples tested, a phenomenon associated with the more important level of LFA-1 clusters observed on these cells. Next, we assessed the contribution of CD4 and CXCR4 in entry of the studied virus preparations in resting naive and memory CD4⁺ T cells. We found that entry of virions lacking ICAM-1 in naive and memory CD4⁺ T cells are weakly affected by the anti-CD4 antibody SIM.2 and the fusion inhibitor T-20 (Fig. 5B). These data suggest that, at least under the tested experimental conditions (i.e., virus entry monitored after 3 h following infection), virions lacking host ICAM-1 are mainly internalized by endocytosis and not by fusion in the studied target cells. Similar results were obtained when assessing entry of ICAM-1-bearing virions inside resting naive CD4⁺ T cells. In contrast, entry of ICAM-1-bearing viruses within resting memory CD4⁺ T cells was found to be sensitive to the two blocking agents studied. These results are in agreement with our previous work demonstrating that ICAM-1 incorporation favors entry of HIV-1 particles through fusion, a process known to result in productive infection (55, 56).

Confocal microscopy studies were next carried out to provide additional evidence of the capacity of ICAM-1-bearing HIV-1 particles to interact more efficiently with CD4⁺ T cells compared to the naive subset. As depicted in Fig. 5C, similar low levels of virions lacking host ICAM-1 were found to associate with both CD4⁺ T cell subsets. A higher amount of NL4-3/ICAM-1 viruses was found to associate with resting memory CD4⁺ T lymphocytes compared to naive CD4⁺ T cells. Activated memory CD4⁺ T cells when used in combination with ICAM-1-bearing HIV-1 particles were used as a positive control. The

data further confirm that HIV-1 particles carrying the adhesion molecule ICAM-1 display a greater propensity to target memory CD4⁺ T cells.

Cells of the memory phenotype in a heterogeneous resting CD4⁺ T cell population are preferentially targeted by ICAM-1-bearing virions. In an attempt to assess if ICAM-1-bearing virions could preferentially target memory CD4⁺ T cells when infection is performed in unseparated CD4⁺ T lymphocytes, preparations of negatively selected CD4⁺ T lymphocytes were exposed to HIV-1 particles either lacking or bearing host ICAM-1. Cells were next separated using anti-CD45RA and anti-CD45RO-coated magnetic beads. Each population was maintained in culture medium containing PHA and IL-2 for three days and supernatants were harvested to quantify the virus content. In some conditions, cells were pretreated either with lovastatin to inhibit interactions between ICAM-1 and LFA-1 interaction or with a control compound (i.e., pravastatin). Results presented in Fig. 6 indicate that virions lacking host ICAM-1 infected both naive and memory CD4⁺ T cells with a comparable low efficiency. However, memory CD4⁺ T cells were more efficiently infected with ICAM-1-bearing viruses than cells expressing the naive phenotype, a phenomenon that was abolished upon treatment with lovastatin but not with pravastatin.

Discussion

Identification of intrinsic factors responsible for the preferential infection of memory cells among resting CD4⁺ T cells is of high importance to achieve a better comprehension of HIV-1 biology. This knowledge is particularly informative since it might help to shed light on mechanisms through which viral reservoirs are established in infected individuals and on the inability of the immune system to better control HIV-1 replication (15, 27, 37, 38, 47). A mechanism that has been proposed to explain infection of memory CD4-expressing T cells states that HIV-1-infected resting memory CD4⁺ T lymphocytes derive actually from activated naive CD4⁺ T cells that become infected and, then, revert to a resting G₀ state (7). However, it has also been postulated that the predominant way by which memory CD4⁺ T lymphocytes in a quiescent state get infected is through direct infection. The present study is thus in full support of this hypothesis. Indeed, we provide evidence that memory CD4⁺ T cells are specifically targeted by ICAM-1-bearing HIV-1 particles when infection is carried out in a heterogeneous cell population made of both naive and memory subsets. We demonstrate that the presence of numerous LFA-1 molecules organized in clusters is a key element for a more efficient attachment of HIV-1 particles carrying host ICAM-1 onto memory CD4⁺ T cells, an event that is also associated with an augmentation of virus entry and a higher level of integrated viral DNA.

Our findings are perfectly in line with a study that has estimated the number of resting naive and memory CD4⁺ T cells that are infected under *in vivo* situations in HIV-1 seropositive subjects. In fact, Ostrowski and colleagues have reported that memory CD4⁺

T cells had a median of four-fold more replication-competent virus and 16-fold more integrated provirus than naive CD4⁺ T cells in a cohort of 11 patients (39). Another study has also demonstrated that memory T cells from HIV-1-infected patients contain an average of 10 times more copies of HIV-1 DNA than naive T cells (10). In the present study, we found that memory CD4⁺ T cells carry 10 to 22 times more integrated viral DNA upon infection with ICAM-1-bearing virions than resting naive CD4⁺ T cells or than these two cellular subsets infected with isogenic viruses lacking the adhesion molecule ICAM-1. Furthermore, our data reveal that virus production is around 3.4 times greater in quiescent memory CD4⁺ T cells infected with ICAM-1-bearing HIV-1 particles compared to naive CD4⁺ T lymphocytes. Overall, our results indicate that memory CD4⁺ T cells are more permissive to productive infection with HIV-1 particles that bear host-encoded ICAM-1. The physiological relevance of this observation should not be underestimated considering that ICAM-1 has been reported to be acquired by all studied clinical and laboratory variants of HIV-1 independently of the tropism, which were amplified in primary human cells including histocultures of lymphoid tissue (2, 9, 12, 14, 23, 36).

Data from virus capture tests performed with NL4-3 particles that were produced in transiently transfected 293T cells and more natural cell targets (i.e., PBMCs and human lymphoid tissue cultured *ex vivo*) indicate that viruses from 293T cells are more efficiently captured than virions amplified in primary human cells (data not shown). This might suggest that virions produced by 293T cells incorporate higher amounts of host ICAM-1 than viruses that are shedded by primary human cells. Although such findings question the significance of the current experiments, it is important to emphasize that previous work

carried out with progeny virus produced in PBMCs provided evidence of the dominant role played by interactions between virus-anchored ICAM-1 and cell surface LFA-1 in HIV-1 attachment, entry and infectivity through the use of blocking agents such as neutralizing antibodies (i.e., MEM25, MEM30 and RR1/1.1.1) and lovastatin (3, 9, 24, 55). Moreover, it was recently demonstrated that the lateral mobility and clustering of LFA-1 are crucial in the early events of HIV-1 life cycle for both viruses produced in 293T cells and PBMCs (56). Altogether these published observations provide credence to the present work.

Our data differ from those of a previous report showing that the greater virus production in memory CD4⁺ T cells compared to cells bearing a naive phenotype was not associated with a difference in cell susceptibility to HIV-1 infection (49). These investigators argue that the difference in viral replication between the two cellular subsets is most likely associated with some specific cellular factors that are induced upon T-cell receptor/CD3-mediated signal transduction events. It is important to emphasize that the implication of virus-anchored cell surface membrane constituents in the preferential HIV-1 replication in the memory subtype was not assessed in this work. Moreover, our results are consistent with a previous publication demonstrating a preferential attachment of HIV-1 particles to memory CD4⁺ T cells (6). These investigators produced their viruses in ICAM-1-expressing chronically infected T cells but were unable to demonstrate the involvement of LFA-1 in this process, which is in sharp contrast to our findings. The explanation for this discrepancy is currently unknown but could relate to the use of a different anti-LFA-1 antibody that is specific for CD18 (β_2 -chain of LFA-1, clone 685A5) while we have use a blocking anti-CD11a antibody (α -chain of LFA-1). Despite this dissimilarity, both studies demonstrate

that the inability of ICAM-1-bearing virions to productively infect naive CD4⁺ T cells can be reversed by the activation of this cell subset with PHA/IL-2, a process which is known to induce expression of LFA-1 molecules and their redistribution in clusters.

It has been shown that reorganization of LFA-1 molecules in clusters represents the major mechanism regulating the association between ICAM-1 and LFA-1 (18, 31, 59-61). It is well known that LFA-1 is maintained in a low avidity state in naive CD4⁺ T cells by the tethering of the integrin tail to the actin cytoskeleton (45, 48). Cellular activation leads to the release of LFA-1 molecules from its cytoskeleton constraint, favouring lateral diffusion and formation of LFA-1 clusters (18, 28, 52, 64). As memory CD4⁺ T cells originate from activated naive CD4⁺ T cells, where LFA-1 molecules are distributed in clusters, it was not surprising to discover LFA-1 clusters on resting memory CD4⁺ T cells. The presence of these clusters may be independent of cellular activation since resting memory CD4⁺ T cells do not express activation markers such as CD25 and CD69 (data not shown). To the best of our knowledge, it represents the first demonstration that LFA-1 molecules are patched on the surface of memory CD4⁺ T cells.

Given that biochemical events can be transduced in target cells by HIV-1-anchored host proteins (8), it can be postulated that attachment of ICAM-1-bearing virions to the surface of LFA-1-expressing cells might trigger outside-in signaling. This could in turn, as suggested previously (55), favors a firmer docking of the viral entity onto the target cell surface due to LFA-1 activation and a possible mobilization of LFA-1 to the lipid raft and thus closer to CD4. Moreover, it can be proposed that LFA-1-mediated signal transduction

events due to engagement with virus-anchored host ICAM-1 can lead to a remodeling of the cytoskeleton, a process that might lead to a destabilization of the plasma membrane and a higher probability to interact with the appropriate chemokine co-receptor CXCR4. The previous demonstration that the F-actin cytoskeleton is remodeled by ICAM-1-dependent signaling through LFA-1 fully supports this scenario (40).

Although it cannot be excluded that the naive cell subpopulation is totally free of cells expressing a nonnaive phenotype, it should be noted that nonnaive CD45RA CD4⁺ T cells represent a very small fraction of effector CD4⁺ T lymphocytes which usually express the CD45RO isoform. To confirm that our purified CD45RA population was truly naive, we performed infectivity experiments with R5-tropic virions based on the notion that the chemokine receptor CCR5 is not expressed on naive CD4⁺ T cells, but is expressed by the effector subset (44). Virus replication was not detected in the CD45RA cell fraction (data not shown), thus confirming that purified CD45RA CD4⁺ T are virtually free of nonnaive CD45RA cells.

Beside phenotypic differences between naive and memory CD4⁺ T cells, these two distinct cellular subpopulations also exhibit differences with respect to their functional properties and metabolism. Indeed, memory T cells seem to be metabolically more active than naive T cells (53). As memory T cells contain higher levels of RNA and proteins than naive T cells, it has been suggested that the memory subset may be resting in the G₁ rather than the G₀ state (53). These properties probably also partly explain the greater susceptibility of these cells to HIV-1 infection. Conversely, naive and memory T cells react differently to

cellular activation (4, 5). Several differences in the two T cell subsets have been noted that could affect signalling pathways within these cells which may explain different susceptibility to viral replication (20, 25, 33). Preferential HIV-1 replication in the memory cell subpopulation appears to be related to a greater stimuli-mediated activation of the nuclear factor of activated T cells (NFAT) in this cell type compared to what is seen in naive T cells (42). NFAT has been demonstrated to act in synergy with the nuclear factor kappa B (NF- κ B) for promoting HIV-1 transcription in both T cell lines and primary human T cells (1, 17, 29, 30). This is not surprising because HIV-1 gene expression is known to rely on a complex interplay between a series of cellular transcription factors and the viral encoded transactivator of transcription, Tat. This might help to explain that, even though comparable amounts of ICAM-1-bearing HIV-1 particles entered within activated naive and memory CD4⁺ T cells, we found that virus production is superior in cells displaying the memory phenotype.

In conclusion, our findings propose a possible mechanistic framework explaining the higher susceptibility of memory CD4⁺ T cells to HIV-1 infection. The role played by virus-associated host ICAM-1 and cell surface LFA-1 under a cluster formation might be considered as a determinant factor in the initial events of HIV-1 life cycle since we demonstrate that it can influence permissiveness of quiescent memory CD4⁺ T cells to a productive virus infection. The propensity of HIV-1 to preferentially target memory CD4⁺ T cells that contain LFA-1 clusters might simply reflect a biological adaptation the virus has evolved to establish a sanctuary of long-lived cells that carry integrated viral DNA.

Acknowledgements

We are grateful to S. Méthot for editorial assistance and M. Imbeault for his assistance with real-time PCR assays. We thank M. Dufour for performing flow cytometric analyses. The work was performed by M.R.T. in partial fulfillment of her Ph.D. degree at the Faculty of Medicine, Laval University. This work was financially supported by an operating grant to M.J.T. from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) HIV/AIDS Research Program (grant #HOP-14438). M.R.T. holds a CIHR Doctoral Award and M.J.T. is the recipient of the Canada Research Chair in Human Immuno-Retrovirology (senior level).

References

1. **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**:3563-73.
2. **Bastiani, L., S. Laal, M. Kim, and S. Zolla-Pazner.** 1997. Host cell-dependent alterations in envelope components of human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* **71**:3444-50.
3. **Beausejour, Y., and M. J. Tremblay.** 2004. Susceptibility of HIV type 1 to the fusion inhibitor T-20 is reduced on insertion of host intercellular adhesion molecule 1 in the virus membrane. *J Infect Dis* **190**:894-902.
4. **Berard, M., and D. F. Tough.** 2002. Qualitative differences between naive and memory T cells. *Immunology* **106**:127-38.
5. **Beverley, P.** 1991. Immunological memory in T cells. *Curr Opin Immunol* **3**:355-60.
6. **Blanco, J., J. Barretina, A. Gutierrez, M. Armand-Ugon, C. Cabrera, B. Clotet, and J. A. Este.** 2002. Preferential attachment of HIV particles to activated and CD45RO+CD4+ T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **18**:27-38.
7. **Blankson, J. N., D. Persaud, and R. F. Siliciano.** 2002. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* **53**:557-93.
8. **Bounou, S., N. Dumais, and M. J. Tremblay.** 2001. Attachment of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) particles bearing host-encoded B7-2 proteins leads to nuclear factor-kappa B- and nuclear factor of activated T cells-dependent activation of HIV-1 long terminal repeat transcription. *J Biol Chem* **276**:6359-69.
9. **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.

10. **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.
11. **Campbell, J. J., and E. C. Butcher.** 2000. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* **12**:336-41.
12. **Cantin, R., J. F. Fortin, and M. Tremblay.** 1996. The amount of host HLA-DR proteins acquired by HIV-1 is virus strain- and cell type-specific. *Virology* **218**:372-81.
13. **Cantin, R., G. Martin, and M. J. Tremblay.** 2001. A novel virus capture assay reveals a differential acquisition of host HLA-DR by clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 expanded in primary human cells depending on the nature of producing cells and the donor source. *J Gen Virol* **82**:2979-87.
14. **Capobianchi, M. R., S. Fais, C. Castilletti, M. Gentile, F. Ameglio, and F. Dianzani.** 1994. A simple and reliable method to detect cell membrane proteins on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Infect Dis* **169**:886-9.
15. **Cayota, A., F. Vuillier, D. Scott-Algara, V. Feuillie, and G. Dighiero.** 1992. Impaired proliferative capacity and abnormal cytokine profile of naive and memory CD4 T cells from HIV-seropositive patients. *Clin Exp Immunol* **88**:478-83.
16. **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**:183-8.
17. **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**:179-91.
18. **Dustin, M. L., T. G. Bivona, and M. R. Philips.** 2004. Membranes as messengers in T cell adhesion signaling. *Nat Immunol* **5**:363-72.

19. **Engelman, A., G. Englund, J. M. Orenstein, M. A. Martin, and R. Craige.** 1995. Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication. *J Virol* **69**:2729-36.
20. **Farber, D. L.** 2003. Remembrance of antigens past: new insights into memory T cells. *Scand J Immunol* **58**:145-54.
21. **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.
22. **Fortin, J. F., R. Cantin, and M. J. Tremblay.** 1998. T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 particles bearing host-encoded ICAM-1. *J Virol* **72**:2105-12.
23. **Frank, I., H. Stoiber, S. Godar, H. Stockinger, F. Steindl, H. W. Katinger, and M. P. Dierich.** 1996. Acquisition of host cell-surface-derived molecules by HIV-1. *Aids* **10**:1611-20.
24. **Giguere, J. F., and M. J. Tremblay.** 2004. Statin Compounds Reduce Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication by Preventing the Interaction between Virion-Associated Host Intercellular Adhesion Molecule 1 and Its Natural Cell Surface Ligand LFA-1. *J Virol* **78**:12062-5.
25. **Hussain, S. F., C. F. Anderson, and D. L. Farber.** 2002. Differential SLP-76 expression and TCR-mediated signaling in effector and memory CD4 T cells. *J Immunol* **168**:1557-65.
26. **Iezzi, G., K. Karjalainen, and A. Lanzavecchia.** 1998. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* **8**:89-95.
27. **Janossy, G., N. Borthwick, R. Lomnitzer, E. Medina, S. B. Squire, A. N. Phillips, M. Lipman, M. A. Johnson, C. Lee, and M. Bofill.** 1993. Lymphocyte activation in HIV-1 infection. I. Predominant proliferative defects among CD45R0+ cells of the CD4 and CD8 lineages. *Aids* **7**:613-24.
28. **Kim, M., C. V. Carman, and T. A. Springer.** 2003. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* **301**:1720-5.

29. **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.
30. **Kinoshita, S., L. Su, M. Amano, L. A. Timmerman, H. Kaneshima, and G. P. Nolan.** 1997. The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells. *Immunity* **6**:235-44.
31. **Krauss, K., and P. Altevogt.** 1999. Integrin leukocyte function-associated antigen-1-mediated cell binding can be activated by clustering of membrane rafts. *J Biol Chem* **274**:36921-7.
32. **Kuiper, H., M. Brouwer, M. de Boer, P. Parren, and R. A. van Lier.** 1994. Differences in responsiveness to CD3 stimulation between naive and memory CD4+ T cells cannot be overcome by CD28 costimulation. *Eur J Immunol* **24**:1956-60.
33. **Leitenberg, D., T. J. Novak, D. Farber, B. R. Smith, and K. Bottomly.** 1996. The extracellular domain of CD45 controls association with the CD4-T cell receptor complex and the response to antigen-specific stimulation. *J Exp Med* **183**:249-59.
34. **List, J., and A. T. Haase.** 1997. Integration of visna virus DNA occurs and may be necessary for productive infection. *Virology* **237**:189-97.
35. **Margolick, J. B., D. J. Volkman, T. M. Folks, and A. S. Fauci.** 1987. Amplification of HTLV-III/LAV infection by antigen-induced activation of T cells and direct suppression by virus of lymphocyte blastogenic responses. *J Immunol* **138**:1719-23.
36. **Martin, G., and M. J. Tremblay.** 2004. HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L, and CD86 are incorporated to a similar degree into clinical human immunodeficiency virus type 1 variants expanded in natural reservoirs such as peripheral blood mononuclear cells and human lymphoid tissue cultured ex vivo. *Clin Immunol* **111**:275-85.
37. **Medina, E., N. Borthwick, M. A. Johnson, S. Miller, and M. Bofill.** 1994. Flow cytometric analysis of the stimulatory response of T cell subsets from normal and HIV-1+ individuals to various mitogenic stimuli in vitro. *Clin Exp Immunol* **97**:266-72.

38. **Miedema, F.** 1992. Immunological abnormalities in the natural history of HIV infection: mechanisms and clinical relevance. *Immunodeficiency Rev* **3**:173-93.
39. **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**:6430-5.
40. **Porter, J. C., M. Bracke, A. Smith, D. Davies, and N. Hogg.** 2002. Signaling through integrin LFA-1 leads to filamentous actin polymerization and remodeling, resulting in enhanced T cell adhesion. *J Immunol* **168**:6330-5.
41. **Rizzuto, C. D., and J. G. Sodroski.** 1997. Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization. *J Virol* **71**:4847-51.
42. **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**:23733-41.
43. **Roederer, M., P. A. Raju, D. K. Mitra, and L. A. Herzenberg.** 1997. HIV does not replicate in naive CD4 T cells stimulated with CD3/CD28. *J Clin Invest* **99**:1555-64.
44. **Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia.** 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* **22**:745-63.
45. **Sampath, R., P. J. Gallagher, and F. M. Pavalko.** 1998. Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin. *J Biol Chem* **273**:33588-94.
46. **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**:1401-7.

47. **Schellekens, P. T., M. T. Roos, F. De Wolf, J. M. Lange, and F. Miedema.** 1990. Low T-cell responsiveness to activation via CD3/TCR is a prognostic marker for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infected men. *J Clin Immunol* **10**:121-7.
48. **Smith, C. W., S. D. Marlin, R. Rothlein, C. Toman, and D. C. Anderson.** 1989. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest* **83**:2008-17.
49. **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**:1774-85.
50. **Stevenson, M.** 1997. Molecular mechanisms for the regulation of HIV replication, persistence and latency. *Aids* **11 Suppl A**:S25-33.
51. **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**:1551-60.
52. **Stewart, M. P., A. McDowall, and N. Hogg.** 1998. LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca²⁺-dependent protease, calpain. *J Cell Biol* **140**:699-707.
53. **Stout, R. D., and J. Suttles.** 1992. T cells bearing the CD44^{hi} "memory" phenotype display characteristics of activated cells in G1 stage of cell cycle. *Cell Immunol* **141**:433-43.
54. **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.
55. **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**:12299-309.

56. **Tardif, M. R., and M. J. Tremblay.** 2005. Regulation of LFA-1 activity through cytoskeleton remodeling and signaling components modulates the efficiency of HIV type-1 entry in activated CD4⁺ T lymphocytes. *Journal of Immunology* **in press**.
57. **Tremblay, M. J., J. F. Fortin, and R. Cantin.** 1998. The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunol Today* **19**:346-51.
58. **Tsurutani, N., M. Kubo, Y. Maeda, T. Ohashi, N. Yamamoto, M. Kannagi, and T. Masuda.** 2000. Identification of critical amino acid residues in human immunodeficiency virus type 1 IN required for efficient proviral DNA formation at steps prior to integration in dividing and nondividing cells. *J Virol* **74**:4795-806.
59. **van Kooyk, Y., S. J. van Vliet, and C. G. Figdor.** 1999. The actin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes. *J Biol Chem* **274**:26869-77.
60. **van Kooyk, Y., P. Weder, K. Heije, and C. G. Figdor.** 1994. Extracellular Ca²⁺ modulates leukocyte function-associated antigen-1 cell surface distribution on T lymphocytes and consequently affects cell adhesion. *J Cell Biol* **124**:1061-70.
61. **van Kooyk, Y., P. Weder, F. Hogervorst, A. J. Verhoeven, G. van Seventer, A. A. te Velde, J. Borst, G. D. Keizer, and C. G. Figdor.** 1991. Activation of LFA-1 through a Ca²⁺(+)-dependent epitope stimulates lymphocyte adhesion. *J Cell Biol* **112**:345-54.
62. **Wiskerchen, M., and M. A. Muesing.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 integrase: effects of mutations on viral ability to integrate, direct viral gene expression from unintegrated viral DNA templates, and sustain viral propagation in primary cells. *J Virol* **69**:376-86.
63. **Wu, Y., and J. W. Marsh.** 2003. Early transcription from nonintegrated DNA in human immunodeficiency virus infection. *J Virol* **77**:10376-82.
64. **Yan, B., D. A. Calderwood, B. Yaspan, and M. H. Ginsberg.** 2001. Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem* **276**:28164-70.

Figure legends

Figure 1. Virus production following infection of activated and quiescent CD4⁺ T cell subsets. Naive (\square) and memory (λ) CD4⁺ T cells were either treated with PHA and IL-2 for 24 h (activated) (panel A) or left untreated (quiescent) (panel B) before incubation at 37°C for 2 h with similar amounts of isogenic NL4-3 particles, either lacking (dotted lines) or bearing (continuous lines) host-derived ICAM-1 (5 ng of p24 per 10⁵ cells). Cells were extensively washed, resuspended in complete culture medium containing IL-2 and cell-free supernatants were collected at days 3, 6, 9 and 12 post-infection. Virus production was estimated by assessing p24 production. Experiments were performed in triplicate and standard deviations are indicated. Data shown are representative of three separate experiments with different donors.

Figure 2. Measurements of integrated HIV-1 DNA in resting naive and memory CD4⁺ T cells. The freshly separated naive and memory subsets of CD4⁺ T cells were incubated with virus preparations for 6 h at 37°C, washed and maintained in culture for an additional 72 h. Genomic DNA was extracted and subjected in duplicate to a first PCR with *Alu* and M661 primers to amplify integrated proviruses. Next, the first PCR products were diluted 25-fold and subjected to real-time PCR using AA55 and M667 primers to further amplify integrated HIV-1 LTR. The number of NL4-3 copies was determined by a standard curve prepared with the NL4-3 vector. Results shown are representative of two experiments made with different donors.

Figure 3. Efficiency of reverse transcription following inoculation of resting CD4⁺ T cell subsets. Naive (□) and memory CD4⁺ T cells (λ) were incubated at 37°C for 4 h with NL4-3 (dotted lines) or NL4-3/ICAM-1 (continuous lines), washed and treated with 10 μM AZT for 16 h. Cells were washed twice to remove excess of AZT and cultures were maintained for 9 additional days. Cell-free supernatants were harvested at days 3, 6 and 9 and released viruses were quantified by p24 test. Experiments were performed in triplicate and standard deviations are indicated. Data shown are representative of six separate experiments made with different donors.

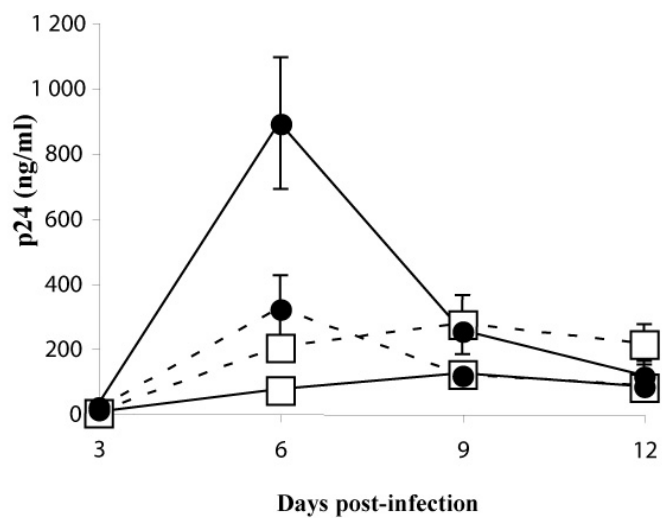
Figure 4. Distribution of LFA-1 on naive and memory CD4⁺ T cells. A) Freshly isolated naive and memory CD4⁺ T cells were labelled with an anti-CD11a or an anti-CD18 antibody followed by a R-PE-conjugated goat anti-mouse antibody as described in Materials and Methods. The expression of both subunits was measured by flow cytometry analyses (MFI: mean fluorescence intensity). B) Resting naive and memory CD4⁺ T lymphocytes as well as naive CD4⁺ T cells stimulated for 24 h with PHA/IL-2 were labelled with a mouse anti-LFA-1 (MEM25) followed by a Cy5-conjugated goat anti-mouse antibody. Cells were visualized by confocal microscopy. The images shown are a 3D reconstructed Z series and the individual sections are taken along the X-Y axis. Arrows indicate LFA-1 clusters. Data shown are representative of three separate experiments made with different donors. C) Resting and activated (24 or 48 h) CD4⁺ T cell subsets were labelled with an anti-CD11a or an anti CD18 followed by a R-PE-conjugated goat anti-mouse antibody. The MFI of both subunits was evaluated by FACS analysis.

Figure 5. Attachment and entry of viruses either lacking or bearing host-derived ICAM-1 in quiescent and activated CD4⁺ T cell subsets. A) Naive and memory quiescent or activated CD4⁺ T cells (i.e., treated with PHA and IL-2 for 24h) were either untreated or treated for 30 min at 37°C with the blocking anti-LFA-1 antibody MEM25 before incubation for 1 h with the studied virus preparations. B) Resting naive and memory CD4⁺ T cells were either left untreated or were treated with SIM.2 or T-20 followed by incubation with the listed viruses preparations for 3 h at 37°C. Virus entry assays were performed as described in Materials and Methods. Data shown are representative of three separate experiments. C) Virus were stained on both cellular subsets as described in Materials and Methods and visualized by confocal microscopy. The images are 3D reconstructed Z series and the individual sections are taken along the X-Y axis. Data shown are representative of three separate experiments.

Figure 6. HIV-1 infection of a heterogeneous CD4⁺ T cells population. Unseparated resting CD4⁺ T cells were either left untreated or were treated with lovastatin (50 μM) or pravastatin (50 μM) for 30 min at 37°C before an incubation for 6 h with HIV-1 particles either devoid or bearing the adhesion molecule ICAM-1. Cells were next washed and naive and memory CD4⁺ T cells were separated as described in Materials and Methods. Cells were maintained in culture in the presence of PHA and IL-2 for an additional 72 h and supernatants were harvested to estimate virus production. Experiments were performed in triplicate and standard deviations are indicated. Results shown are representative of three different experiments.

Figure 1

A



B

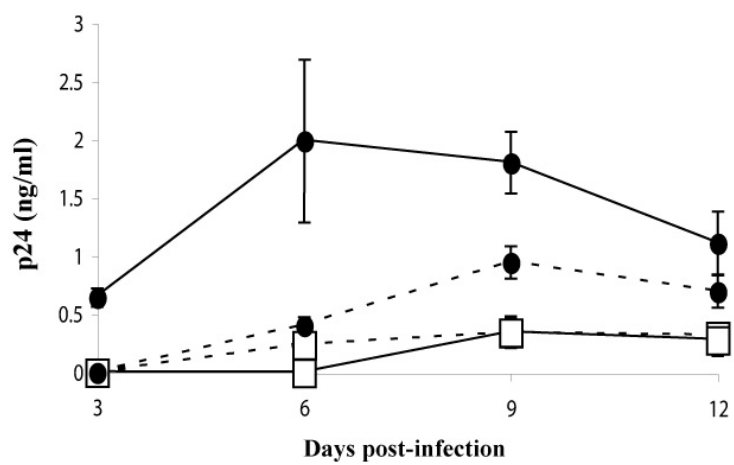


Figure 2

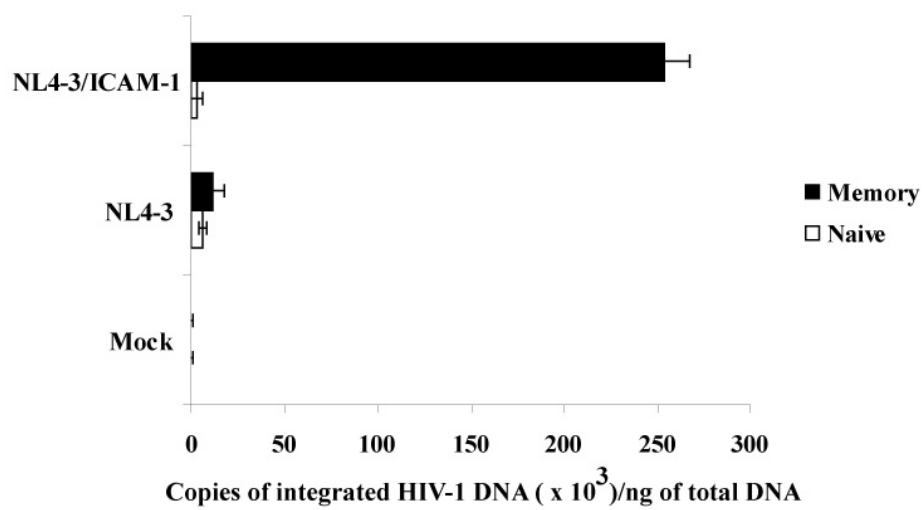


Figure 3

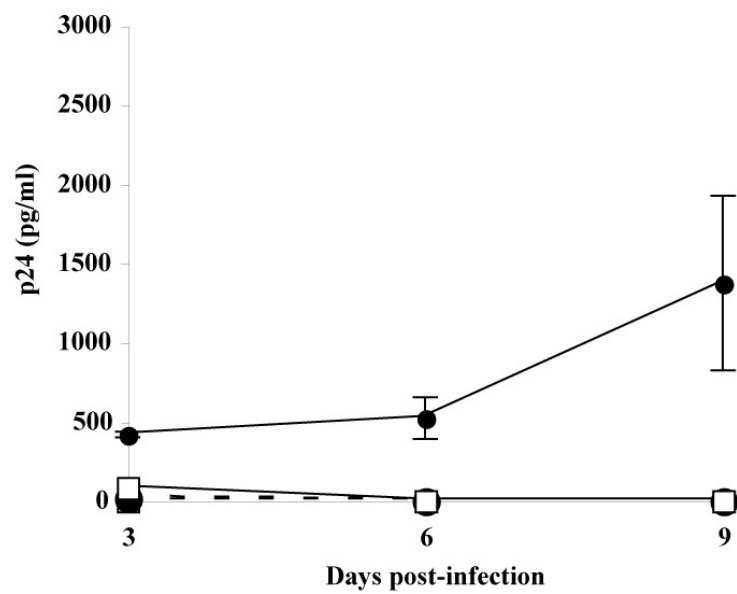


Figure 4

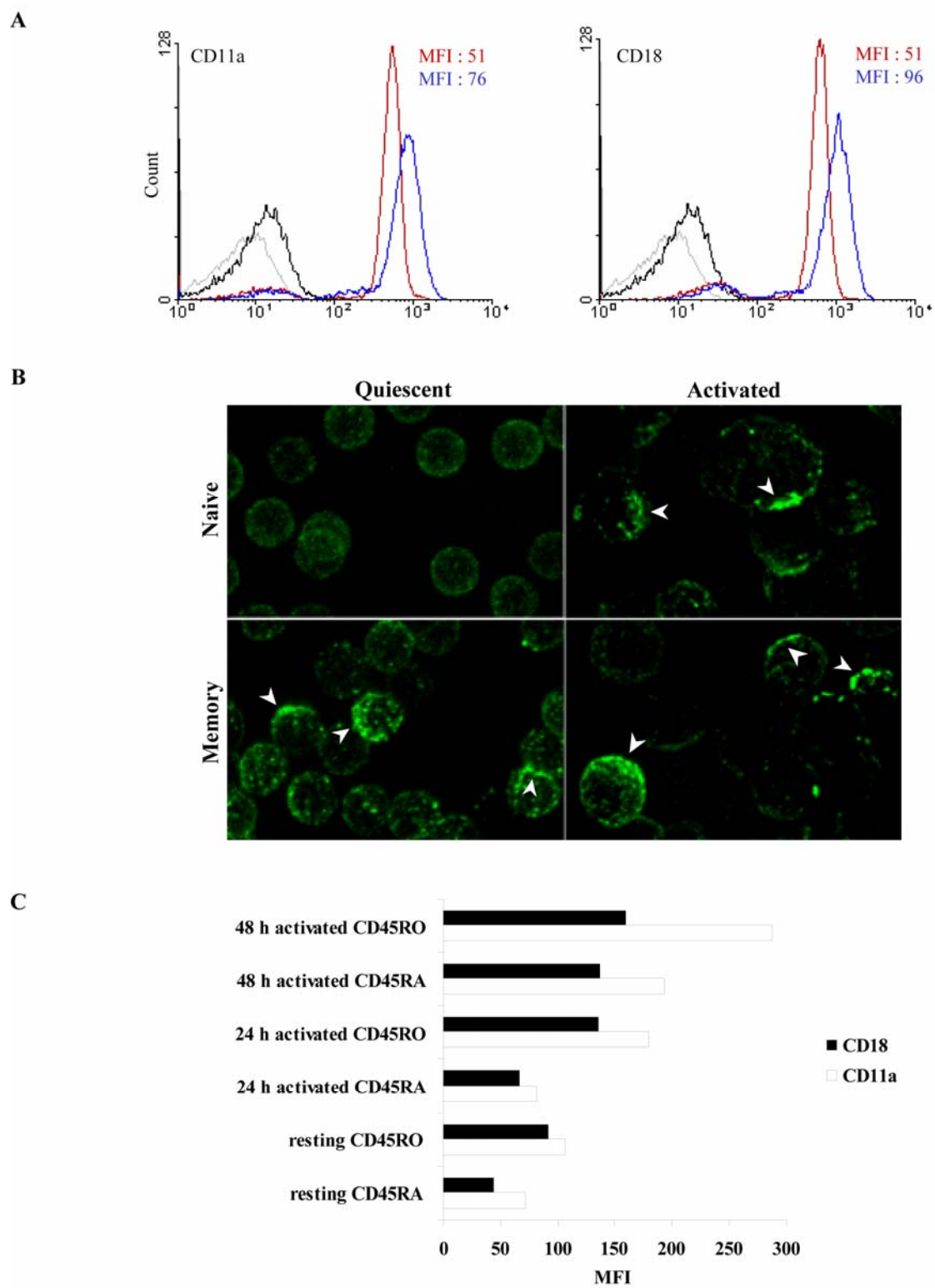
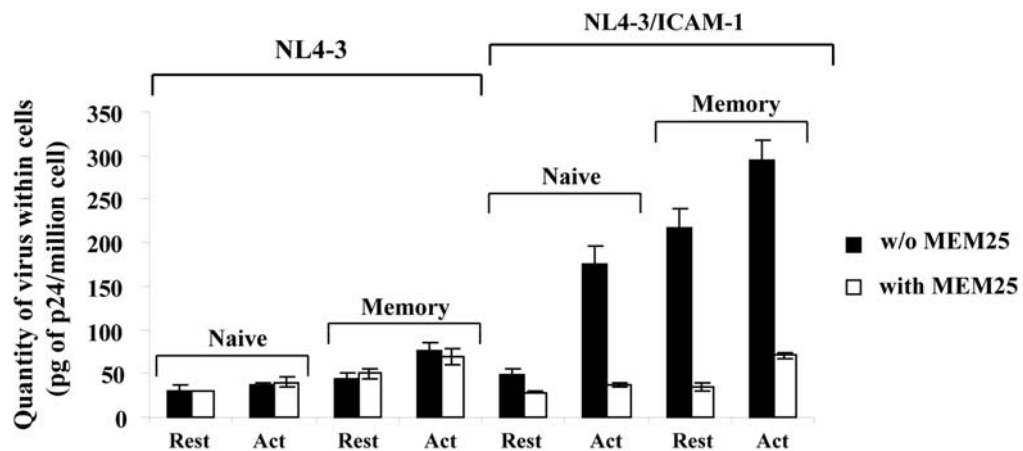
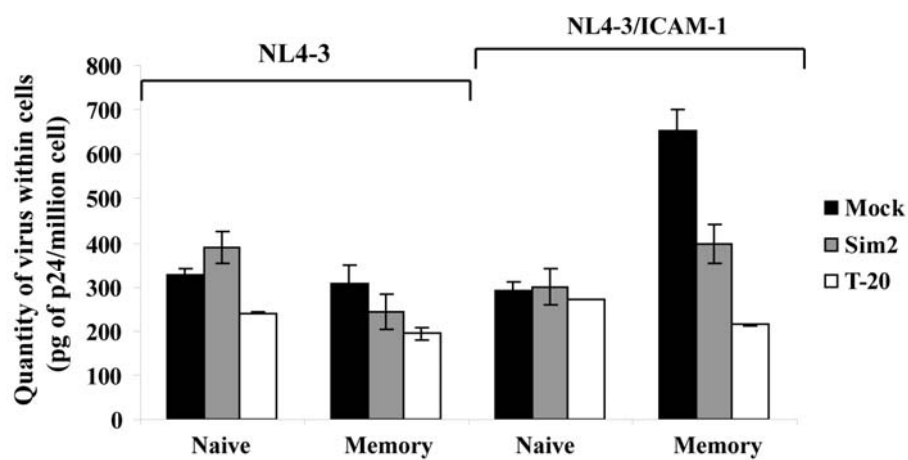


Figure 5

A



B



C

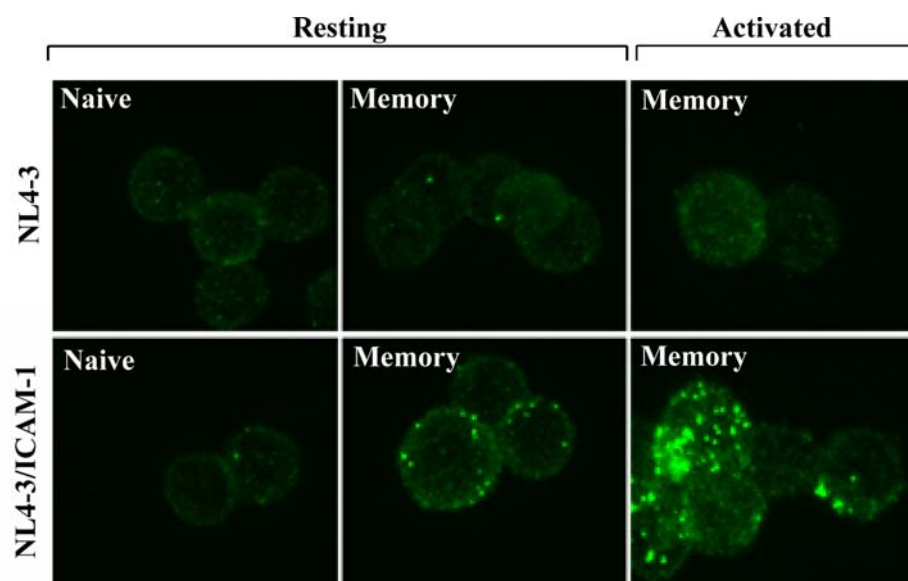
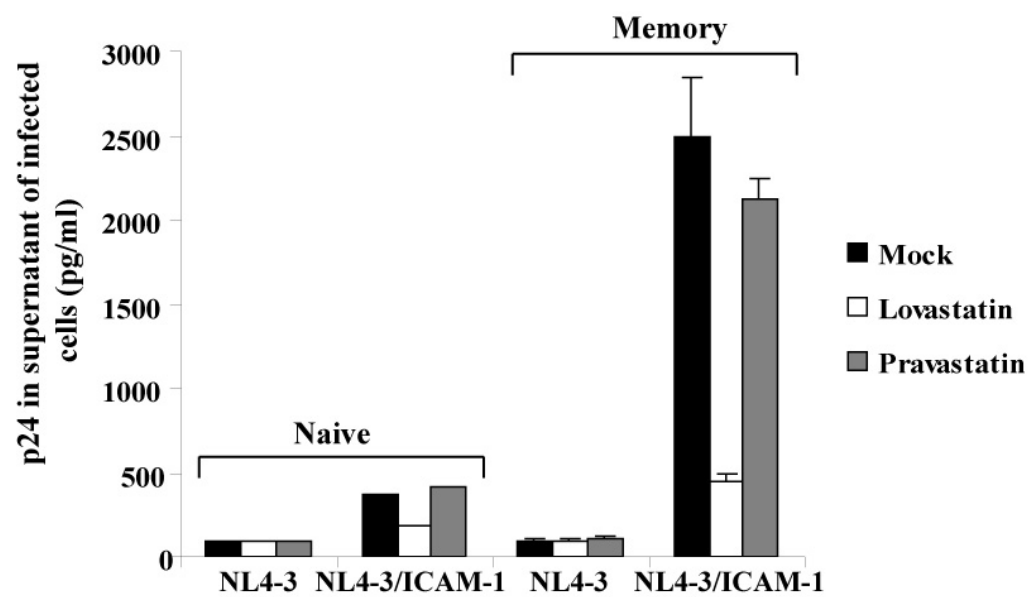


Figure 6



Chapitre VII. Discussion générale

Par le rôle central qu'elles exercent dans le processus infectieux, l'adhésion et la fusion du VIH-1 sont des cibles pharmacologiques actuellement très prisées par les compagnies pharmaceutiques. Les efforts sont principalement concentrés sur l'étude des changements moléculaires qui surviennent dans les glycoprotéines virales et qui régissent les étapes précoces du cycle répliatif du VIH-1. Or, la fusion ne dépend pas exclusivement du VIH-1 lui-même, mais plutôt d'interactions complexes entre ce dernier et la cellule hôte. D'autre part, les notions sur les événements se produisant en amont, notamment le contact initial, la stabilisation de l'interaction, le réarrangement des récepteurs et des co-récepteurs dans la membrane, la stochiométrie de la réaction de même que les facteurs cellulaires participant à la génération du pore de fusion, demeurent méconnus. Les travaux présentés dans cette thèse ont exploré cet univers en amont de la fusion. Ils ont mis en lumière l'existence d'un dialogue entre le virus et la cellule hôte, un tête-à-tête essentiel pour l'accès du virus au cytosol.

L'élucidation des étapes en amont de la fusion du VIH-1 est un objectif très populaire. Bien que les événements nécessaires à la génération du pore de fusion s'enchaînent étroitement, beaucoup étudient ces étapes de manière isolée. De plus, de nombreuses théories se fondent sur des données acquises avec des cellules épithéliales modifiées (p.e. HeLa-CD4) ou des lignées lymphocytaires T (Jurkat, SupT1, PM1, CEMT4, H9) [213, 222, 229, 234, 235, 273, 723], lesquelles ne correspondent pas aux cellules normales du corps humain ni celles infectées de façon préférentielle par le VIH-1. L'expression des protéines, la glycosylation, l'organisation des domaines membranaires (radeaux lipidiques), la quantité de cholestérol dans la membrane, le métabolisme des phospholipides et des phosphoinositides, la réorganisation du cytosquelette d'actine et les voies de signalisation y sont généralement perturbés ou du moins bien différents de ceux des cellules primaires. Pourtant, tous ces éléments participent à l'attachement, à l'organisation du pore de fusion et à la fusion des bicouches lipidiques. Par conséquent, la meilleure façon d'étudier ces phénomènes

demeure l'emploi de cellules généralement infectées par le VIH-1, soient les lymphocytes T CD4⁺ et les monocytes/macrophages issus du sang périphérique ou des amygdales (de donneurs séronégatifs). L'utilisation de ces cellules comporte certaines difficultés, mais les résultats qui en découlent sont nettement plus crédibles. L'inconvénient majeur des cellules primaires consiste en l'impossibilité de les transfecter de manière efficace, ce qui s'avère problématique lorsqu'on désire inactiver un gène ou une protéine. Heureusement, des inhibiteurs spécifiques (pour certaines voies de signalisation) permettent de contrecarrer cet inconvénient et d'obtenir sensiblement les mêmes informations.

L'origine des virus constitue l'autre aspect à prendre en considération lors de l'étude des événements initiaux du cycle viral. La cellule productrice laisse des empreintes sur l'enveloppe du VIH-1. Le profil des molécules de l'hôte incorporées dans l'enveloppe du virus, de même que le degré de glycosylation des glycoprotéines virales modifient la capacité du VIH-1 à s'attacher aux cellules cibles. L'incorporation des molécules de l'hôte est un phénomène relativement bien conservé parmi les souches virales en dépit de la très grande variabilité génomique du VIH-1. D'ailleurs, les particules virales issues des cellules immunitaires (lymphocytes T CD4⁺ et macrophages primaires) portent toujours la molécule d'adhésion ICAM-1 et les molécules du CMH-II (plus spécifiquement le HLA-DR) dans leur enveloppe [1, 2, 4]. La quantité de molécules acquises dépend de l'état d'activation des cellules et de la lignée productrice. Beaucoup d'études sont réalisées à l'aide de virus produits dans les 293T, une lignée de cellules épithéliales. Or, très différentes des lymphocytes T CD4⁺ et des macrophages, les 293T expriment moins de protéines à leur surface et sont dépourvues des molécules d'ICAM-1 (ainsi que d'autres molécules naturellement retrouvées sur les virus issus des PBMCs). Par conséquent, les empreintes laissées sur les virus issus des 293T diffèrent de celles généralement retrouvées chez les individus infectés. L'absence de protéines potentiellement utiles à l'attachement et à la génération du pore de fusion fait en sorte que les résultats obtenus avec ces virus sont plus ou moins valables. Par contre, ce système de production virale comprend un avantage : il permet d'ajouter une molécule de l'hôte spécifique sur le virus (naturellement trouvée sur le VIH-1 issu des PBMCs mais absente de ceux provenant des 293T) et ce uniquement par

la transfection du gène d'intérêt. Ainsi, on obtient une production virale qui contient la molécule d'intérêt et une autre qui en est dépourvue. Il s'agit d'un avantage considérable lorsque l'on étudie l'impact d'une seule molécule de l'hôte sur l'infection. Néanmoins, la confirmation des résultats avec des virus issus de PBMCs, lesquels correspondent aux virus retrouvés chez les personnes séropositives, demeure essentielle à l'interprétation des résultats.

L'approche adoptée lors de mes études fut l'utilisation de lymphocytes T CD4⁺ primaires, issus du sang périphérique, de même que l'emploi de virus produits à la fois dans le système des 293T (transfectées ou non avec le gène codant pour l'ICAM-1) et celui des PBMCs. Mes travaux ont ainsi permis de caractériser deux co-facteurs cellulaires (ICAM-1 et LFA-1) participant à l'adsorption initiale du VIH-1 et à la génération du pore de fusion, processus essentiels à l'infection des lymphocytes T CD4⁺ primaires. Ces résultats suggèrent que ces interactions additionnelles entre le VIH-1 et sa cellule cible sont déterminantes pour la réplication virale et peuvent être responsables, du moins en partie, de la susceptibilité accrue de certaines sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ (cellules mémoire centrale et cellules effectrices) à l'infection par le VIH-1.

7.1 Le LFA-1 permet la liaison initiale du VIH-1

Le VIH est un parasite intracellulaire. Une fois à l'intérieur de l'organisme, il doit rapidement trouver une cellule permissive à l'infection afin d'échapper à l'environnement hostile et de se multiplier. La lutte contre les éléments répulsifs environnants (répulsions électrostatiques, mouvement brownien, courant, microvillosités, cellules non permissives, etc.) rend difficile la toute première étape du cycle viral ; l'adhésion à une cellule susceptible de répliquer le virus. La sensibilité d'une cellule à l'infection est dictée par la présence de récepteurs spécifiques aux glycoprotéines présentes sur l'enveloppe virale. Le CD4 est le premier récepteur cellulaire qui nous vient à l'esprit. Pourtant, de récentes

études démontrent que le virus peut s'attacher à des cellules dépourvues de CD4 [174-176, 192, 199, 200]. D'autre part, il est bien établi que l'affinité et l'avidité des récepteurs cellulaires pour les composantes « virales » représentent deux paramètres fondamentaux à la spécificité et à la durabilité de l'adhésion. Les études menées au début des années 90 montraient que la molécule de CD4 a une affinité élevée pour la gp120 monomérique [80, 190, 191, 724, 725]. Or, les glycoprotéines virales s'organisent en oligomères sur les virus [60, 726-728]. Sous cette forme, l'accessibilité des épitopes liant le CD4 est forcément moindre. En effet, il s'avère que l'affinité des molécules de CD4 pour les oligomères de gp120 est nettement inférieure, particulièrement dans le cas des souches cliniques [192, 193, 726, 729, 730]. Pourtant, les effets dévastateurs du VIH-1 sur l'organisme sont bien réels et le virus ne semble pas avoir de difficulté à infecter les lymphocytes T CD4⁺. Puisque le CD4 ne possède pas les propriétés recherchées pour lier rapidement et fermement le virus, l'attachement initial est orchestré vraisemblablement par d'autres facteurs cellulaires [192, 203].

Des travaux antérieurs suggéraient que la molécule de l'hôte ICAM-1, incorporée dans l'enveloppe du VIH-1, et son récepteur LFA-1, exprimé à la surface des lymphocytes T CD4⁺, augmentaient l'infectivité des virus en lui permettant de s'attacher plus facilement aux cellules cibles [2, 3, 5-7]. Cette hypothèse s'est confirmée pendant mes études. La participation des molécules ICAM-1 et LFA-1 dans l'adsorption initiale du VIH-1 est intimement liée aux propriétés adhérentes de ces deux molécules. En effet, elles défient les charges négatives des membranes cellulaires, déclenchent l'adhésion intercellulaire et stabilisent la synapse. Tous ces aspects correspondent aux propriétés recherchées pour un « récepteur » cellulaire pouvant servir de point d'ancrage à un virus.

Comme il a été mentionné auparavant, la molécule ICAM-1 s'incorpore dans l'enveloppe du VIH-1 lors du processus de bourgeonnement [1, 2, 4]. Son insertion se réalise grâce au Pr55Gag et au cytosquelette d'actine [357]. L'ICAM-1 est alors une composante externe du

VIH-1 au même titre que la gp120. Même si la quantité d'ICAM-1 sur le virus est probablement inférieure à celle des glycoprotéines virales, les nombreuses propriétés de LFA-1 jouent en sa faveur. D'abord, l'intégrine possède une taille supérieure à celle de la molécule de CD4. Alors que cette dernière s'étend sur une hauteur de 120 Å (à partir de la membrane plasmique) [87], le LFA-1 s'allonge sur environ 200 Å lorsqu'il est dans une conformation ouverte (affinité intermédiaire ou élevée) [626]. Cette différence influence forcément la capacité des récepteurs à capturer les virus libres. En outre, contrairement au CD4 qui ne semble pas moduler son affinité pour la gp120, le LFA-1 possède trois degrés d'affinités pour l'ICAM-1 : faible ($K_d = 1 \text{ mM}$), intermédiaire ($K_d = 10 \text{ }\mu\text{M}$) et haute ($K_d = 100 \text{ nM}$) [625]. La conformation de faible affinité (conformation « fermée » d'environ 100 Å) se présente principalement sur les cellules T CD4⁺ naïves. Cette forme masque le domaine I empêchant la liaison de l'ICAM-1. L'interaction entre les deux partenaires requiert l'état d'affinité intermédiaire, alors que l'état de haute affinité s'obtient après la liaison de l'ICAM-1. Les résultats expérimentaux présentés dans cette thèse confirment que la conformation « fermée » de LFA-1 sur la cellule naïve rend difficile l'attachement des virus. Ces derniers se lient probablement grâce à d'autres molécules cellulaires, incluant le CD4, lesquelles rendent moins efficaces les événements les plus précoces du cycle viral. Étrangement, l'état d'affinité de LFA-1 sur les lymphocytes T CD4⁺ mémoire centrale (Tmc) n'a jamais été investigué auparavant. On sait seulement que l'intégrine y est fortement exprimée. Or, ces cellules répondent rapidement à un antigène de rappel, suggérant qu'elles pourraient contenir une certaine proportion d'intégrines à affinité intermédiaire. Cette possibilité s'est confirmée par l'observation d'un attachement plus abondant des virus_{ICAM-1+} sur ces cellules, en absence d'agents agonistes. De plus, l'ajout de Mn²⁺, d'anticorps MEM83 ou de la chimiokine SDF-1, trois molécules qui augmentent la quantité d'intégrine dans un état d'affinité intermédiaire et/ou haute, intensifie l'adsorption des particules virales sur les cellules Tmc (résultats obtenus durant mon doctorat, mais qui demeurent non publiés). Sensiblement les mêmes conclusions ont été observées avec les lymphocytes T CD4⁺ activés, lesquels contiennent des quantités élevées de LFA-1 mobiles à affinité intermédiaire (suite à la signalisation *inside-out*) (article 1, figure 2). La participation directe de LFA-1 à l'adhésion initiale du virus_{ICAM-1+} aux cellules Tmc et activées a été confirmée par l'utilisation d'anticorps qui bloquent le domaine I du CD11a

(le MEM25 ou MEM30). Les résultats démontrent que ces anticorps préviennent l'attachement des virus_{ICAM-1+} aux lymphocytes Tmc et aux cellules T activées, sans affecter de façon significative celui aux cellules naïves. D'autre part, les analyses faites par microscopie confocale prouvent que la totalité des virus_{ICAM-1+} co-localise avec les molécules de LFA-1 sur les lymphocytes T CD4⁺ activés et que très peu co-localisent avec les molécules de CD4 et de CXCR4 (article 2, figure 7). Ces données suggèrent que les intégrines stabilisent la liaison des particules virales sur les lymphocytes T CD4⁺, un élément clé à la coordination de la fusion.

La durée d'une interaction adhésive dépend de la nature de la liaison et de la force des liens unissant les protéines. L'interaction entre la gp120 et le CD4 est instable et réversible [191]. Par opposition, la dissociation du lien unissant l'ICAM-1 et le LFA-1 est très lente [731]. Donc, un virus qui se fixe uniquement par l'intermédiaire des CD4 a plus de chances de se dissocier avant d'avoir rencontré les co-récepteurs appropriés que s'il se lie avec les molécules de LFA-1. La quantité de liens formés entre le virus et la cellule influence grandement le devenir de l'infection. Les lymphocytes T CD4⁺ « mémoire centrale » et les cellules effectrices expriment beaucoup de LFA-1, ce qui facilite les interactions multiples avec les molécules d'ICAM-1 ancrées dans l'enveloppe virale. De plus, tous les phénomènes d'adhésion homotypique ou d'agrégation intercellulaire, médiés par l'ICAM-1 lors de l'activation cellulaire, induisent le regroupement des intégrines dans la membrane des cellules, un phénomène qui augmente la probabilité que les virus_{ICAM-1+} s'attachent fermement sur ces cellules.

L'autre aspect défavorable à l'adhésion médiée par les molécules de CD4 est l'endocytose. Parmi toutes les molécules de CD4 présentes dans la membrane plasmique, le VIH-1 doit s'unir à celles liées à la kinase p56^{Lck} afin d'éviter l'internalisation. Cette dernière masque le motif dileucine dans la queue intracytoplasmique du CD4 et entrave son internalisation [250-252]. La p56^{Lck} restreint également la diffusion latérale du CD4 dans la membrane

plasmique en l'associant avec le cytosquelette d'actine [732], un phénomène qui implique les éventuels réarrangements des protéines dans la membrane. Sous cette forme, le CD4 se situe abondamment sur les microvillosités, des régions qui ne permettent pas l'internalisation et qui sont riches en radeaux lipidiques et en microfilaments d'actine [236, 732]. Toutefois, aucune preuve visuelle ne certifie que le VIH-1 se lie de préférence aux microvillosités, même si ces derniers contiennent des molécules de CD4, CXCR4 et CCR5 [236]. Les microvillosités sont des projections de la membrane plasmique qui facilitent l'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales. Ces structures contiennent à leur extrémité des molécules intervenant lors du roulement des leucocytes sur l'endothélium (étape initiale de l'extravasation), incluant la L-sélectine (CD62L) [733, 734], le PSGL-1 (ligand de la P-sélectine) [735] et l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ [736]. Les microvillosités sont également des senseurs par l'expression des récepteurs de chimiokines [236]. Ils permettent de capter des signaux nécessaires à l'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium, lequel est médié par l'intégrine LFA-1 qui se trouve principalement sur la surface lisse des cellules et non au sein des microvillosités [736]. Cette distinction s'explique par le rôle de chacune des molécules dans le processus d'extravasation. Les microvillosités permettent le ralentissement des leucocytes par l'intermédiaire des cellules endothéliales, alors que l'attachement ferme se fait par les intégrines LFA-1 situées sur la surface lisse des leucocytes. La morphologie des microvillosités se modifie selon l'état d'activation cellulaire. D'une hauteur de 300 à 400 nm, les projections membranaires tapissent la majorité de la surface des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs [737-739]. En revanche, ils deviennent plus minces, plus courts et moins denses suite à l'activation puis ils sont remplacés par de nombreux replis. La figure 23 illustre la morphologie d'un lymphocyte T $CD4^+$ au repos puis celle d'un lymphocyte T $CD4^+$ activé par une bille tapissée d'anti-RCT.

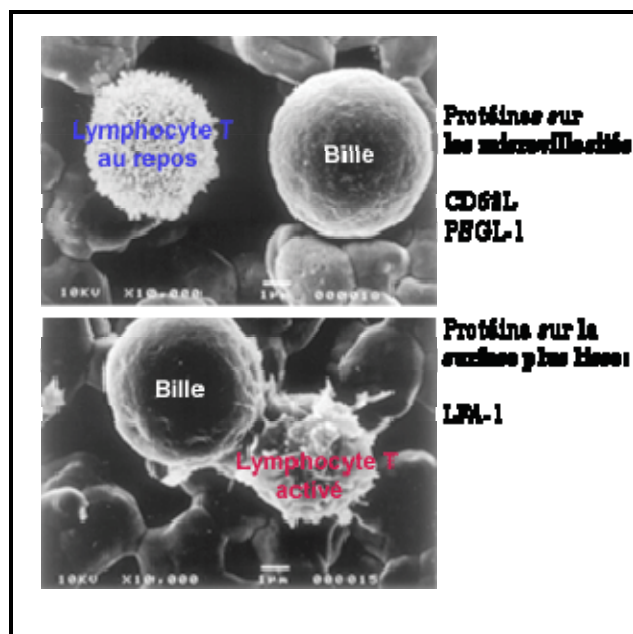


Figure 23. Morphologie d'un lymphocyte T au repos ou activé (adaptée de [738])

Contrairement à ce que l'on pourrait croire, les microvillosités ne constituent pas un obstacle à l'accès des virus à la surface lisse. D'ailleurs, une étude a récemment montré que le virus herpétique *Varicella zoster* se lie principalement sur la surface lisse des lymphocytes T CD4⁺ [740]. Dans le cadre de mes études, aucune donnée n'indique que les microvillosités représentent une barrière à l'attachement des virus_{ICAM-1+}. Les images obtenues par microscopie confocale démontrent au contraire que les virus_{ICAM-1+} semblent se fixer de préférence à la surface lisse des lymphocytes T CD4⁺ activés, et non aux structures riches en actine, lesquelles ressemblent à des microvillosités (article 2, figure 6). La même tendance s'observe chez les virus dépourvus de molécules d'ICAM-1. Les microvillosités ont probablement la capacité de ralentir les virus libres et de les propulser vers la surface cellulaire. L'emprisonnement des virus à cet endroit paraît un excellent moyen d'éviter les éléments répulsifs de l'environnement et de prendre ainsi le temps nécessaire pour réunir l'ensemble des facteurs requis à la génération du pore de fusion. Bien que les résultats semblent le suggérer, des analyses par microscopie électronique à balayage et/ou à force atomique demeurent essentielles pour certifier que le VIH-1 s'attache bien à la surface lisse des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ plutôt qu'aux microvillosités.

7.2 Le LFA-1 contribue à l'organisation du pore de fusion

L'efficacité de la fusion est conditionnée par le lieu où le virus se fixe sur la cellule. Son organisation implique un dialogue entre la particule virale et la cellule hôte, laquelle collabore bien malgré elle à sa coordination. La densité des récepteurs et des corécepteurs sur la cellule cible influence considérablement la vitesse et l'efficacité de l'entrée virale. On estime que le changement de conformation de la gp120 nécessite au moins trois liaisons au CD4 [191, 223] alors que la formation du pore de fusion requiert l'engagement d'au moins six molécules de CCR5 [224]. Cependant, la densité des corécepteurs (CXCR4 et CCR5) sur les cellules T CD4⁺ est faible, soit moins de 4 000 molécules de CXCR4 ou CCR5 comparativement à 65 000 pour le CD4 [225]. Même si des amas de CXCR4 se trouvent sur les microvillosités, la distance les séparant des molécules de CD4 est trop importante pour la création du pore de fusion [236], particulièrement dans le cas où les molécules de CD4 demeurent immobiles dans la membrane. L'équipe du Dr Blumenthal propose que la rencontre des oligomères de gp120 avec les co-récepteurs s'organise une fois que les microvillosités s'affaissent, un phénomène coordonné par la dépolymérisation du cytosquelette d'actine, la diffusion latérale des protéines dans la membrane et la présence de cholestérol [233]. Mais comme il a été mentionné précédemment, aucune preuve ne confirme que le virus se lie fermement aux microvillosités et les données recueillies suggèrent le contraire. Les résultats présentés dans cette thèse conduisent à une théorie alternative quant aux éléments qui participent à la génération du pore de fusion. Le modèle se fonde sur la capacité des intégrines à diffuser latéralement dans la membrane, puis à se regrouper en réponse à la signalisation *outside-in* générée par la liaison des ICAM-1 ancrés dans l'enveloppe du VIH-1.

Les données recueillies indiquent que les régions riches en molécules de LFA-1 représentent un endroit favorable à la formation du pore de fusion. Les analyses par microscopie confocale confirment que plus de 40% des molécules de CD4 co-localisent avec LFA-1 sur les lymphocytes T CD4⁺ activés (cellules non infectées) (résultats non

publiés). Cette co-localisation n'est guère surprenante puisque les deux protéines participent activement à la formation de la synapse immunologique lors de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires. La figure 24 rappelle l'organisation de la synapse immunologique.

D'abord, le recrutement d'un lymphocyte dans un organe lymphoïde secondaire s'effectue grâce à des chimiokines, notamment le SLC (agoniste du CCR7) et le SDF-1 (agoniste du CXCR4). Cette première étape active les intégrines LFA-1 (en augmentant leur affinité pour l'ICAM-1). Une fois dans le tissu lymphoïde, le lymphocyte établit des contacts avec des CPA par l'intermédiaire de LFA-1 et d'ICAM-1. L'interaction entre ces deux partenaires déclenche la formation du cSMAC (de l'anglais *central SupraMolecular Activation Clusters*). Une fois que les RCT reconnaissent des peptides nichés dans le CMH-II présents sur les CPA, une cascade de signalisation s'amorce, s'additionnant à celle initialement générée par l'engagement de LFA-1. La résultante consiste au remaniement du cytosquelette d'actine, lequel dirige les intégrines en périphérie (pSMAC) et concentre les RCT au centre (cSMAC). Ce phénomène assure la stabilisation de l'interaction puis maintient la cascade de signalisation nécessaire à la transcription de gènes et à la progression du cycle cellulaire (concept résumé dans [742]).

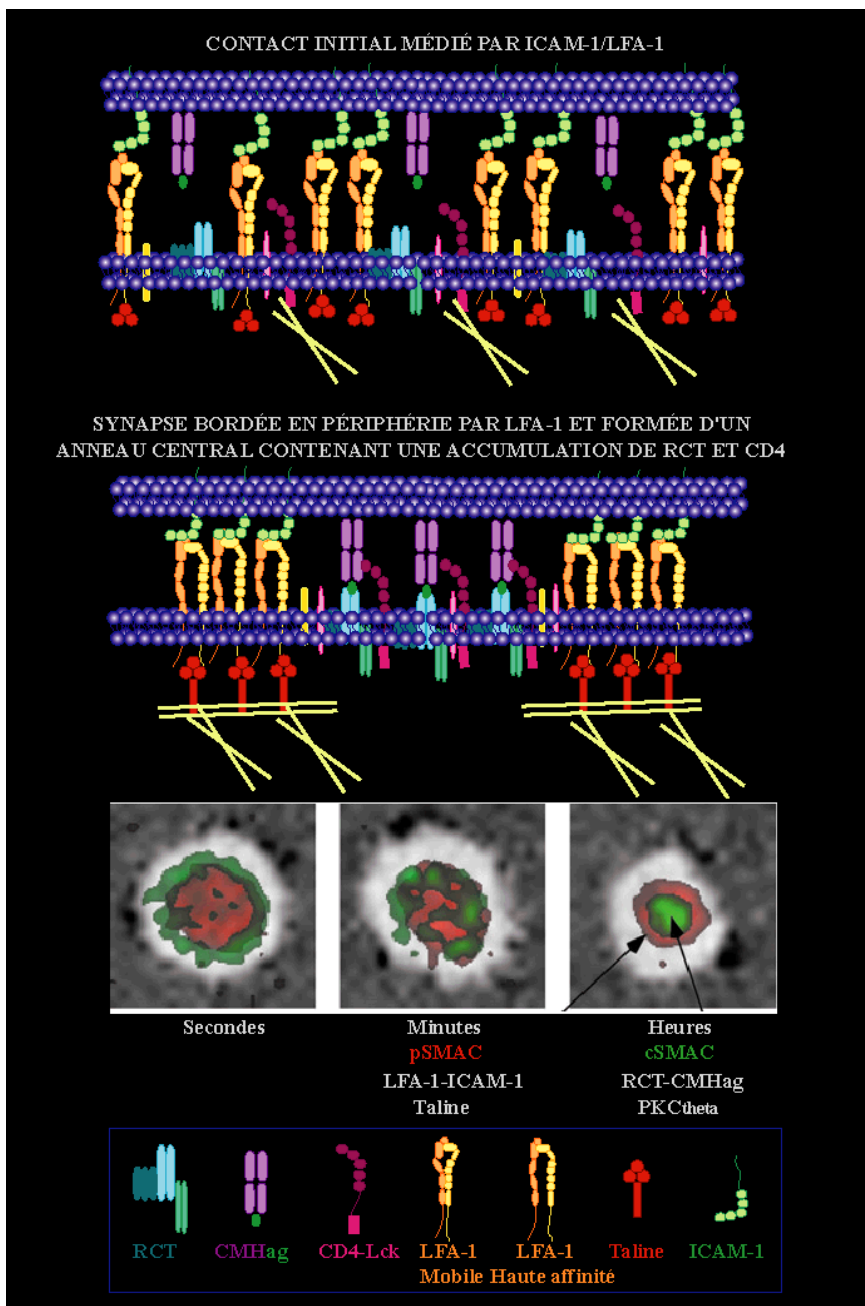


Figure 24. Synapse immunologique (adaptée de [741])

L'attachement du VIH_{ICAM-1+} aux lymphocytes T CD4⁺ (mémoire centrale ou mémoire effectrice) se compare à une synapse immunologique, où le virus agit comme la CPA. Le modèle présenté à la figure 25 montre que le virus se lie d'abord aux molécules de LFA-1 grâce aux ICAM-1 ancrés dans l'enveloppe virale. Ce contact induit une cascade de

signalisation menant au remaniement du cytosquelette d'actine, processus qui regroupe les intégrines et les oriente aux pourtours de la synapse (virus-cellule). La réorganisation de l'actine entraîne également un rapprochement des molécules de CD4 et CXCR4 au centre de la synapse « virologique », lequel entraîne subséquemment la liaison d'oligomères de gp120 avec des molécules de CD4 (couplées à la kinase p56^{Lck}) puis des co-récepteurs. Cette coordination spatio-temporelle favorise la fusion du virus avec la membrane plasmique, une étape indispensable à l'infection productive des lymphocytes T CD4⁺. La figure 25 présente un modèle simplifié de la synapse virologique médiée initialement par les molécules d'ICAM-1 ancrées dans l'enveloppe du VIH-1 et les intégrines LFA-1 exprimées à la membrane des lymphocytes T CD4⁺.

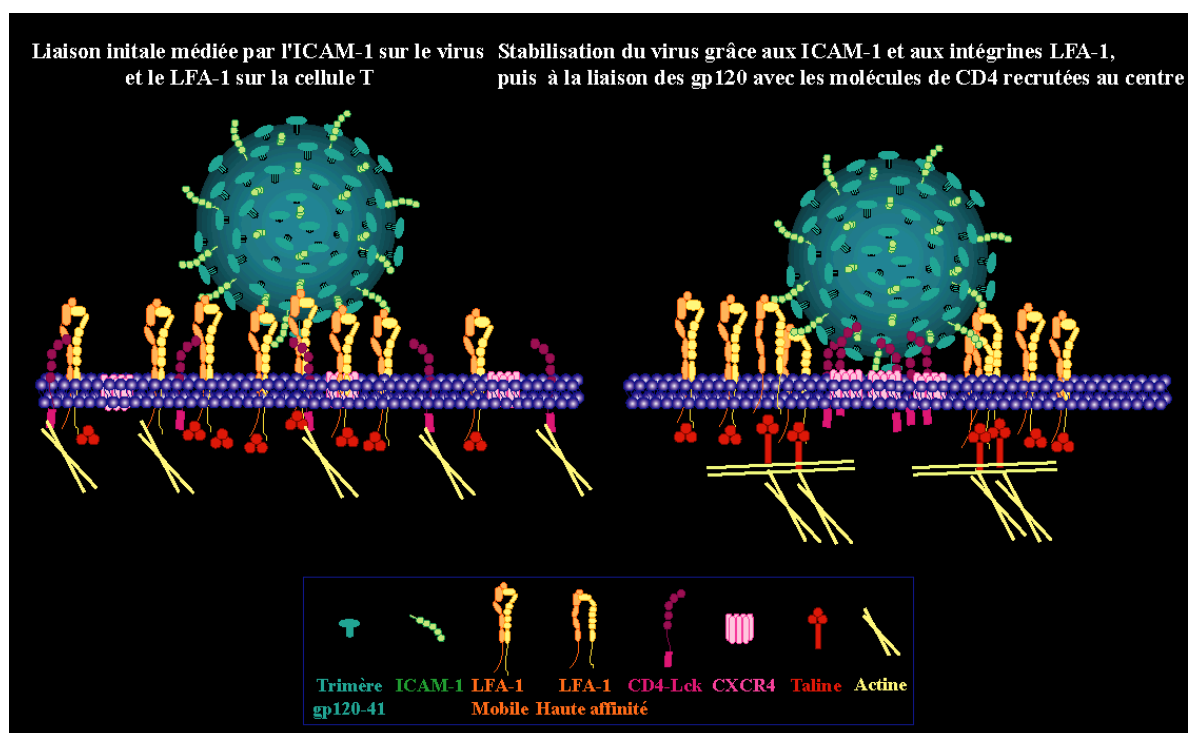


Figure 25. Synapse virologique entre un virus_{ICAM-1+} et un lymphocyte T CD4⁺ activé

Il s'agit d'un modèle élaboré à partir des données présentées dans le chapitre 5 (article 2) et des récentes informations sur l'activation de LFA-1 obtenues à la fin de l'année 2004 par

l'équipe du Dr T.A. Springer [631]. Brièvement, cette étude confirme que l'avidité de LFA-1 est un phénomène qui survient en aval de la liaison avec l'ICAM-1. L'étude menée par M. Kim et collaborateurs démontrent que la liaison des monomères et des multimères solubles de ICAM-1 aux intégrines LFA-1 déclenche une signalisation *outside-in* provoquant le regroupement de LFA-1 en petits amas. Selon eux, les amas d'intégrines trouvés sur les cellules T activées (visualisés par microscopie confocale) originent d'une adhésion intercellulaire antérieure médiée par l'ICAM-1 et non pas d'une signalisation *inside-out*. Ces nouvelles données ne modifient pas l'interprétation des résultats des articles présentés. En fait, elles renforcent l'hypothèse que la liaison des virus aux intégrines LFA-1 amorce une signalisation *outside-in* qui participe à la formation de la synapse virologique et la fusion.

Outre un attachement ferme, la formation d'une synapse requiert un réarrangement des protéines membranaires au point de contact. Cette étape nécessite un cytosquelette d'actine dynamique et fonctionnel. Les résultats expérimentaux prouvent que la polymérisation et la dépolymérisation des polymères d'actines participent aux étapes initiales du cycle viral des virus_{ICAM-1+}. En plus de démanteler les amas de LFA-1 préformés, la jasplakinolide (inhibiteur de la dépolymérisation et promoteur de la polymérisation) et la cytochalasine (inhibiteur de la polymérisation et promoteur de la dépolymérisation) inhibe l'entrée du VIH_{ICAM-1+}. Puisque ces composés ne modulent pas le changement de conformation de l'intégrine (état de haute affinité) (résultats non publiés), leurs effets se situent en amont et/ou en aval de la liaison. On sait que la jasplakinolide stabilise les intégrines associées au cytosquelette et empêche la diffusion latérale de ces dernières dans la membrane plasmique [640]. Ce phénomène inhibe la formation d'amas de LFA-1 suite à la liaison du ligand. Dans ces conditions, la formation de la synapse virologique est impossible. Le même résultat s'obtient avec la cytochalasine B ou D. Ces deux composés entraînent la dépolymérisation de l'actine et induisent la diffusion latérale des intégrines dans la membrane [631, 633, 638]. Par contre, ils empêchent la consolidation de l'adhésion, phénomène qui requiert la réunification des intégrines avec le cytosquelette d'actine

(polymérisation de l'actine). Au-delà de l'effet sur le LFA-1, l'altération de la dynamique du cytosquelette affecte la distribution des molécules de CD4 dans la membrane. D'ailleurs, la co-localisation des molécules de LFA-1 et du CD4 est absente lorsque les cellules sont traitées avec la jasplakinolide et la cytochalasine D (résultats non publiés). Ces données suggèrent qu'en plus de réduire l'adhésion médiée par le LFA-1 et la formation de la synapse, la jasplakinolide et la cytochalasine empêchent le recrutement des molécules de CD4 (et possiblement des CXCR4) au point de contact avec le virus.

La création de la synapse virologique requiert également l'activité de la calpaïne lorsque les virus s'attachent aux molécules de LFA-1 immobilisées par l'actine. La calpaïne est une protéase qui clive la taline et libère le LFA-1 du cytosquelette, processus essentiel à sa diffusion latérale dans la membrane [633, 640, 743]. Elle est activée par des signaux *outside-in* générés vraisemblablement par la liaison des virus aux molécules de LFA-1. L'engagement de LFA-1 entraîne généralement une variété de réponses, dont la réorganisation du cytosquelette d'actine, la phosphorylation de la PLC γ , l'hydrolyse des phospholipides, l'activation de certaines isoformes de PKC et de la voie PI3K/AKT, la mobilisation du calcium intracellulaire, la phosphorylation de la protéine Vav (la GEF de la GTPase Rho) et PYK2, puis l'activation de la GTPase Rac [693-699]. Les résultats démontrent que la PLC γ est l'une des principales protéines de signalisation nécessaires à la formation de la synapse virologique. Outre le démantèlement des amas de LFA-1 préformés sur les lymphocytes T CD4⁺ activés, l'inhibition de la PLC γ (par le U73122) réduit fortement l'entrée des virus_{ICAM-1+}. Considérant le rôle de cette protéine dans la régulation du cytosquelette d'actine et la signalisation, ces résultats ne surprennent guère. La PLC γ hydrolyse le PIP2, une composante indispensable à la polymérisation de l'actine. En plus de diminuer la quantité locale de PIP2 dans la membrane (revue par [652]), l'activation de la PLC γ stimule la cofiline [744] et la dépolymérisation du cytosquelette d'actine. La réduction du PIP2 entraîne également un relâchement de la rigidité membranaire, phénomène qui dépend des liens unissant l'actine corticale (squelette membranaire) et les protéines ancrées à la membrane plasmique. En traitant les cellules

avec le U73122, l'inhibiteur de la PLC γ , le PIP2 demeure présent et le cytosquelette d'actine se stabilise. Par conséquent, les intégrines demeurent figées dans la membrane et sont incapables de s'attacher aux molécules d'ICAM-1. Puisque la PLC γ génère deux messagers secondaires essentiels à la transduction de signaux (le DAG [composé qui active les PKC] et l'IP3 [molécule qui induit le relargage du calcium intracellulaire]), son inhibition paralyse également la signalisation nécessaire à l'activation de LFA-1. En plus de stimuler la calpaïne et certaines PKC (lesquelles phosphorylent LFA-1), le DAG et le calcium activent la GTPase Rap-1 [686], une protéine indispensable à la génération des états d'affinité intermédiaire et élevée de LFA-1 [601, 602, 676]. L'équipe du Dr Kinashi, a confirmé que la CalDAG-GEF, la protéine GEF (de l'anglais *Guanine nucleotide Exchange Factor*) de Rap-1, est en effet activée par les deux messagers secondaires produits par la PLC γ . L'inhibition de celle-ci empêche l'activation de Rap-1/RapL, prévient le changement de conformation de l'affinité intermédiaire et celle de haute affinité, puis inhibe l'adhésion médiée par LFA-1 [686]. Conformément aux résultats du Dr Kinashi, le traitement des lymphocytes avec le U73122 prévient effectivement la formation de l'état de haute affinité induite par le Mn²⁺ dans les lymphocytes T CD4⁺ activés (résultats expérimentaux non publiés).

L'activation de la PLC γ est orchestré par l'action de nombreuses protéines de signalisation, incluant les protéines kinases Syk et ZAP70, les protéines Src (Lck et Fyn), la PLA_{2c} (phospholipase A2 cytosolique), la PLD (phospholipase D) et la PI3K (de l'anglais *Phosphatidylinositol-3-kinase*) (résumé par [745]). L'inhibition des Src (par le PP2) et de la PI3K (par la Wortmannin) n'affecte pas l'entrée des VIH_{ICAM-1+}, contrairement aux protéines kinases Syk et/ou ZAP70. Bien que n'ayant aucune conséquence sur la distribution de LFA-1 sur les lymphocytes T CD4⁺ activés, ni sur le changement d'affinité (résultats non publiés), le traitement des cellules avec le piceatannol (inhibiteur spécifique de Syk et ZAP70) réduit de façon significative l'entrée des VIH_{ICAM-1+}. Outre l'activation de la PLC γ , le Syk et/ou le ZAP70 stimulent également les protéines Vav (GEF de la GTPase RhoA), PYK2 et paxilline, trois protéines liées de près ou de loin au remaniement du

cytosquelette d'actine [746-749]. Ces données expliquent pourquoi cette famille de protéines kinases joue un rôle indispensable dans la stabilisation de l'adhésion [747, 750, 751].

Selon les notions disponibles sur la signalisation *outside-in* et les résultats présentés, tout porte à croire que la liaison du VIH_{ICAM-1+} aux molécules de LFA-1 contribue à rapprocher les molécules de CD4 et de CXCR4 et orienter le lieu de la fusion. Le réarrangement des deux molécules dans la membrane est encore aujourd'hui un sujet controversé. Certains travaux démontrent que la fusion requiert la présence de CD4 et CXCR4 à l'intérieur des radeaux lipidiques [752-754], alors que d'autres affirment le contraire [230-232]. Par contre, tous s'entendent sur la nécessité du cholestérol dans la réorganisation des protéines membranaires et l'amalgame des membranes virale et cellulaire. Or, il semble que ce soit plutôt le PIP2 le grand responsable. En effet, une étude démontre clairement que la déplétion du cholestérol dans les membranes (par le méthyl- β -cyclodextrine) diminue la quantité de PIP2 dans la membrane ainsi que la rigidité membranaire [755]. Ces nouvelles données confirment que le méthyl- β -cyclodextrine affecte à la fois les fonctions dépendantes et indépendantes des radeaux lipidiques. Puisque rien ne permet de discriminer entre la participation du cholestérol, des radeaux lipidiques et du PIP2 dans le processus de fusion, la validité des résultats publiés par différentes équipes est remise en doute. Considérant son rôle majeur dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et la signalisation, le PIP2 semble donc le facteur déterminant dans le processus de fusion.

Les résultats présentés dans cette étude concordent avec ceux obtenus par l'équipe du Dr Sattentau [263]. Alors que nos travaux se sont axés sur l'infection directe de cellules T avec du virus libre, leur étude s'est concentrée sur le transfert du virus d'une cellule T infectée vers une autre cellule non infectée. Ils ont démontré que le contact cellule-cellule entraîne le recrutement à l'interface cellulaire du CD4, du CXCR4, de la taline et de LFA-1 sur la cellule non infectée, et de la gp120/gp41 et du Pr55Gag chez la cellule infectée. Il s'agit

d'un processus lié au remaniement du cytosquelette d'actine et à l'engagement de la gp120 avec le CD4 et le CXCR4. Puisque l'adhésion intercellulaire et la signalisation nécessaire à la réorganisation des molécules dans la membrane provient initialement de l'interaction entre les molécules d'ICAM-1 et de LFA-1, il est permis de postuler que le réarrangement des protéines dans la membrane plasmique de la cellule non infectée est orchestré par la coopération entre ces deux molécules, les glycoprotéines virales de même que les récepteurs et les co-récepteurs. Néanmoins, cette étude confirme notre hypothèse voulant que la présence d'ICAM-1 sur le virus transforme ce dernier comme une cellule infectée. Ainsi, la liaison du VIH-1 mime l'adhésion intercellulaire (mais à une plus petite échelle) et induit le réarrangement des molécules à la membrane, processus favorisant l'entrée du virus par fusion.

7.3 Le LFA-1 : un collaborateur de la fusion virale

Tout comme les virus dépourvus des molécules d'ICAM-1, les virus_{ICAM-1+} ont besoin des molécules de CD4 et de CXCR4 pour fusionner. Une fois tous les éléments en place, la fusion des membranes se coordonne rapidement. Des études ont démontré dans le passé que la fusion se fait en moins de 30 minutes chez les cellules très permissives à l'infection, alors qu'elle prend plus de quatre heures chez les cellules peu réceptives [215]. Une autre étude a confirmé qu'une fois la liaison établie avec les CD4, la fusion se fait en moins de dix minutes [213]. Ces données concordent avec celles obtenues dans le cadre de mon projet de doctorat. La sensibilité des lymphocytes T CD4⁺ à l'infection des virus dépourvus en molécules d'ICAM-1 est moindre. En effet, la fusion prend plus de quatre heures à s'organiser (article 1), alors que celle des virus_{ICAM-1+} s'effectue à l'intérieur de 90 minutes. Des études effectuées dans notre laboratoire ont démontré que la rapidité avec laquelle les virus_{ICAM-1+} fusionnent avec les lymphocytes T CD4⁺ protège ceux-ci des effets néfastes du T-20, l'inhibiteur de fusion approuvé en 2003 par la FDA (Food and Drug Administration)

[376]. La vitesse, la consolidation de l'interaction et la signalisation *outside-in* contribuent à rendre la fusion des virus_{ICAM-1+} plus efficace.

On soupçonne la signalisation *outside-in* de participer au renforcement du processus de fusion par sa capacité à remanier l'actine corticale. Cette hypothèse se fonde sur la capacité des virus_{ICAM-1+}, grâce aux molécules de LFA-1, d'activer la PLC γ , entraînant la diminution locale du PIP2 puis la relaxation du squelette membranaire (l'actine corticale). Certains travaux suggèrent que l'actine corticale est une barrière à la fusion de deux membranes. L'amalgame des membranes virale et cellulaire nécessite d'abord la dépolymérisation du squelette membranaire suivie de sa repolymérisation [756, 757]. Des études ont d'ailleurs récemment suggéré que l'apport de la protéine Nef au processus d'entrée virale s'explique par sa capacité à activer la GTPase Rho (par l'intermédiaire de la GEF Vav) favorisant la dépolymérisation de l'actine au site de fusion [758-760]. On ignore encore tous les éléments intervenant lors de la fusion, mais leur identification permettrait d'en apprendre davantage sur les facteurs cellulaires participant à l'accès des particules virales dans le cytoplasme des lymphocytes T CD4⁺. D'autres études sont toutefois nécessaires afin de prouver que la liaison du virus_{ICAM-1+} provoque effectivement la dépolymérisation locale du cytosquelette d'actine à la synapse et facilite l'alliage des bicouches lipidiques.

Le site précis où s'effectue la fusion influence forcément les étapes subséquentes du cycle viral, en particulier la transcription inverse et le transport du complexe de préintégration (PIC) vers le noyau. On sait que tous les éléments du complexe de rétrotranscription s'associent très rapidement avec le cytosquelette d'actine grâce à la protéine de la matrice [267]. L'efficacité de la transcription inverse dépend d'ailleurs d'un cytosquelette intact [267]. Ces données suggèrent que la fusion doit avoir lieu dans un endroit où le remaniement des polymères d'actine est dynamique, une situation qui correspond aux régions riches en molécules de LFA-1.

Outre l'entrée virale plus rapide et plus efficace, les résultats démontrent que l'attachement des virus par les intégrines réduit l'éventualité qu'ils soient internalisés et dégradés par le lymphocyte T. La probabilité que les virus_{ICAM-1+} se lient aux molécules de CD4 non couplées à la protéine p56^{Lck} est vraisemblablement réduite comparativement à celle des virus sans ICAM-1. Cet avantage a des répercussions sur l'ensemble de l'infection, puisque l'endocytose prévient tous les événements du cycle viral en aval de l'entrée. Ainsi, seule la fusion du virus avec la membrane plasmique permet une infection productive des lymphocytes T CD4⁺. C'est pourquoi l'incorporation des molécules d'ICAM-1 dans l'enveloppe du VIH-1 augmente l'infectivité virale comparativement aux virus qui en sont dépourvus.

7.4 Le LFA-1 : un signal dirigeant l'infection vers des cellules permissives à la réplication virale

Jusqu'à présent seule l'expression des molécules de CD4 et des co-récepteurs est reconnue comme étant déterminante pour l'infection et la multiplication du VIH-1. Bien sûr, ces deux protéines cellulaires permettent au virus de pénétrer à l'intérieur de plusieurs cellules, immunitaires ou non, mais n'aident pas le virus à discriminer entre des cellules hautement permissives et d'autres peu réceptives à la réplication. Puisque le but premier d'un virus non oncogénique consiste à se multiplier, l'infection de cellules peu susceptibles à sa réplication constitue une perte de temps et d'énergie. Le VIH-1 a une préférence pour les lymphocytes T CD4⁺ activés [761], des cellules qui contiennent des facteurs de transcription collaborant à la réplication du VIH-1. Cependant, les éléments qui conduisent le virus vers ces cellules demeurent peu connus. D'autre part, la majorité des lymphocytes T CD4⁺ circulant dans le sang se subdivisent en deux sous-populations : les cellules naïves et les cellules mémoire centrale, lesquelles sont des cellules au repos. Puisqu'elles ne permettent pas sa réplication de façon massive, le virus a généralement peu d'intérêt pour les cellules quiescentes. On sait par contre que le VIH-1 infecte les lymphocytes T CD4⁺

mémoire centrale, des cellules métaboliquement plus actives (demeurent en stade G_1 plutôt qu'en G_0) [139], et qu'il a peu d'attrait pour les cellules T $CD4^+$ naïves [130, 136, 138, 762]. Pourtant, les deux sous-populations expriment des quantités similaires de $CD4$ et de $CXCR4$ [135]. L'ensemble de ces données suggère que d'autres éléments interviennent forcément pour expliquer la susceptibilité différentielle de certaines cellules à l'infection par le VIH-1.

Les travaux présentés dans cette thèse confirment qu'en combinaison avec l'ICAM-1 sur l'enveloppe virale, les intégrines LFA-1 représentent des cofacteurs cellulaires importants dans le processus infectieux. Les avantages procurés par l'incorporation de la molécule d'adhérence dépendent de l'état d'activation de LFA-1 sur les cellules cibles. En conséquence, toutes les cellules exprimant LFA-1 dans un état d'affinité intermédiaire devraient fixer davantage de virus, un processus facilitant l'infection virale (en présence de récepteurs et de co-récepteurs). Effectivement, les virus_{ICAM-1+} ont une préférence pour les lymphocytes T $CD4^+$ mémoire centrale et effecteurs. Ces deux types cellulaires contiennent davantage de facteurs cellulaires favorisant la transcription inverse, l'intégration et la réplication du VIH-1. Par contre, il en est tout autrement pour d'autres types de cellules. En effet, les cellules dendritiques gardent la même susceptibilité à l'infection indépendamment de la présence de l'ICAM-1 dans l'enveloppe virale [763] (résultats dans le laboratoire, mais non publiés). Il s'agit d'une conséquence directe de l'état de LFA-1 sur ces cellules, lequel est dans une conformation « fermée » [764]. Le même phénomène s'observe avec les lymphocytes T $CD4^+$ naïfs et les macrophages non stimulés (résultats non publiés). Ces trois types cellulaires sont moins réceptifs à la réplication du VIH-1 que les lymphocytes T $CD4^+$ mémoire centrale et les cellules effectrices. Le virus peut les utiliser pour se cacher du système immunitaire, mais pas pour se multiplier activement. D'autre part, plusieurs de ces cellules sont activées lors de l'inflammation, processus entraînant l'activation des intégrines. Donc, en plus de recruter des lymphocytes T $CD4^+$, l'inflammation, par exemple dans les muqueuses vaginales (présentes lors d'infections bactériennes ou à certains stades du cycle menstruel) ou les organes lymphoïdes secondaires, devrait permettre au VIH-1

d'infecter plus efficacement différents types de cellules immunitaires se trouvant dans ces régions.

En conclusion, outre l'utilisation des co-récepteurs, l'état d'activation de LFA-1 sur les cellules cibles modifie le processus d'infection viral. L'expression d'intégrines activées représente un signal de reconnaissance qui oriente l'infection de manière à ce qu'elle soit productive et non abortive. On ignore si d'autres virus enveloppés ayant comme cible les cellules du système immunitaire utilisent ce signal, mais il serait intéressant d'investiguer davantage ce phénomène.

7.5 Perspectives

Les expériences menées durant ces trois dernières années ont apporté de nouvelles connaissances quant aux facteurs cellulaires qui collaborent à l'attachement et à l'entrée de virus dans les lymphocytes T CD4⁺. De nombreuses questions restent néanmoins sans réponse. D'autres travaux pourraient être réalisés ultérieurement afin d'élargir notre compréhension du phénomène décrit et d'y apporter un aspect plus physiologique. Quatre avenues pourraient être décortiquées davantage :

- 1- Investiguer la signalisation *outside-in* générée par la liaison des virus_{ICAM-1+} aux lymphocytes T CD4⁺.
- 2- Analyser la capacité du virus_{ICAM-1+} à infecter de préférences les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs dans une population mixte de cellules et dans un modèle d'amygdale.
- 3- Étudier la capacité du virus_{ICAM-1+} à s'attacher à d'autres cellules du système immunitaire (notamment les cellules NK, NKT, CTL) et évaluer l'impact de cet

attachement sur les fonctions effectrices de ces dernières de même que leur infection et leur capacité à transférer du virus aux lymphocytes T CD4⁺.

- 4- Tester l'effet des inhibiteurs de LFA-1, en combinaison ou non d'autres anti-rétroviraux (T-20, Efavirenz, S-1360, Indinavir), sur l'infection virale et sur l'inflammation causé par celle-ci dans un modèle d'amygdale.

7.5.1 Signalisation *outside-in*

Les résultats présentés sur le remaniement du cytosquelette d'actine et la signalisation *outside-in* et *inside-out* proviennent d'expériences faites à partir de cellules primaires traitées ou non avec différents inhibiteurs spécifiques. Afin de confirmer que la liaison du virus engendre effectivement une signalisation favorable à la formation du pore de fusion, une série d'expériences pourrait être accomplie. D'abord, la capacité de chacun des virus (ICAM-1 négatif et positif) à induire la polymérisation et/ou la dépolymérisation du cytosquelette d'actine pourrait se visualiser par cytofluorométrie de flux. Dans cette même optique, le turnover du PIP2 dans la membrane, un élément essentiel au remaniement du cytosquelette, pourrait être analysé par immunobuvardage. L'activation des protéines de signalisation pourrait s'évaluer à l'aide de profils de phosphorylation (par immunobuvardage ou coloration au ProQ) et des essais enzymatiques (kinases, GTPase). Toutes ces expériences permettraient de décortiquer la signalisation induite par la liaison du virus. Elles contribueraient également à étudier minutieusement l'adhésion et la génération du pore de fusion médiée par LFA-1 dans les cellules naïves, mémoire centrale et effectrices, des notions encore méconnues.

La capacité des virus_{ICAM-1+} à induire l'état de haute affinité, le regroupement des intégrines, puis le réarrangement du CD4 et du CXCR4 au point de contact serait également une avenue intéressante à explorer. Ces analyses sont possibles en utilisant des essais de FRET

(de l'anglais *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), comme ceux développés par l'équipe du Dr T.A. Springer [627, 631]. Cette technique permettrait de visualiser pour la première fois en temps réel le mouvement des intégrines, des récepteurs et des co-récepteurs dans la membrane des lymphocytes T suite à l'attachement du VIH-1 (figure 27).

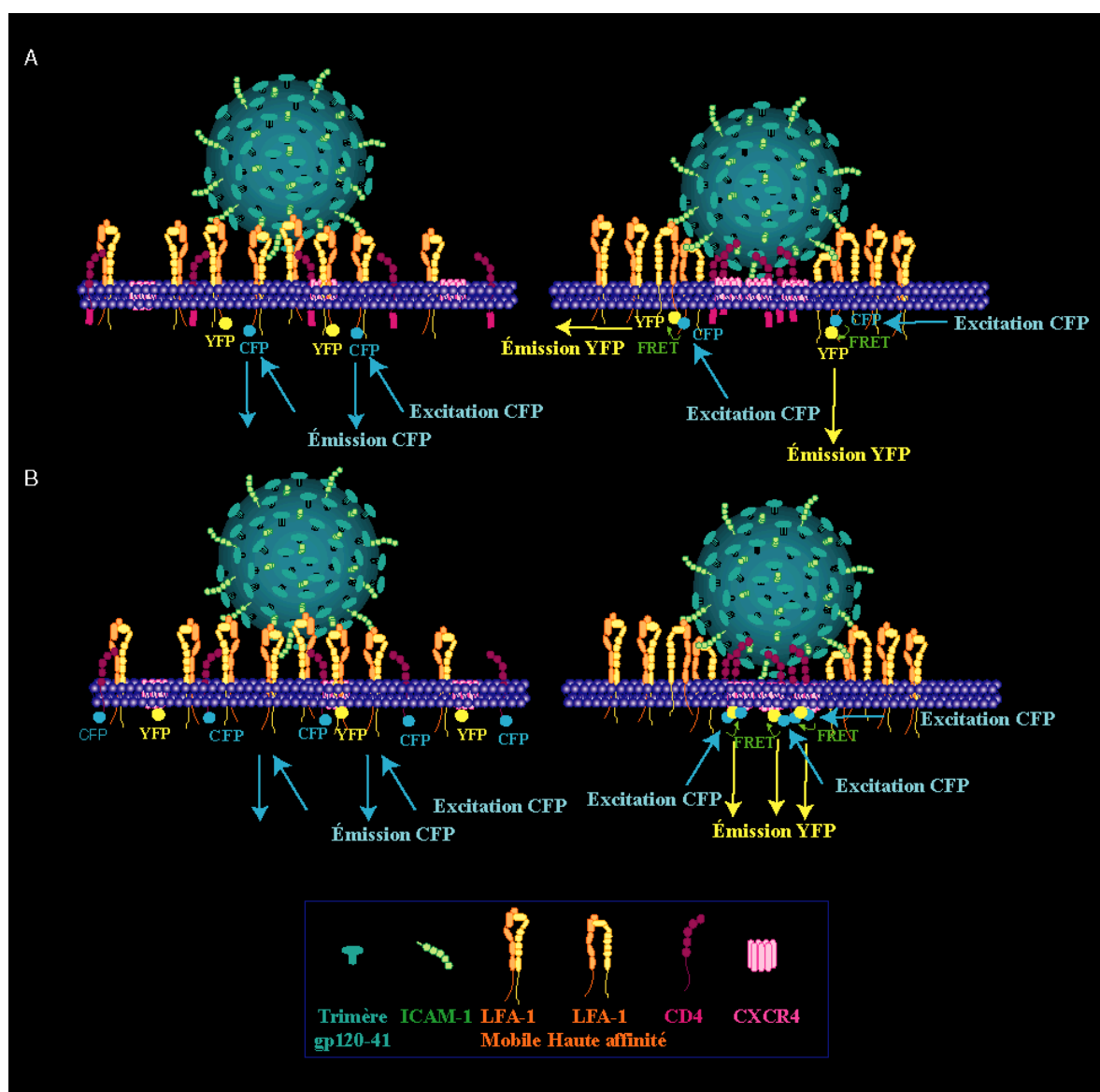


Figure 26 Essais de FRET. A) Analyser la capacité du virus à regrouper les molécules de LFA-1 couplées au YFP ou au CFP et à induire le FRET. B) Évaluer la capacité du virus à regrouper les molécules de CD4 (couplées au CFP) et CXCR4 (couplées au YFP) lors de sa liaison aux intégrines et à provoquer le FRET.

7.5.2 Effet de LFA-1 sur le tropisme

Une autre voie captivante à investiguer est celle du tropisme médié par l'activation de LFA-1. Outre l'infection préférentielle des lymphocytes T CD4⁺ activés, le VIH-1 infecte et détruit spécifiquement les lymphocytes Tmc et les Tme dirigés contre lui. Le principal lieu d'infection chez les individus infectés se situe dans les organes lymphoïdes secondaires. Or, ce sont des tissus contenant une population cellulaire hétérogène où les interactions sont multiples. Dans le but d'étudier le « tropisme » médié par l'activation de LFA-1, l'utilisation d'un modèle d'amygdale constituerait une excellente approche. Les morceaux d'amygdale contiennent notamment des cellules T CD4⁺ naïves, mémoire centrale (Tmc) et mémoire effectrice (Tme), des lymphocytes B, des lymphocytes T CD8⁺, ainsi que des macrophages et des cellules dendritiques folliculaires. Il s'agit d'un système immunitaire en format miniature. La stratégie utilisée nécessiterait deux types de virus. Outre la présence ou non d'ICAM-1, les virus devraient se distinguer par des fluorochromes différents s'exprimant lors de la réplication virale (p.ex. NL4-3iresCFP et NL4-3iresYFP). À l'aide d'un cytofluoromètre, on pourrait alors identifier les principales cellules cibles du virus exposant l'ICAM-1 dans leur enveloppe lors des premiers cycles d'infection. Cet outil serait également intéressant pour étudier l'apport de différentes molécules de l'hôte dans le tropisme du virus, et ce dans différents modèles (amygdale, muqueuse buccale, muqueuse génitale). Combinant la cytofluométrie et la microscopie confocale, cette technique indiquerait relativement facilement les principales cellules infectées par un ou plusieurs types de virus.

7.5.3 Attachement, infection et activation des cellules NK, NKT et CTL

Le LFA-1 participe à plusieurs fonctions immunitaires coordonnées par d'autres cellules du système immunitaire différentes des lymphocytes T CD4⁺. Notamment, l'intégrine collabore aux fonctions effectrices des cellules NK, NKT et CTL. Comme la principale

fonction de ces cellules est de détruire les cellules « anormales » par la libération de perforines et de granzymes, les éléments qui participent à la reconnaissance cellulaire (dont le LFA-1) sont étroitement régulés. On sait que les cellules NK et NKT sont sujettes à l'infection par le VIH-1. Puisqu'elles expriment le LFA-1 et modulent son activation, il serait intéressant d'évaluer si la présence d'ICAM-1 sur le virus est favorable à l'attachement, l'entrée et l'infection de ces cellules comme c'est le cas pour les T CD4⁺. D'autre part, ces dernières sont beaucoup plus sensibles à la signalisation *outside-in* que les lymphocytes T CD4⁺. L'activation de LFA-1 par la liaison d'ICAM-1 augmente l'activité cytolytique des cellules NK [765, 766]. En effet, ces signaux suffisent à polariser les granules contenant les enzymes destructives vers la synapse. En absence de reconnaissance du CMH-I, la cellule NK largue ses granules vers la cellule cible [767]. La capacité des virus à induire le largage des perforines et des granzymes dans le milieu par les cellules NK et NKT serait une voie intéressante à investiguer. Le même genre d'étude pourrait ce faire avec les CTL.

7.5.4 Cibler LFA-1 : une avenue intéressante dans la lutte anti-VIH

En plus de son rôle direct dans l'infection des lymphocytes T CD4⁺, l'intégrine LFA-1 contribue autrement à la biologie du VIH-1, notamment en favorisant le transfert intercellulaire du virus et la formation de syncytium [6, 263, 448, 768-770]. La synapse entre deux cellules est une étape indispensable au transfert viral (p.ex. d'une cellule dendritique à une cellule T). L'adhésion intercellulaire se réalise en grande partie par l'intermédiaire des molécules ICAM-1 et LFA-1. En absence de cette interaction, ni la synapse ni le transfert du virus n'a lieu. De la même façon, la formation de syncytium, c'est-à-dire de cellules géantes formées par la fusion de deux ou plusieurs cellules infectées et non infectées, dépend de l'association entre les molécules ICAM-1 et LFA-1 des différentes cellules.

Le rôle joué par le LFA-1 dans l'inflammation des organes lymphoïdes secondaires et l'hyperactivation du système immunitaire est un autre aspect impliquant LFA-1 dans la pathogenèse du VIH-1. Autant l'adhésion hétérotypique médiée par LFA-1 est bénéfique pour le système immunitaire (p.ex. lors de l'extravasation et la synapse immunologique), autant elle peut être dommageable pour l'organisme. C'est le cas lorsque des cellules du système immunitaire détruisent d'autres cellules pourtant saines. Chez les personnes séropositives, ce phénomène débute lorsque les cellules infectées sécrètent des protéines virales immunomodulatrices comme le tat et la gp120 [771-773]. Ces molécules activent ensuite les lymphocytes T CD4⁺ et les CTL, lesquels provoquent la destruction des cellules non infectées par un mécanisme de mort programmée (apoptose) [774]. L'induction de l'apoptose repose initialement sur des interactions intercellulaires orchestrées par LFA-1 et ICAM-1 [602, 765, 775, 776]. De même, l'hyperactivation des lymphocytes B, une manifestation observée chez les individus infectés [777, 778], dépend aussi d'interactions intercellulaires avec les lymphocytes T CD4⁺. Donc, par son rôle indispensable dans l'adhésion hétérotypique, LFA-1 participe pratiquement à toutes les manifestations liées à l'inflammation et aux maladies auto-immunes présentes chez les individus séropositifs.

Face à la participation multiple de LFA-1 à la pathogenèse, une thérapie altérant son interaction avec l'ICAM-1, en combinaison avec les thérapies anti-rétrovirales usuelles, pourrait s'avérer bénéfique dans la lutte contre le VIH-1. Outre la réduction de l'inflammation dans les organes lymphoïdes secondaires, elle préviendrait le transfert intercellulaire du virus de même que l'infection des lymphocytes T CD4⁺ mémoire centrale et des cellules T CD4⁺ effectrices.

Par exemple, de récents travaux démontrent l'action inhibitrice de certaines statines (lovastatine, simvastatine) sur l'activation du LFA-1 [722]. D'ailleurs, des études dans notre laboratoire ont permis de démontrer le rôle inhibiteur de la lovastatine sur l'infection des lymphocytes par les virus_{ICAM-1+} [779]. L'équipe du Dr Manes, en Espagne, a également

démontré que la lovastatine réduit la charge virale et augmentent le nombre de lymphocytes T CD4⁺ en circulation chez les individus infectés de façon chronique [780]. En poursuivant leurs recherches, ils ont observé que la lovastatine diminue l'entrée virale en inhibant la GTPase Rho, une protéine qui est activée lors de l'engagement de LFA-1 et qui participe au remaniement du cytosquelette d'actine. Il s'agit de résultats extrêmement intéressants puisqu'ils proviennent de patients infectés dont les virus contiennent tous la molécule ICAM-1 dans leur enveloppe.

Les statines sont des molécules prescrites de façon courante aux sidatiques pour contrer l'hyperlipidémie causée par le HAART (à des doses inférieures à celles employées pour inhiber LFA-1). Or, de nouvelles études indiquent la présence d'effets indésirables graves occasionnés par la prise prolongée de ces composés (p.ex. myopathie et rhabdomyolome)[781]. De plus, les mêmes enzymes intestinales et hépatiques servant à l'adsorption et à la dégradation de ces molécules servent aussi au métabolisme des IP. Par conséquent, les statines et les IP risquent d'interagir des façons suivantes : réduction de l'efficacité du traitement anti-VIH, intensification des effets secondaires préexistants et induction de nouveaux effets indésirables [782]. Vraisemblablement, l'administration de ces composés de façon systémique ne constitue pas la meilleure solution pour lutter contre le VIH-1. Par contre, leur addition aux antiviraux représente une alternative intéressante visant à prévenir la transmission et les infections primaires.

Il existe d'autres molécules qui empêchent l'activation de LFA-1 et qui semblent moins dommageables pour l'organisme que les statines. Le BIRT 377 est une petite molécule qui fige la conformation « fermée » de l'intégrine en se liant au domaine I du CD11a. Ce composé inhibe l'adhésion des cellules médiée LFA-1, tout comme la molécule LFA703 qui agit sensiblement de la même façon [718, 719, 722]. Le XVA143 est une autre molécule qui se fixe sur la région MIDAS du CD18 et empêche la formation de la conformation de haute affinité de même que l'oligomérisation de LFA-1 [720, 783]. Ces

trois molécules inhibent l'inflammation puis l'activation du système immunitaire, deux phénomènes problématiques chez les sidatiques et causés indirectement par LFA-1.

Par ailleurs, bien qu'il soit incapable de défendre l'organisme contre les pathogènes, le système immunitaire des sidatiques s'active continuellement. L'inflammation détruit progressivement les cellules immunitaires et les organes lymphoïdes secondaires de ces individus, ce qui contribue à l'immunosuppression. En ciblant le virus, le HAART réduit ces effets, mais il ne les abolie pas complètement. L'utilisation du BIRT 377 ou du XVA143, en combinaison avec le T-20 et deux autres antirétroviraux pourrait constituer un cocktail efficace contre l'infection et l'hyperactivation du système immunitaire. L'inhibiteur de LFA-1 empêcherait l'attachement aux lymphocytes T CD4⁺, le transfert intercellulaire du virus et l'inflammation dans les ganglions, alors que le T-20 inhiberait la fusion des virus qui ont réussi à contrecarrer l'inhibiteur de LFA-1. Les deux autres antirétroviraux agiraient quant à eux sur la rétrotranscription des virus ayant passé les deux premiers obstacles et sur l'intégration ou la maturation des virus issus des cellules déjà infectées (selon les antirétroviraux utilisés). Ainsi, la majorité des étapes déterminantes du cycle répliatif serait ciblée contribuant ainsi à diminuer la charge virale et augmenter le nombre de lymphocytes T CD4⁺ en circulation.

Les études préliminaires doivent d'abord s'effectuer à partir du modèle ex vivo d'amygdale, une technique très bien maîtrisée dans notre équipe. Selon les résultats obtenus, les expériences pourraient éventuellement se transposer chez les individus infectés.

Chapitre VIII. Conclusion générale

Bien que vingt années se soient écoulées depuis la découverte du VIH-1, aucun traitement ne permet de prévenir ou d'éliminer l'infection. Pourtant, les compagnies pharmaceutiques et les laboratoires de recherches mènent une lutte acharnée contre ce rétrovirus. Malgré la conception de nouveaux inhibiteurs par l'industrie pharmaceutique (T-20, S-1360), le virus parvient toujours à contourner les barrières dressées devant lui [496-498, 506]. En sachant que les traitements visant à interférer avec les fonctions des protéines virales entraînent inévitablement l'émergence de souches résistantes, il apparaît impératif de mettre au point de nouvelles approches et d'investiguer de nouvelles cibles moins sensibles aux mutations rétrovirales.

Les prochains défis en recherche fondamentale et en recherche pharmaceutique consistent à comprendre davantage la biologie du virus, sa transmission, sa pathogenèse et les facteurs de l'hôte influençant la progression et/ou le contrôle de l'infection. Ces avancées devraient permettre le design de nouvelles classes d'inhibiteurs, la création de microbicides (prévenant la transmission sexuelle) et l'identification de peptides immunogènes capables d'enclencher la synthèse d'anticorps neutralisants, une réponse espérée lors du développement d'un vaccin.

Les travaux exécutés pour l'obtention de cette thèse illustrent la complexité des événements précoces du cycle viral et la relation existante entre le virus et la cellule cible. Ces travaux portent sur deux co-facteurs cellulaires intervenant dans l'attachement, la consolidation de l'adhésion et la formation du pore de fusion. Insensibles à la variabilité génomique du VIH-1, ces deux partenaires représentent une cible intéressante dans la lutte anti-VIH. N'ayant pas le pouvoir d'éradiquer le virus, l'inhibition de LFA-1 permettrait de réduire la charge virale (en inhibant la consolidation de l'adhésion et le transfert viral) et d'augmenter le nombre de lymphocytes T CD4⁺ en circulation (en diminuant l'infection, l'inflammation

dans les organes lymphoïdes secondaires et la destruction des cellules non infectées). L'utilisation d'inhibiteurs de LFA-1 dans les microbicides pourrait également être protecteur, surtout lorsque les muqueuses présentent des signes d'inflammation. Évidemment ce ne sont, à l'heure actuelle, que des hypothèses, mais il sera intéressant de les étudier dans un avenir rapproché.

Bibliographie

- 1. Bounou, S., J.E. Leclerc, and M.J. Tremblay, Presence of host ICAM-1 in laboratory and clinical strains of human immunodeficiency virus type 1 increases virus infectivity and CD4(+)-T-cell depletion in human lymphoid tissue, a major site of replication in vivo. *J Virol*, 2002. 76(3): p. 1004-14.**
- 2. Fortin, J.F., et al., Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol*, 1997. 71(5): p. 3588-96.**
- 3. Paquette, J.S., et al., 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*, 1998. 72(11): p. 9329-36.**
- 4. Martin, G. and M.J. Tremblay, HLA-DR, ICAM-1, CD40, CD40L, and CD86 are incorporated to a similar degree into clinical human immunodeficiency virus type 1 variants expanded in natural reservoirs such as peripheral blood mononuclear cells and human lymphoid tissue cultured ex vivo. *Clin Immunol*, 2004. 111(3): p. 275-85.**
- 5. Rizzuto, C.D. and J.G. Sodroski, Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization. *J Virol*, 1997. 71(6): p. 4847-51.**
- 6. Fortin, J.F., et al., Role of the leukocyte function antigen-1 conformational state in the process of human immunodeficiency virus type 1-mediated syncytium formation and virus infection. *Virology*, 1999. 257(1): p. 228-38.**
- 7. Fortin, J.F., et al., Interaction between virion-bound host intercellular adhesion molecule-1 and the high-affinity state of lymphocyte function-associated antigen-1 on target cells renders R5 and X4 isolates of human immunodeficiency virus type 1 more refractory to neutralization. *Virology*, 2000. 268(2): p. 493-503.**

8. **Programme commun des Nations Unies sur le VIH/SIDA, Rapport 2004 sur l'épidémie mondiale de SIDA. 2004, ONUSIDA. [en ligne] <http://www.unaids.org/en/default.asp>**
9. **Santé Canada, Rapport du Canada sur le VIH/SIDA 2003. 2003, Gouvernement du Canada. [en ligne] http://www.phac-aspc.gc.ca/aids-sida/vih_sida/rapport03/index.html**
10. **Régie Régionale de la Santé et des Services Sociaux du Québec, Portrait des infections transmissibles sexuellement et par le sang (ITSS), de l'hépatite C, de l'infection par le VIH et du SIDA au Québec. 2004, Gouvernement du Québec. [en ligne] <http://ftp.msss.gouv.qc.ca/publications/acrobat/f/documentation/2004/04-329-01.pdf>**
11. **Barre-Sinoussi, F., et al., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science, 1983. 220(4599): p. 868-71.**
12. **Arya, S.K., et al., Homology of genome of AIDS-associated virus with genomes of human T-cell leukemia viruses. Science, 1984. 225(4665): p. 927-30.**
13. **Zagury, D., et al., HTLV-III in cells cultured from semen of two patients with AIDS. Science, 1984. 226(4673): p. 449-51.**
14. **CDC, Pneumocystis Pneumoniae Los Angeles. MMWR Weekly, 1981. 30: p. 250-2.**
15. **Hymes, K.B., et al., Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases. Lancet, 1981. 2(8247): p. 598-600.**
16. **Masur, H., et al., An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. N Engl J Med, 1981. 305(24): p. 1431-8.**

17. CDC, A Cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii Pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange counties. *MMWR weekly*, 1982. 31(23): p. 305-307.
18. CDC, Opportunistic infections and Kaposi's Sarcoma among Haitians in the United States. *MMWR Weekly*, 1982. 31(26): p. 353-4,360-1.
19. CDC, Epidemiologic notes and Reports Pneumocystis carinii Pneumonia among persons with hemophilia A. *MMWR Weekly*, 1982. 31(27): p. 365-7.
20. CDC, Epidemiologic notes and reports immunodeficiency among female sexual partners of males with Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS)- New York'. *MMWR Weekly*, 1982. 31(52): p. 697-8.
21. Mann, J., ed. A worldwide pandemic. Current topics in AIDS. Vol. 2. 1989, Gottlieb M.S., jeffries D.J., Midvan D., Pinching A.J., Quinn T.C., John Wiley & sons.
22. Zhu, T., et al., An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*, 1998. 391(6667): p. 594-7.
23. Jonassen, T.O., et al., Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s. *Virology*, 1997. 231(1): p. 43-7.
24. Marx, P.A., C. Apetrei, and E. Drucker, AIDS as a zoonosis? Confusion over the origin of the virus and the origin of the epidemics. *J Med Primatol*, 2004. 33(5-6): p. 220-6.
25. Gao, F., et al., Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature*, 1999. 397(6718): p. 436-41.
26. Chen, Z., et al., 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*, 1997. 71(5): p. 3953-60.

27. Corbet, S., et al., env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J Virol*, 2000. 74(1): p. 529-34.
28. Bailes, E., et al., Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science*, 2003. 300(5626): p. 1713.
29. Fomsgaard, A., et al., Relation between phylogeny of African green monkey CD4 genes and their respective simian immunodeficiency virus genes. *J Med Primatol*, 1997. 26(3): p. 120-8.
30. Khabbaz, R.F., et al., Brief report: infection of a laboratory worker with simian immunodeficiency virus. *N Engl J Med*, 1994. 330(3): p. 172-7.
31. Khabbaz, R.F., et al., Simian immunodeficiency virus needlestick accident in a laboratory worker. *Lancet*, 1992. 340(8814): p. 271-3.
32. Smith, S.M., et al., SIVrcm infection of macaques. *J Med Primatol*, 1998. 27(2-3): p. 94-8.
33. Souquiere, S., et al., Wild Mandrillus sphinx are carriers of two types of lentivirus. *J Virol*, 2001. 75(15): p. 7086-96.
34. Marx, P.A., P.G. Alcabes, and E. Drucker, Serial human passage of simian immunodeficiency virus by unsterile injections and the emergence of epidemic human immunodeficiency virus in Africa. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2001. 356(1410): p. 911-20.
35. Chitnis, A., D. Rawls, and J. Moore, Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa? *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2000. 16(1): p. 5-8.
36. Drucker, E., P.G. Alcabes, and P.A. Marx, The injection century: massive unsterile injections and the emergence of human pathogens. *Lancet*, 2001. 358(9297): p. 1989-92.

37. Clavel, F., et al., Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 1986. 233(4761): p. 343-6.
38. Bodelle, P., et al., Identification and genomic sequence of an HIV type 1 group N isolate from Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2004. 20(8): p. 902-8.
39. Mauclore, P., et al., Serological and virological characterization of HIV-1 group O infection in Cameroon. *Aids*, 1997. 11(4): p. 445-53.
40. NIH, NIH AIDS Research & Reference Reagent Program : Worldwide source for HIV/AIDS Regents, NIH. [en ligne] <http://www.aidsreagent.org/techlib/default.cfm?Action=HIVGraphics> (Pages consultées le 20 novembre 2004)
41. Van Lint, C., et al., Transcription factor binding sites downstream of the human immunodeficiency virus type 1 transcription start site are important for virus infectivity. *J Virol*, 1997. 71(8): p. 6113-27.
42. Antoni, B.A., et al., NF-kappa B-dependent and -independent pathways of HIV activation in a chronically infected T cell line. *Virology*, 1994. 202(2): p. 684-94.
43. Wilk, T., et al., Organization of immature human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 2001. 75(2): p. 759-71.
44. Seelamgari, A., et al., Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication. *Front Biosci*, 2004. 9: p. 2388-413.
45. Anderson, J.L. and T.J. Hope, Recent Insights into HIV Accessory Proteins. *Curr Infect Dis Rep*, 2003. 5(5): p. 439-450.
46. Pereira, L.A., et al., A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res*, 2000. 28(3): p. 663-8.

47. Siekevitz, M., et al., Activation of the HIV-1 LTR by T cell mitogens and the trans-activator protein of HTLV-I. *Science*, 1987. 238(4833): p. 1575-8.
48. Harrison, G.P. and A.M. Lever, The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *J Virol*, 1992. 66(7): p. 4144-53.
49. Greene, W.C., The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*, 1991. 324(5): p. 308-17.
50. Levy, J.A., Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev*, 1993. 57(1): p. 183-289.
51. Paxton, W., R.I. Connor, and N.R. Landau, Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol*, 1993. 67(12): p. 7229-37.
52. Kleiman, L., R. Halwani, and H. Javanbakht, The selective packaging and annealing of primer tRNA^{Lys3} in HIV-1. *Curr HIV Res*, 2004. 2(2): p. 163-75.
53. Gamble, T.R., et al., Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science*, 1997. 278(5339): p. 849-53.
54. Gamble, T.R., et al., Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell*, 1996. 87(7): p. 1285-94.
55. Wieggers, K., et al., Cyclophilin A incorporation is not required for human immunodeficiency virus type 1 particle maturation and does not destabilize the mature capsid. *Virology*, 1999. 257(1): p. 261-74.
56. Grattinger, M., et al., In vitro assembly properties of wild-type and cyclophilin-binding defective human immunodeficiency virus capsid

- proteins in the presence and absence of cyclophilin A. *Virology*, 1999. 257(1): p. 247-60.
57. Ono, A., J.M. Orenstein, and E.O. Freed, Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J Virol*, 2000. 74(6): p. 2855-66.
58. Aloia, R.C., H. Tian, and F.C. Jensen, Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(11): p. 5181-5.
59. Weiss, C.D., J.A. Levy, and J.M. White, Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol*, 1990. 64(11): p. 5674-7.
60. Farzan, M., et al., Stabilization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers by disulfide bonds introduced into the gp41 glycoprotein ectodomain. *J Virol*, 1998. 72(9): p. 7620-5.
61. Lu, M., S.C. Blacklow, and P.S. Kim, A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol*, 1995. 2(12): p. 1075-82.
62. Gelderblom, H.R., et al., Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology*, 1987. 156(1): p. 171-6.
63. Ozel, M., G. Pauli, and H.R. Gelderblom, The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch Virol*, 1988. 100(3-4): p. 255-66.
64. Kuznetsov, Y.G., et al., Atomic force microscopy investigation of human immunodeficiency virus (HIV) and HIV-infected lymphocytes. *J Virol*, 2003. 77(22): p. 11896-909.
65. Frankel, A.D. and J.A. Young, HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: p. 1-25.

66. Stein, B.S. and E.G. Engleman, 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*, 1990. 265(5): p. 2640-9.
67. Montefiori, D.C., W.E. Robinson, Jr., and W.M. Mitchell, Role of protein N-glycosylation in pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. 85(23): p. 9248-52.
68. Toubert, A., et al., A peptide substitution in HIV-1 gp120 first hypervariable domain enhances its immunogenicity in mice. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1993. 9(8): p. 787-93.
69. Fenouillet, E., et al., Functional role of the glycan cluster of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein (gp41) ectodomain. *J Virol*, 1993. 67(1): p. 150-60.
70. Leonard, C.K., et al., 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*, 1990. 265(18): p. 10373-82.
71. Kwong, P.D., et al., Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 1998. 393(6686): p. 648-59.
72. Burton, D.R. and D.C. Montefiori, The antibody response in HIV-1 infection. *Aids*, 1997. 11 Suppl A: p. S87-98.
73. Wyatt, R., et al., 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*, 1995. 69(9): p. 5723-33.
74. Helseth, E., et al., Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol*, 1991. 65(4): p. 2119-23.

75. Weissenhorn, W., et al., Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*, 1997. 387(6631): p. 426-30.
76. Chan, D.C., et al., Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, 1997. 89(2): p. 263-73.
77. Kilgore, N., et al. C-peptide inhibitors of HIV-1 entry do not disrupt formation of a six-helix bundle structure in gp41. in *Retroconference*. 2002. Seattle, WA.
78. Sattentau, Q.J., CD4 activation of HIV fusion. *Int J Cell Cloning*, 1992. 10(6): p. 323-32.
79. Sattentau, Q.J., et al., The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule. *Aids*, 1988. 2(2): p. 101-5.
80. Sattentau, Q.J. and J.P. Moore, The role of CD4 in HIV binding and entry. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1993. 342(1299): p. 59-66.
81. McDougal, J.S., et al., Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science*, 1986. 231(4736): p. 382-5.
82. Dalglish, A.G., et al., The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 1984. 312(5996): p. 763-7.
83. Salzwedel, K. and E.A. Berger, Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: functional complementation of specific defects in gp120 and gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(23): p. 12794-9.
84. Simon, J.H., et al., Role of CD4 epitopes outside the gp120-binding site during entry of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 1997. 71(2): p. 1476-84.

85. Ashkenazi, A., et al., Mapping the CD4 binding site for human immunodeficiency virus by alanine-scanning mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. 87(18): p. 7150-4.
86. Arthos, J., et al., Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV. *Cell*, 1989. 57(3): p. 469-81.
87. Janeway, C.A., Jr., The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol*, 1992. 10: p. 645-74.
88. Cruikshank, W.W., H. Kornfeld, and D.M. Center, Signaling and functional properties of interleukin-16. *Int Rev Immunol*, 1998. 16(5-6): p. 523-40.
89. Alkhatib, G., et al., CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*, 1996. 272(5270): p. 1955-8.
90. Feng, Y., et al., HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 1996. 272(5263): p. 872-7.
91. Doranz, B.J., et al., A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*, 1996. 85(7): p. 1149-58.
92. Rucker, J., et al., Cell-cell fusion assay to study role of chemokine receptors in human immunodeficiency virus type 1 entry. *Methods Enzymol*, 1997. 288: p. 118-33.
93. Rucker, J., et al., Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol*, 1997. 71(12): p. 8999-9007.
94. Alkhatib, G., et al., Determinants of HIV-1 coreceptor function on CC chemokine receptor 3. Importance of both extracellular and

transmembrane/cytoplasmic regions. *J Biol Chem*, 1997. 272(33): p. 20420-6.

95. Alkhatib, G., et al., CC chemokine receptor 5-mediated signaling and HIV-1 Co-receptor activity share common structural determinants. Critical residues in the third extracellular loop support HIV-1 fusion. *J Biol Chem*, 1997. 272(32): p. 19771-6.

96. Alkhatib, G., et al., HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation. *Virology*, 1997. 234(2): p. 340-8.

97. Bjorndal, A., et al., Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol*, 1997. 71(10): p. 7478-87.

98. Cocchi, F., et al., Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science*, 1995. 270(5243): p. 1811-5.

99. Farzan, M., et al., 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*, 1998. 72(2): p. 1160-4.

100. Platt, E.J., et al., 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*, 2001. 75(24): p. 12266-78.

101. Cocchi, F., et al., The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med*, 1996. 2(11): p. 1244-7.

102. Coffin, J.M., HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*, 1995. 267(5197): p. 483-9.

103. Rosenberg, E.S., et al., Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature*, 2000. 407(6803): p. 523-6.
104. Scarlatti, G., et al., In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med*, 1997. 3(11): p. 1259-65.
105. Berger, E.A., et al., A new classification for HIV-1. *Nature*, 1998. 391(6664): p. 240.
106. Schuitemaker, H., et al., Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol*, 1992. 66(3): p. 1354-60.
107. Dean, M., et al., Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*, 1996. 273(5283): p. 1856-62.
108. Wilkinson, D.A., et al., A 32-bp deletion within the CCR5 locus protects against transmission of parenterally acquired human immunodeficiency virus but does not affect progression to AIDS-defining illness. *J Infect Dis*, 1998. 178(4): p. 1163-6.
109. Philpott, S., et al., CCR5 genotype and resistance to vertical transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1999. 21(3): p. 189-93.
110. Benkirane, M., et al., Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J Biol Chem*, 1997. 272(49): p. 30603-6.
111. Bomsel, M., Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med*, 1997. 3(1): p. 42-7.

112. Bomsel, M. and V. David, Mucosal gatekeepers: selecting HIV viruses for early infection. *Nat Med*, 2002. 8(2): p. 114-6.
113. Agace, W.W., et al., Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr Biol*, 2000. 10(6): p. 325-8.
114. De Silva, F.S., et al., CD4-independent infection of human B cells with HIV type 1: detection of unintegrated viral DNA. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001. 17(17): p. 1585-98.
115. Liu, Y., et al., CD4-independent infection of astrocytes by human immunodeficiency virus type 1: requirement for the human mannose receptor. *J Virol*, 2004. 78(8): p. 4120-33.
116. Gorry, P.R., et al., Astrocyte infection by HIV-1: mechanisms of restricted virus replication, and role in the pathogenesis of HIV-1-associated dementia. *Curr HIV Res*, 2003. 1(4): p. 463-73.
117. Al-Harthi, L., et al., Trophoblasts are productively infected by CD4-independent isolate of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2002. 18(1): p. 13-7.
118. Kitchen, S.G., C.H. Uittenbogaart, and J.A. Zack, Mechanism of human immunodeficiency virus type 1 localization in CD4-negative thymocytes: differentiation from a CD4-positive precursor allows productive infection. *J Virol*, 1997. 71(8): p. 5713-22.
119. Livingstone, W.J., et al., Frequent infection of peripheral blood CD8-positive T-lymphocytes with HIV-1. Edinburgh Heterosexual Transmission Study Group. *Lancet*, 1996. 348(9028): p. 649-54.
120. Speck, R.F., et al., A trans-receptor mechanism for infection of CD4-negative cells by human immunodeficiency virus type 1. *Curr Biol*, 1999. 9(10): p. 547-50.
121. Macallan, D.C., et al., Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans. *J Exp Med*, 2004. 200(2): p. 255-60.

122. Mackay, C.R., W.L. Marston, and L. Dudler, Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med*, 1990. 171(3): p. 801-17.
123. Marvel, J., et al., The CD45RA molecule is expressed in naive murine CTL precursors but absent in memory and effector CTL. *Int Immunol*, 1991. 3(1): p. 21-8.
124. Koretzky, G.A., Role of the CD45 tyrosine phosphatase in signal transduction in the immune system. *Faseb J*, 1993. 7(5): p. 420-6.
125. Berard, M. and D.F. Tough, Qualitative differences between naive and memory T cells. *Immunology*, 2002. 106(2): p. 127-38.
126. Campbell, J.J., et al., 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*, 1998. 141(4): p. 1053-9.
127. Forster, R., et al., CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*, 1999. 99(1): p. 23-33.
128. Janeway, C., Jr. and P. Travers, *Immunobiologie*. second ed. 1996, Bruxelles: DeBoek Université. 582.
129. Farber, D.L., Remembrance of antigens past: new insights into memory T cells. *Scand J Immunol*, 2003. 58(2): p. 145-54.
130. Brenchley, J.M., et al., T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J Virol*, 2004. 78(3): p. 1160-8.
131. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, 2004. 22: p. 745-63.

132. Kunkel, E.J., et al., Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *Am J Pathol*, 2002. 160(1): p. 347-55.
133. Sanders, M.E., et al., 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*, 1988. 140(5): p. 1401-7.
134. Sallusto, F., et al., Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999. 401(6754): p. 708-12.
135. Roederer, M., et al., HIV does not replicate in naive CD4 T cells stimulated with CD3/CD28. *J Clin Invest*, 1997. 99(7): p. 1555-64.
136. Spina, C.A., H.E. Prince, and D.D. Richman, Preferential replication of HIV-1 in the CD45RO memory cell subset of primary CD4 lymphocytes in vitro. *J Clin Invest*, 1997. 99(7): p. 1774-85.
137. Chun, T.W., et al., Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*, 1997. 387(6629): p. 183-8.
138. Ostrowski, M.A., et al., Both memory and CD45RA+/CD62L+ naive CD4(+) T cells are infected in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol*, 1999. 73(8): p. 6430-5.
139. Stout, R.D. and J. Suttles, T cells bearing the CD44hi "memory" phenotype display characteristics of activated cells in G1 stage of cell cycle. *Cell Immunol*, 1992. 141(2): p. 433-43.
140. Hermankova, M., et al., Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in latently infected resting CD4+ T lymphocytes in vivo. *J Virol*, 2003. 77(13): p. 7383-92.
141. Loetscher, P., et al., CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*, 1998. 391(6665): p. 344-5.

142. Schmidtayerova, H., et al., Human immunodeficiency virus type 1 T-lymphotropic strains enter macrophages via a CD4- and CXCR4-mediated pathway: replication is restricted at a postentry level. *J Virol*, 1998. 72(6): p. 4633-42.
143. Verani, A., G. Gras, and G. Pancino, Macrophages and HIV-1: dangerous liaisons. *Mol Immunol*, 2005. 42(2): p. 195-212.
144. Verani, A., et al., CXCR4 is a functional coreceptor for infection of human macrophages by CXCR4-dependent primary HIV-1 isolates. *J Immunol*, 1998. 161(5): p. 2084-8.
145. Yi, Y., et al., 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*, 1998. 72(1): p. 772-7.
146. Simmons, G., et al., CXCR4 as a functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages. *J Virol*, 1998. 72(10): p. 8453-7.
147. Lapham, C.K., et al., Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5. *Nat Med*, 1999. 5(3): p. 303-8.
148. Schmitt, M.P., et al., Permissivity of primary cultures of human Kupffer cells for HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1990. 6(8): p. 987-91.
149. Lewis, S.H., et al., HIV-1 in trophoblastic and villous Hofbauer cells, and haematological precursors in eight-week fetuses. *Lancet*, 1990. 335(8689): p. 565-8.
150. Lee, S.C., et al., Productive infection of human fetal microglia by HIV-1. *Am J Pathol*, 1993. 143(4): p. 1032-9.

- 151. Martin, J.C. and J.C. Bandres, Cells of the monocyte-macrophage lineage and pathogenesis of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1999. 22(5): p. 413-29.**
- 152. Alfano, M. and G. Poli, Role of cytokines and chemokines in the regulation of innate immunity and HIV infection. *Mol Immunol*, 2005. 42(2): p. 161-82.**
- 153. Montefiori, D.C., Role of complement and Fc receptors in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Springer Semin Immunopathol*, 1997. 18(3): p. 371-90.**
- 154. Marechal, V., et al., Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol*, 2001. 75(22): p. 11166-77.**
- 155. Nguyen, D.G., et al., Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem*, 2003. 278(52): p. 52347-54.**
- 156. Nguyen, D.G. and J.E. Hildreth, Involvement of macrophage mannose receptor in the binding and transmission of HIV by macrophages. *Eur J Immunol*, 2003. 33(2): p. 483-93.**
- 157. Turville, S.G., et al., Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood*, 2004. 103(6): p. 2170-9.**
- 158. Gummuluru, S., et al., 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*, 2003. 77(23): p. 12865-74.**
- 159. Mommaas, A.M., et al., 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*, 1999. 29(2): p. 571-80.**

160. Kawamura, T., et al., R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(14): p. 8401-6.
161. Moir, S., et al., CD40-Mediated induction of CD4 and CXCR4 on B lymphocytes correlates with restricted susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection: potential role of B lymphocytes as a viral reservoir. *J Virol*, 1999. 73(10): p. 7972-80.
162. Moir, S., et al., B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. *J Exp Med*, 2000. 192(5): p. 637-46.
163. Ali, A., B.D. Jamieson, and O.O. Yang, Half-genome human immunodeficiency virus type 1 constructs for rapid production of reporter viruses. *J Virol Methods*, 2003. 110(2): p. 137-42.
164. Sundstrom, J.B., et al., Signaling through Toll-like receptors triggers HIV-1 replication in latently infected mast cells. *J Immunol*, 2004. 172(7): p. 4391-401.
165. Bannert, N., et al., Human Mast cell progenitors can be infected by macrophagetropic human immunodeficiency virus type 1 and retain virus with maturation in vitro. *J Virol*, 2001. 75(22): p. 10808-14.
166. Zerhouni, B., J.A. Nelson, and K. Saha, CXCR4-dependent infection of CD8+, but not CD4+, lymphocytes by a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J Virol*, 2004. 78(22): p. 12288-96.
167. Valentin, A. and G.N. Pavlakis, Natural killer cells are persistently infected and resistant to direct killing by HIV-1. *Anticancer Res*, 2003. 23(3A): p. 2071-5.
168. Valentin, A., et al., Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(10): p. 7015-20.

169. Chehimi, J., et al., In vitro infection of natural killer cells with different human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol*, 1991. 65(4): p. 1812-22.
170. Motsinger, A., et al., CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med*, 2002. 195(7): p. 869-79.
171. van der Vliet, H.J., et al., Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol*, 2002. 168(3): p. 1490-5.
172. Sandberg, J.K., et al., Selective loss of innate CD4(+) V alpha 24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection. *J Virol*, 2002. 76(15): p. 7528-34.
173. Dwinell, M.B., et al., Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 1999. 117(2): p. 359-67.
174. Alfsen, A. and M. Bomsel, HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *J Biol Chem*, 2002. 277(28): p. 25649-59.
175. Bobardt, M.D., et al., Syndecan captures, protects, and transmits HIV to T lymphocytes. *Immunity*, 2003. 18(1): p. 27-39.
176. Mondor, I., S. Ugolini, and Q.J. Sattentau, Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J Virol*, 1998. 72(5): p. 3623-34.
177. Dezzutti, C.S., et al., Cervical and prostate primary epithelial cells are not productively infected but sequester human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*, 2001. 183(8): p. 1204-13.
178. Fotopoulos, G., et al., Transepithelial transport of HIV-1 by M cells is receptor-mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(14): p. 9410-4.

179. Vidricaire, G., M. Imbeault, and M.J. Tremblay, Endocytic host cell machinery plays a dominant role in intracellular trafficking of incoming human immunodeficiency virus type 1 in human placental trophoblasts. *J Virol*, 2004. 78(21): p. 11904-15.
180. Vidricaire, G., M.R. Tardif, and M.J. Tremblay, 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*, 2003. 278(18): p. 15832-41.
181. Vidricaire, G. and M.J. Tremblay, HIV-1 Entry and Infection of Human Placental Trophoblasts Occurs through a Mechanism Independent of the Viral Envelope Glycoproteins gp120 and gp41 but Requiring Various Carbohydrate-Mediated Virus-Cell Interactions. 2005.
182. Lagaye, S., et al., 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*, 2001. 75(10): p. 4780-91.
183. Cousin, B., et al., A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *Faseb J*, 1999. 13(2): p. 305-12.
184. Mohamed-Ali, V., J.H. Pinkney, and S.W. Coppack, Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1998. 22(12): p. 1145-58.
185. Hazan, U., et al., Human adipose cells express CD4, CXCR4, and CCR5 [corrected] receptors: a new target cell type for the immunodeficiency virus-1? *Faseb J*, 2002. 16(10): p. 1254-6.
186. Magistretti, P.J. and L. Pellerin, Cellular bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging: evidence for a prominent role of astrocytes. *Cereb Cortex*, 1996. 6(1): p. 50-61.

- 187. Fellin, T. and G. Carmignoto, Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol*, 2004. 559(Pt 1): p. 3-15.**
- 188. Hirase, H., et al., Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS Biol*, 2004. 2(4): p. E96.**
- 189. Brack-Werner, R., Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis. *Aids*, 1999. 13(1): p. 1-22.**
- 190. Sattentau, Q.J., et al., Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J Virol*, 1993. 67(12): p. 7383-93.**
- 191. Doranz, B.J., S.S. Baik, and R.W. Doms, Use of a gp120 binding assay to dissect the requirements and kinetics of human immunodeficiency virus fusion events. *J Virol*, 1999. 73(12): p. 10346-58.**
- 192. Ugolini, S., I. Mondor, and Q.J. Sattentau, HIV-1 attachment: another look. *Trends Microbiol*, 1999. 7(4): p. 144-9.**
- 193. Fouts, T.R., et al., Interactions of polyclonal and monoclonal anti-glycoprotein 120 antibodies with oligomeric glycoprotein 120-glycoprotein 41 complexes of a primary HIV type 1 isolate: relationship to neutralization. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1998. 14(7): p. 591-7.**
- 194. Larkin, M., et al., Oligosaccharide-mediated interactions of the envelope glycoprotein gp120 of HIV-1 that are independent of CD4 recognition. *Aids*, 1989. 3(12): p. 793-8.**
- 195. Curtis, B.M., S. Scharnowske, and A.J. Watson, 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*, 1992. 89(17): p. 8356-60.**
- 196. Geijtenbeek, T.B., et al., DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*, 2000. 100(5): p. 587-97.**

197. Hong, P.W., et al., Human immunodeficiency virus envelope (gp120) binding to DC-SIGN and primary dendritic cells is carbohydrate dependent but does not involve 2G12 or cyanovirin binding sites: implications for structural analyses of gp120-DC-SIGN binding. *J Virol*, 2002. 76(24): p. 12855-65.
198. Pohlmann, S., et al., 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*, 2001. 98(5): p. 2670-5.
199. Harouse, J.M., et al., Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science*, 1991. 253(5017): p. 320-3.
200. Fantini, J., et al., Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(7): p. 2700-4.
201. Delezay, O., et al., Co-expression of CXCR4/fusin and galactosylceramide in the human intestinal epithelial cell line HT-29. *Aids*, 1997. 11(11): p. 1311-8.
202. Seddiki, N., et al., A monoclonal antibody directed to sulfatide inhibits the binding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope glycoprotein to macrophages but not their infection by the virus. *Biochim Biophys Acta*, 1994. 1225(3): p. 289-96.
203. Olinger, G.G., et al., Cellular factors influence the binding of HIV type 1 to cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2002. 18(4): p. 259-67.
204. Sapphire, A.C., M.D. Bobardt, and P.A. Gallay, Human immunodeficiency virus type 1 hijacks host cyclophilin A for its attachment to target cells. *Immunol Res*, 2000. 21(2-3): p. 211-7.
205. Tardif, M.R. and M.J. Tremblay, 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*, 2003. 77(22): p. 12299-309.

206. Ouellet, M., et al., Galectin-1 acts as a soluble host factor that promotes HIV-1 infectivity through stabilization of virus attachment to host cells. *Journal of immunology*, soumis 2004 et accepté en 2005.

207. Stein, B.S., et al., pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell*, 1987. 49(5): p. 659-68.

208. Overbaugh, J., A.D. Miller, and M.V. Eiden, Receptors and entry cofactors for retroviruses include single and multiple transmembrane-spanning proteins as well as newly described glycoposphatidylinositol-anchored and secreted proteins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001. 65(3): p. 371-89, table of contents.

209. Maddon, P.J., et al., HIV infection does not require endocytosis of its receptor, CD4. *Cell*, 1988. 54(6): p. 865-74.

210. Myszka, D.G., et al., Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(16): p. 9026-31.

211. Moir, S., J. Perreault, and L. Poulin, Postbinding events mediated by human immunodeficiency virus type 1 are sensitive to modifications in the D4-transmembrane linker region of CD4. *J Virol*, 1996. 70(11): p. 8019-28.

212. Healey, D., et al., Novel anti-CD4 monoclonal antibodies separate human immunodeficiency virus infection and fusion of CD4+ cells from virus binding. *J Exp Med*, 1990. 172(4): p. 1233-42.

213. Doms, R.W., Beyond receptor expression: the influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection. *Virology*, 2000. 276(2): p. 229-37.

214. Melikyan, G.B., et al., Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol*, 2000. 151(2): p. 413-23.
215. Srivastava, K.K., et al., Human immunodeficiency virus type 1 NL4-3 replication in four T-cell lines: rate and efficiency of entry, a major determinant of permissiveness. *J Virol*, 1991. 65(7): p. 3900-2.
216. Blumenthal, R., et al., Membrane fusion. *Chem Rev*, 2003. 103(1): p. 53-69.
217. Chernomordik, L.V., et al., An early stage of membrane fusion mediated by the low pH conformation of influenza hemagglutinin depends upon membrane lipids. *J Cell Biol*, 1997. 136(1): p. 81-93.
218. Razinkov, V.I., G.B. Melikyan, and F.S. Cohen, Hemifusion between cells expressing hemagglutinin of influenza virus and planar membranes can precede the formation of fusion pores that subsequently fully enlarge. *Biophys J*, 1999. 77(6): p. 3144-51.
219. Roche, Fuzeon. 2003. [en ligne] <http://www.fuzeon.com/1000/1120.asp?nav=about&a=2> (Pages consultées le 30 octobre 2004)
220. White Lab. [en ligne] <http://www.people.virginia.edu/~jw7g/models&figures.html> (Pages consultées le 30 octobre 2004)
221. Sinangil, F., A. Loyter, and D.J. Volsky, Quantitative measurement of fusion between human immunodeficiency virus and cultured cells using membrane fluorescence dequenching. *FEBS Lett*, 1988. 239(1): p. 88-92.
222. Frey, S., et al., Temperature dependence of cell-cell fusion induced by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 1995. 69(3): p. 1462-72.
223. Layne, S.P., et al., HIV requires multiple gp120 molecules for CD4-mediated infection. *Nature*, 1990. 346(6281): p. 277-9.

224. Kuhmann, S.E., et al., Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 2000. 74(15): p. 7005-15.
225. Lee, B., et al., 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*, 1999. 96(9): p. 5215-20.
226. Resh, M.D., Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell Biochem*, 2004. 37: p. 217-32.
227. He, H.T., A. Lellouch, and D. Marguet, Lipid rafts and the initiation of T cell receptor signaling. *Semin Immunol*, 2005. 17(1): p. 23-33.
228. Chazal, N. and D. Gerlier, Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003. 67(2): p. 226-37, table of contents.
229. Steffens, C.M. and T.J. Hope, Mobility of the human immunodeficiency virus (HIV) receptor CD4 and coreceptor CCR5 in living cells: implications for HIV fusion and entry events. *J Virol*, 2004. 78(17): p. 9573-8.
230. Kozak, S.L., J.M. Heard, and D. Kabat, Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. *J Virol*, 2002. 76(4): p. 1802-15.
231. Popik, W. and T.M. Alce, CD4 receptor localized to non-raft membrane microdomains supports HIV-1 entry. Identification of a novel raft localization marker in CD4. *J Biol Chem*, 2004. 279(1): p. 704-12.
232. Percherancier, Y., et al., HIV-1 entry into T-cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant, raft membrane domains. *J Biol Chem*, 2003. 278(5): p. 3153-61.

233. Viard, M., et al., Role of cholesterol in human immunodeficiency virus type 1 envelope protein-mediated fusion with host cells. *J Virol*, 2002. 76(22): p. 11584-95.
234. Popik, W., T.M. Alce, and W.C. Au, Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol*, 2002. 76(10): p. 4709-22.
235. Liao, Z., et al., Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2001. 17(11): p. 1009-19.
236. Singer, II, et al., CCR5, CXCR4, and CD4 are clustered and closely apposed on microvilli of human macrophages and T cells. *J Virol*, 2001. 75(8): p. 3779-90.
237. Iyengar, S., J.E. Hildreth, and D.H. Schwartz, Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells. *J Virol*, 1998. 72(6): p. 5251-5.
238. Grewe, C., A. Beck, and H.R. Gelderblom, HIV: early virus-cell interactions. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1990. 3(10): p. 965-74.
239. Fackler, O.T. and B.M. Peterlin, Endocytic entry of HIV-1. *Curr Biol*, 2000. 10(16): p. 1005-8.
240. Pauza, C.D. and T.M. Price, Human immunodeficiency virus infection of T cells and monocytes proceeds via receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol*, 1988. 107(3): p. 959-68.
241. Pauza, C.D., The endocytic pathway for human immunodeficiency virus infection. *Adv Exp Med Biol*, 1991. 300: p. 111-38; discussion 139-44.
242. Marechal, V., et al., Cytosolic Gag p24 as an index of productive entry of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 1998. 72(3): p. 2208-12.

243. Sorkin, A. and M. Von Zastrow, Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(8): p. 600-14.
244. Mellman, I., Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996. 12: p. 575-625.
245. Mousavi, S.A., et al., Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J*, 2004. 377(Pt 1): p. 1-16.
246. Nabi, I.R. and P.U. Le, Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol*, 2003. 161(4): p. 673-7.
247. Lanzavecchia, A., Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol*, 1996. 8(3): p. 348-54.
248. Kozak, S.L., et al., Roles of CD4 and coreceptors in binding, endocytosis, and proteolysis of gp120 envelope glycoproteins derived from human immunodeficiency virus type 1. *J Biol Chem*, 1999. 274(33): p. 23499-507.
249. Aiken, C., et al., Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*, 1994. 76(5): p. 853-64.
250. Kim, P.W., et al., A zinc clasp structure tethers Lck to T cell coreceptors CD4 and CD8. *Science*, 2003. 301(5640): p. 1725-8.
251. Pelchen-Matthews, A., et al., The protein tyrosine kinase p56lck inhibits CD4 endocytosis by preventing entry of CD4 into coated pits. *J Cell Biol*, 1992. 117(2): p. 279-90.
252. Pelchen-Matthews, A., et al., Differential endocytosis of CD4 in lymphocytic and nonlymphocytic cells. *J Exp Med*, 1991. 173(3): p. 575-87.

253. Schaeffer, E., V.B. Soros, and W.C. Greene, Compensatory link between fusion and endocytosis of human immunodeficiency virus type 1 in human CD4 T lymphocytes. *J Virol*, 2004. 78(3): p. 1375-83.
254. Amyere, M., et al., Origin, originality, functions, subversions and molecular signalling of macropinocytosis. *Int J Med Microbiol*, 2002. 291(6-7): p. 487-94.
255. Engering, A., et al., The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol*, 2002. 168(5): p. 2118-26.
256. McDonald, D., et al., Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science*, 2003. 300(5623): p. 1295-7.
257. Igakura, T., et al., Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science*, 2003. 299(5613): p. 1713-6.
258. Olinger, G.G., M. Saifuddin, and G.T. Spear, CD4-Negative cells bind human immunodeficiency virus type 1 and efficiently transfer virus to T cells. *J Virol*, 2000. 74(18): p. 8550-7.
259. Gabali, A.M., et al., Activation by inflammatory stimuli increases neutrophil binding of human immunodeficiency virus type 1 and subsequent infection of lymphocytes. *J Virol*, 2004. 78(19): p. 10833-6.
260. Kwon, D.S., et al., DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity*, 2002. 16(1): p. 135-44.
261. Cambi, A., et al., Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J Cell Biol*, 2004. 164(1): p. 145-55.
262. Blanco, J., et al., High level of coreceptor-independent HIV transfer induced by contacts between primary CD4 T cells. *J Biol Chem*, 2004. 279(49): p. 51305-14.

263. Jolly, C., et al., HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med*, 2004. 199(2): p. 283-93.
264. Cartier, C., et al., Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. *J Biol Chem*, 1999. 274(27): p. 19434-40.
265. Franke, E.K., H.E. Yuan, and J. Luban, Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature*, 1994. 372(6504): p. 359-62.
266. Lu, X., et al., Interactions between HIV1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4. *Immunity*, 1998. 8(5): p. 647-56.
267. Bukrinskaya, A., et al., Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med*, 1998. 188(11): p. 2113-25.
268. Isel, C., et al., Structural basis for the specificity of the initiation of HIV-1 reverse transcription. *Embo J*, 1999. 18(4): p. 1038-48.
269. Zhang, Z., et al., Genetic analysis of the U5-PBS of a novel HIV-1 reveals multiple interactions between the tRNA and RNA genome required for initiation of reverse transcription. *Rna*, 1998. 4(4): p. 394-406.
270. Lanchy, J.M., et al., Dynamics of the HIV-1 reverse transcription complex during initiation of DNA synthesis. *J Biol Chem*, 2000. 275(16): p. 12306-12.
271. Huthoff, H., et al., 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*, 2003. 31(17): p. 5186-94.
272. Miller, M.D., C.M. Farnet, and F.D. Bushman, Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol*, 1997. 71(7): p. 5382-90.

273. McDonald, D., et al., Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol*, 2002. 159(3): p. 441-52.
274. Wiese, C., et al., Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science*, 2001. 291(5504): p. 653-6.
275. Melchior, F., et al., Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J Cell Biol*, 1993. 123(6 Pt 2): p. 1649-59.
276. Moore, M.S. and G. Blobel, The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, 1993. 365(6447): p. 661-3.
277. Haffar, O.K., et al., Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *J Mol Biol*, 2000. 299(2): p. 359-68.
278. Bukrinsky, M.I., et al., A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature*, 1993. 365(6447): p. 666-9.
279. Gallay, P., et al., Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol*, 1996. 70(2): p. 1027-32.
280. Jenkins, Y., et al., Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J Cell Biol*, 1998. 143(4): p. 875-85.
281. Popov, S., et al., Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J Biol Chem*, 1998. 273(21): p. 13347-52.
282. de Noronha, C.M., et al., Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science*, 2001. 294(5544): p. 1105-8.

283. Balliet, J.W., et al., Distinct effects in primary macrophages and lymphocytes of the human immunodeficiency virus type 1 accessory genes *vpr*, *vpu*, and *nef*: mutational analysis of a primary HIV-1 isolate. *Virology*, 1994. 200(2): p. 623-31.
284. Connor, R.I., et al., Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology*, 1995. 206(2): p. 935-44.
285. Fouchier, R.A., et al., HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *Embo J*, 1997. 16(15): p. 4531-9.
286. Kootstra, N.A. and H. Schuitemaker, Phenotype of HIV-1 lacking a functional nuclear localization signal in matrix protein of gag and Vpr is comparable to wild-type HIV-1 in primary macrophages. *Virology*, 1999. 253(2): p. 170-80.
287. Warner C. Greene and B. Matija Peterlin, Molecular Insights Into HIV Biology. 2003, HIV InSite Knowledge Base Chapter UCSF.
288. Schroder, A.R., et al., HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, 2002. 110(4): p. 521-9.
289. Carteau, S., C. Hoffmann, and F. Bushman, Chromosome structure and human immunodeficiency virus type 1 cDNA integration: centromeric alphoid repeats are a disfavored target. *J Virol*, 1998. 72(5): p. 4005-14.
290. Wu, Y., HIV-1 gene expression: lessons from provirus and non-integrated DNA. *Retrovirology*, 2004. 1(1): p. 13.
291. Wu, Y. and J.W. Marsh, Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science*, 2001. 293(5534): p. 1503-6.

292. Chun, T.W., et al., Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(15): p. 8869-73.
293. Scripture-Adams, D.D., et al., Interleukin-7 induces expression of latent human immunodeficiency virus type 1 with minimal effects on T-cell phenotype. *J Virol*, 2002. 76(24): p. 13077-82.
294. Scheller, C., et al., CpG oligodeoxynucleotides activate HIV replication in latently infected human T cells. *J Biol Chem*, 2004. 279(21): p. 21897-902.
295. Biancotto, A., et al., Dual role of prostratin in inhibition of infection and reactivation of human immunodeficiency virus from latency in primary blood lymphocytes and lymphoid tissue. *J Virol*, 2004. 78(19): p. 10507-15.
296. Kulkosky, J., et al., Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggests a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Blood*, 2001. 98(10): p. 3006-15.
297. Bocklandt, S., P.M. Blumberg, and D.H. Hamer, Activation of latent HIV-1 expression by the potent anti-tumor promoter 12-deoxyphorbol 13-phenylacetate. *Antiviral Res*, 2003. 59(2): p. 89-98.
298. Jordan, A., P. Defechereux, and E. Verdin, The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *Embo J*, 2001. 20(7): p. 1726-38.
299. Van Lint, C., et al., Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *Embo J*, 1996. 15(5): p. 1112-20.
300. He, G. and D.M. Margolis, Counterregulation of chromatin deacetylation and histone deacetylase occupancy at the integrated promoter of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the HIV-1

repressor YY1 and HIV-1 activator Tat. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(9): p. 2965-73.

301. Pion, M., et al., Transcriptional suppression of in vitro-integrated human immunodeficiency virus type 1 does not correlate with proviral DNA methylation. *J Virol*, 2003. 77(7): p. 4025-32.

302. Kao, S.Y., et al., Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature*, 1987. 330(6147): p. 489-93.

303. Wei, P., et al., A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*, 1998. 92(4): p. 451-62.

304. Price, D.H., P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(8): p. 2629-34.

305. Fujinaga, K., et al., Dynamics of human immunodeficiency virus transcription: P-TEFb phosphorylates RD and dissociates negative effectors from the transactivation response element. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(2): p. 787-95.

306. Yamaguchi, Y., et al., NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*, 1999. 97(1): p. 41-51.

307. Jordan, A., D. Bisgrove, and E. Verdin, HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *Embo J*, 2003. 22(8): p. 1868-77.

308. Saltarelli, M.J., et al., Analysis of human immunodeficiency virus type 1 mRNA splicing patterns during disease progression in peripheral blood mononuclear cells from infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1996. 12(15): p. 1443-56.

309. Cullen, B.R., Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology*, 1998. 249(2): p. 203-10.

- 310. Teo, I., et al., Circular forms of unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA and high levels of viral protein expression: association with dementia and multinucleated giant cells in the brains of patients with AIDS. *J Virol*, 1997. 71(4): p. 2928-33.**
- 311. Pang, S., et al., High levels of unintegrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients. *Nature*, 1990. 343(6253): p. 85-9.**
- 312. Stevenson, M., et al., HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *Embo J*, 1990. 9(5): p. 1551-60.**
- 313. Spina, C.A., J.C. Guatelli, and D.D. Richman, Establishment of a stable, inducible form of human immunodeficiency virus type 1 DNA in quiescent CD4 lymphocytes in vitro. *J Virol*, 1995. 69(5): p. 2977-88.**
- 314. Panther, L.A., et al., 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*, 1998. 17(4): p. 303-13.**
- 315. Zimmerman, C., et al., Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids. *Nature*, 2002. 415(6867): p. 88-92.**
- 316. Rousso, I., et al., Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(25): p. 13523-5.**
- 317. Lee, Y.M., B. Liu, and X.F. Yu, Formation of virus assembly intermediate complexes in the cytoplasm by wild-type and assembly-defective mutant human immunodeficiency virus type 1 and their association with membranes. *J Virol*, 1999. 73(7): p. 5654-62.**
- 318. Ono, A. and E.O. Freed, Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(24): p. 13925-30.**

319. Gottlinger, H.G., J.G. Sodroski, and W.A. Haseltine, Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989. 86(15): p. 5781-5.
320. Wyma, D.J., A. Kotov, and C. Aiken, Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol*, 2000. 74(20): p. 9381-7.
321. Zheng, Y.H., et al., Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts. *Curr Biol*, 2001. 11(11): p. 875-9.
322. Stuchell, M.D., et al., The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding. *J Biol Chem*, 2004. 279(34): p. 36059-71.
323. Goff, A., et al., Tsg101 control of human immunodeficiency virus type 1 Gag trafficking and release. *J Virol*, 2003. 77(17): p. 9173-82.
324. Garrus, J.E., et al., Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, 2001. 107(1): p. 55-65.
325. Strack, B., et al., A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(24): p. 13063-8.
326. Martin-Serrano, J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med*, 2001. 7(12): p. 1313-9.
327. VerPlank, L., et al., Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(14): p. 7724-9.
328. Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, and M. Marsh, Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol*, 2003. 162(3): p. 443-55.

329. Raposo, G., et al., Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic*, 2002. 3(10): p. 718-29.
330. Nydegger, S., et al., HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic*, 2003. 4(12): p. 902-10.
331. Ono, A. and E.O. Freed, Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol*, 2004. 78(3): p. 1552-63.
332. Pornillos, O., et al., HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein. *J Cell Biol*, 2003. 162(3): p. 425-34.
333. von Schwedler, U.K., et al., The protein network of HIV budding. *Cell*, 2003. 114(6): p. 701-13.
334. Gould, S.J., A.M. Booth, and J.E. Hildreth, The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(19): p. 10592-7.
335. Parton, R.G. and A.A. Richards, Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic*, 2003. 4(11): p. 724-38.
336. Ott, D.E., et al., Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology*, 2000. 278(1): p. 111-21.
337. Ott, D.E., et al., Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol*, 1996. 70(11): p. 7734-43.
338. Chatel-Chaix, L., et al., Identification of Staufin in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(7): p. 2637-48.
339. Thali, M., et al., Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature*, 1994. 372(6504): p. 363-5.

340. Ott, D.E., et al., Analysis and localization of cyclophilin A found in the virions of human immunodeficiency virus type 1 MN strain. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1995. 11(9): p. 1003-6.
341. Douaisi, M., et al., HIV-1 and MLV Gag proteins are sufficient to recruit APOBEC3G into virus-like particles. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. 321(3): p. 566-73.
342. Svarovskaia, E.S., et al., Human apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide-like 3G (APOBEC3G) is incorporated into HIV-1 virions through interactions with viral and nonviral RNAs. *J Biol Chem*, 2004. 279(34): p. 35822-8.
343. Bishop, N. and P. Woodman, TSG101/mammalian VPS23 and mammalian VPS28 interact directly and are recruited to VPS4-induced endosomes. *J Biol Chem*, 2001. 276(15): p. 11735-42.
344. Gelderblom, H., et al., MHC-antigens: constituents of the envelopes of human and simian immunodeficiency viruses. *Z Naturforsch [C]*, 1987. 42(11-12): p. 1328-34.
345. Henderson, L.E., et al., Direct identification of class II histocompatibility DR proteins in preparations of human T-cell lymphotropic virus type III. *J Virol*, 1987. 61(2): p. 629-32.
346. Frank, I., et al., Acquisition of host cell-surface-derived molecules by HIV-1. *Aids*, 1996. 10(14): p. 1611-20.
347. Meerloo, T., et al., Modulation of cell surface molecules during HIV-1 infection of H9 cells. An immunoelectron microscopic study. *Aids*, 1992. 6(10): p. 1105-16.
348. Orentas, R.J. and J.E. Hildreth, Association of host cell surface adhesion receptors and other membrane proteins with HIV and SIV. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1993. 9(11): p. 1157-65.

- 349. Capobianchi, M.R., et al., A simple and reliable method to detect cell membrane proteins on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. J Infect Dis, 1994. 169(4): p. 886-9.**
- 350. Meerloo, T., et al., Host cell membrane proteins on human immunodeficiency virus type 1 after in vitro infection of H9 cells and blood mononuclear cells. An immuno-electron microscopic study. J Gen Virol, 1993. 74 (Pt 1): p. 129-35.**
- 351. Giguere, J.F., et al., New insights into the functionality of a virion-anchored host cell membrane protein: CD28 versus HIV type 1. J Immunol, 2002. 169(5): p. 2762-71.**
- 352. Cantin, R., J.F. Fortin, and M. Tremblay, The amount of host HLA-DR proteins acquired by HIV-1 is virus strain- and cell type-specific. Virology, 1996. 218(2): p. 372-81.**
- 353. Saifuddin, M., et al., Role of virion-associated glycosylphosphatidylinositol-linked proteins CD55 and CD59 in complement resistance of cell line-derived and primary isolates of HIV-1. J Exp Med, 1995. 182(2): p. 501-9.**
- 354. Bastiani, L., et al., Host cell-dependent alterations in envelope components of human immunodeficiency virus type 1 virions. J Virol, 1997. 71(5): p. 3444-50.**
- 355. Giguere, J.F., et al., Insertion of host-derived costimulatory molecules CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) into human immunodeficiency virus type 1 affects the virus life cycle. J Virol, 2004. 78(12): p. 6222-32.**
- 356. Tremblay, M.J., J.F. Fortin, and R. Cantin, The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. Immunol Today, 1998. 19(8): p. 346-51.**
- 357. Beausejour, Y. and M.J. Tremblay, 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, 2004. 78(21): p. 11916-25.**

- 358. Hourieux, C., et al., Identification of the glycoprotein 41(TM) cytoplasmic tail domains of human immunodeficiency virus type 1 that interact with Pr55Gag particles. AIDS Res Hum Retroviruses, 2000. 16(12): p. 1141-7.**
- 359. Bachand, F., et al., Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. J Biol Chem, 1999. 274(13): p. 9083-91.**
- 360. Simon, J.H., et al., Vif and the p55(Gag) polyprotein of human immunodeficiency virus type 1 are present in colocalizing membrane-free cytoplasmic complexes. J Virol, 1999. 73(4): p. 2667-74.**
- 361. Beausejour, Y. and M.J. Tremblay, 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, 2004. 324(1): p. 165-72.**
- 362. Martin, G., et al., Envelope glycoproteins are dispensable for insertion of host HLA-DR molecules within nascent human immunodeficiency virus type 1 virions. Virology, soumis en 2005.**
- 363. Graham, D.R., et al., Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with beta-cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts. J Virol, 2003. 77(15): p. 8237-48.**
- 364. Campbell, S.M., S.M. Crowe, and J. Mak, Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. J Clin Virol, 2001. 22(3): p. 217-27.**
- 365. Liao, Z., D.R. Graham, and J.E. Hildreth, Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells. AIDS Res Hum Retroviruses, 2003. 19(8): p. 675-87.**

- 366. Nguyen, D.H. and J.E. Hildreth, Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. J Virol, 2000. 74(7): p. 3264-72.**
- 367. Briggs, J.A., et al., Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. Embo J, 2003. 22(7): p. 1707-15.**
- 368. Cantin, R., et al., The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity. J Virol, 1997. 71(3): p. 1922-30.**
- 369. Cantin, R., et al., 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, 1997. 90(3): p. 1091-100.**
- 370. Roy, J. and M. Tremblay, Human immunodeficiency virus type 1 can act as an antigen-presenting cell upon acquisition from the host cell of peptide-loaded HLA-DR and CD86 molecules. Journal of immunology, soumis en 2004 et accepté avec modifications.**
- 371. Rossio, J.L., et al., HLA class II on HIV particles is functional in superantigen presentation to human T cells: implications for HIV pathogenesis. AIDS Res Hum Retroviruses, 1995. 11(12): p. 1433-9.**
- 372. Losier, M., et al., Virion-bound ICAM-1 and activated LFA-1: a combination of factors conferring resistance to neutralization by sera from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals independently of the disease status and phase. Clin Immunol, 2003. 108(2): p. 111-8.**
- 373. Tardif, M. and M. Tremblay, Regulation of LFA-1 avidity through cytoskeleton and signaling components modulates the efficiency of HIV-1 entry in activated CD4+ T lymphocytes. Journal of immunology, soumis en 2004 et accepté avec modifications.**
- 374. Tardif, M. and M. Tremblay, LFA-1 is a key determinant for preferential infection**

of central memory CD4⁺ T cells by HIV-1. *Journal of Virology*, soumis en 2005.

375. Hioe, C.E., et al., Role of cellular adhesion molecules in HIV type 1 infection and their impact on virus neutralization. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1998. 14 Suppl 3: p. S247-54.

376. Beausejour, Y. and M.J. Tremblay, Susceptibility of HIV type 1 to the fusion inhibitor T-20 is reduced on insertion of host intercellular adhesion molecule 1 in the virus membrane. *J Infect Dis*, 2004. 190(5): p. 894-902.

377. Spear, G.T., et al., Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV). *J Immunol*, 1995. 155(9): p. 4376-81.

378. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., Innate immunity. *N Engl J Med*, 2000. 343(5): p. 338-44.

379. Delves, P.J. and I.M. Roitt, The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*, 2000. 343(2): p. 108-17.

380. Hatzioannou, T., et al., Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(29): p. 10774-9.

381. Bieniasz, P.D., Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol*, 2004. 5(11): p. 1109-15.

382. Keckesova, Z., L.M. Ylinen, and G.J. Towers, The human and African green monkey TRIM5alpha genes encode Ref1 and Lv1 retroviral restriction factor activities. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(29): p. 10780-5.

- 383. Stremlau, M., et al., The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*, 2004. 427(6977): p. 848-53.**
- 384. Jarmuz, A., et al., An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics*, 2002. 79(3): p. 285-96.**
- 385. Sheehy, A.M., et al., Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, 2002. 418(6898): p. 646-50.**
- 386. Muramatsu, M., et al., Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem*, 1999. 274(26): p. 18470-6.**
- 387. Mangeat, B., et al., Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*, 2003. 424(6944): p. 99-103.**
- 388. Zhang, H., et al., The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature*, 2003. 424(6944): p. 94-8.**
- 389. Harris, R.S., et al., DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell*, 2003. 113(6): p. 803-9.**
- 390. Simon, J.H., et al., The regulation of primate immunodeficiency virus infectivity by Vif is cell species restricted: a role for Vif in determining virus host range and cross-species transmission. *Embo J*, 1998. 17(5): p. 1259-67.**
- 391. Mehle, A., et al., Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem*, 2004. 279(9): p. 7792-8.**

392. Yu, X., et al., Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science*, 2003. 302(5647): p. 1056-60.
393. Santa-Marta, M., et al., HIV-1 Vif can directly inhibit APOBEC3G-mediated cytidine deamination by using a single amino acid interaction and without protein degradation. *J Biol Chem*, 2005. 280(10): p. 8765-75.
394. Oravecz, T., M. Pall, and M.A. Norcross, Beta-chemokine inhibition of monocytotropic HIV-1 infection. Interference with a postbinding fusion step. *J Immunol*, 1996. 157(4): p. 1329-32.
395. Minagar, A., et al., HIV-associated dementia, Alzheimer's disease, multiple sclerosis, and schizophrenia: gene expression review. *J Neurol Sci*, 2004. 224(1-2): p. 3-17.
396. Hidalgo, J.A., R.D. MacArthur, and L.R. Crane, An overview of HIV infection and AIDS: etiology, pathogenesis, diagnosis, epidemiology, and occupational exposure. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2000. 12(2): p. 130-9.
397. Simonsen, J.N., et al., HIV pathogenesis: mechanisms of susceptibility and disease progression. *Curr Opin Microbiol*, 1998. 1(4): p. 423-9.
398. Lemire, B., Le traitement de l'infection par le VIH chez l'adulte. *Quebec pharmacie*, 2004. 51(2): p. 117-132.
399. Comité consultatif sur la prise en charge clinique des personnes vivant avec le VIH, La thérapie anti-rétrovirale pour les adultes infectés par le VIH. 2002, Direction des communications du ministère de la santé et des services sociaux, Quebec.
400. Quinn, T.C., et al., Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med*, 2000. 342(13): p. 921-9.

- 401. Korenromp, E.L., et al., Determinants of the Impact of Sexually Transmitted Infection Treatment on Prevention of HIV Infection: A Synthesis of Evidence from the Mwanza, Rakai, and Masaka Intervention Trials. *J Infect Dis*, 2005. 191(Suppl 1): p. S168-78.**
- 402. Cohen, M.S., HIV and sexually transmitted diseases: lethal synergy. *Top HIV Med*, 2004. 12(4): p. 104-7.**
- 403. Plummer, F.A., et al., Cofactors in male-female sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis*, 1991. 163(2): p. 233-9.**
- 404. Hunter, D.J., et al., Sexual behavior, sexually transmitted diseases, male circumcision and risk of HIV infection among women in Nairobi, Kenya. *Aids*, 1994. 8(1): p. 93-9.**
- 405. Reichelderfer, P.S., et al., Effect of menstrual cycle on HIV-1 levels in the peripheral blood and genital tract. WHS 001 Study Team. *Aids*, 2000. 14(14): p. 2101-7.**
- 406. Yeaman, G.R., et al., Human immunodeficiency virus receptor and coreceptor expression on human uterine epithelial cells: regulation of expression during the menstrual cycle and implications for human immunodeficiency virus infection. *Immunology*, 2003. 109(1): p. 137-46.**
- 407. Ministère des solidarités, de la santé et de la famille, Politique de santé publique de lutte contre le SIDA. 2002, Division de la lutte contre le VIH et les MST. [en ligne]
<http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/sida02/3sida2.htm> (Pages consultées le 15 janvier 2005)**
- 408. Gupta, P., et al., 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*, 2002. 76(19): p. 9868-76.**

409. Collins, K.B., et al., Development of an in vitro organ culture model to study transmission of HIV-1 in the female genital tract. *Nat Med*, 2000. 6(4): p. 475-9.
410. IAVI, Early Dendritic Cell Driven Events. 2004. [en ligne] <http://www.iavireportonline.org/Issues/0804/EarlyDendriticCellDrivenEvents.asp> (Pages consultées le 15 novembre 2004)
411. Pope, M. and A.T. Haase, Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med*, 2003. 9(7): p. 847-52.
412. Vanhems, P. and R. Beaulieu, Primary infection by type 1 human immunodeficiency virus: diagnosis and prognosis. *Postgrad Med J*, 1997. 73(861): p. 403-8.
413. Cooper, D.A., et al., Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet*, 1985. 1(8428): p. 537-40.
414. Haase, A.T., Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol*, 1999. 17: p. 625-56.
415. Pantaleo, G., et al., HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*, 1993. 362(6418): p. 355-8.
416. Schacker, T.W., et al., Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med*, 1998. 128(8): p. 613-20.
417. Zhang, Z., et al., Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science*, 1999. 286(5443): p. 1353-7.
418. Douek, D.C., et al., HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature*, 2002. 417(6884): p. 95-8.

419. Wei, X., et al., Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 1995. 373(6510): p. 117-22.
420. Ho, D.D., et al., Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 1995. 373(6510): p. 123-6.
421. Little, S.J., et al., Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *J Exp Med*, 1999. 190(6): p. 841-50.
422. Gandhi, R.T. and B.D. Walker, Immunologic control of HIV-1. *Annu Rev Med*, 2002. 53: p. 149-72.
423. Buchbinder, S. and E. Vittinghoff, HIV-infected long-term nonprogressors: epidemiology, mechanisms of delayed progression, and clinical and research implications. *Microbes Infect*, 1999. 1(13): p. 1113-20.
424. Perelson, A.S., et al., HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, 1996. 271(5255): p. 1582-6.
425. Vergis, E.N. and J.W. Mellors, Natural history of HIV-1 infection. *Infect Dis Clin North Am*, 2000. 14(4): p. 809-25, v-vi.
426. Buchbinder, S.P., et al., Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *Aids*, 1994. 8(8): p. 1123-8.
427. Cao, Y., et al., Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*, 1995. 332(4): p. 201-8.
428. Baltimore, D., Lessons from people with nonprogressive HIV infection. *N Engl J Med*, 1995. 332(4): p. 259-60.
429. Pantaleo, G., et al., Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*, 1995. 332(4): p. 209-16.

430. Zhang, L., et al., Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science*, 2002. 298(5595): p. 995-1000.
431. Mendila, M., et al., Immunologic and virologic studies in long-term nonprogressors with HIV-1 infection. *Eur J Med Res*, 1999. 4(10): p. 417-24.
432. Kamp, W., et al., Mechanisms of HIV-1 to escape from the host immune surveillance. *Eur J Clin Invest*, 2000. 30(8): p. 740-6.
433. Rowland-Jones, S., R. Tan, and A. McMichael, Role of cellular immunity in protection against HIV infection. *Adv Immunol*, 1997. 65: p. 277-346.
434. McMichael, A., T cell responses and viral escape. *Cell*, 1998. 93(5): p. 673-6.
435. Couillin, I., et al., 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*, 1994. 180(3): p. 1129-34.
436. Collins, K.L., et al., HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*, 1998. 391(6665): p. 397-401.
437. Le Gall, S., et al., Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity*, 1998. 8(4): p. 483-95.
438. Reichart, P.A., Oral manifestations in HIV infection: fungal and bacterial infections, Kaposi's sarcoma. *Med Microbiol Immunol (Berl)*, 2003. 192(3): p. 165-9.
439. Chesebro, M.J. and W.D. Everett, Understanding the guidelines for treating HIV disease. *Am Fam Physician*, 1998. 57(2): p. 315-22, 328.

440. Ioannidis, J. and D. Wilkinson, HIV: opportunistic infections. *Clin Evid*, 2003(9): p. 795-816.
441. Gonzalez-Scarano, F. and J. Martin-Garcia, The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol*, 2005. 5(1): p. 69-81.
442. Pantaleo, G., C. Graziosi, and A.S. Fauci, New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*, 1993. 328(5): p. 327-35.
443. Roederer, M., Getting to the HAART of T cell dynamics. *Nat Med*, 1998. 4(2): p. 145-6.
444. Hellerstein, M.K., et al., Subpopulations of long-lived and short-lived T cells in advanced HIV-1 infection. *J Clin Invest*, 2003. 112(6): p. 956-66.
445. Younes, S.A., et al., HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med*, 2003. 198(12): p. 1909-22.
446. Autran, B., et al., Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science*, 1997. 277(5322): p. 112-6.
447. Pakker, N.G., et al., Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med*, 1998. 4(2): p. 208-14.
448. Pantaleo, G., et al., Human immunodeficiency virus (HIV) infection in CD4+ T lymphocytes genetically deficient in LFA-1: LFA-1 is required for HIV-mediated cell fusion but not for viral transmission. *J Exp Med*, 1991. 173(2): p. 511-4.
449. Pantaleo, G., et al., Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(21): p. 9838-42.

450. Pantaleo, G., C. Graziosi, and A.S. Fauci, The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection. *Semin Immunol*, 1993. 5(3): p. 157-63.
451. Fleury, S., et al., Limited CD4+ T-cell renewal in early HIV-1 infection: effect of highly active antiretroviral therapy. *Nat Med*, 1998. 4(7): p. 794-801.
452. Kourtis, A.P., et al., Early progression of disease in HIV-infected infants with thymus dysfunction. *N Engl J Med*, 1996. 335(19): p. 1431-6.
453. Haynes, B.F., et al., Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *J Clin Invest*, 1999. 103(4): p. 453-60.
454. McCune, J.M., et al., High prevalence of thymic tissue in adults with human immunodeficiency virus-1 infection. *J Clin Invest*, 1998. 101(11): p. 2301-8.
455. Douek, D.C., et al., Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 1998. 396(6712): p. 690-5.
456. Haynes, B.F., HIV infection and the dynamic interplay between the thymus and the peripheral T cell pool. *Clin Immunol*, 1999. 92(1): p. 3-5.
457. Sachsenberg, N., et al., Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen. *J Exp Med*, 1998. 187(8): p. 1295-303.
458. Palmer, L.D., et al., Telomere length, telomerase activity, and replicative potential in HIV infection: analysis of CD4+ and CD8+ T cells from HIV-discordant monozygotic twins. *J Exp Med*, 1997. 185(7): p. 1381-6.
459. De Milito, A., B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. *Curr HIV Res*, 2004. 2(1): p. 11-21.

460. Moir, S., et al., HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(18): p. 10362-7.
461. Biggs, B.A., et al., HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*, 1995. 154(11): p. 6132-9.
462. Kumar, A., et al., Dysregulation of B7.2 (CD86) expression on monocytes of HIV-infected individuals is associated with altered production of IL-2. *Clin Exp Immunol*, 1999. 117(1): p. 84-91.
463. Polyak, S., et al., Impaired class II expression and antigen uptake in monocytic cells after HIV-1 infection. *J Immunol*, 1997. 159(5): p. 2177-88.
464. Kedzierska, K., et al., HIV-1 down-modulates gamma signaling chain of Fc gamma R in human macrophages: a possible mechanism for inhibition of phagocytosis. *J Immunol*, 2002. 168(6): p. 2895-903.
465. Chan, H.T., et al., Quantifying complement-mediated phagocytosis by human monocyte-derived macrophages. *Immunol Cell Biol*, 2001. 79(5): p. 429-35.
466. Herbein, G., et al., Macrophage activation and HIV infection: can the Trojan horse turn into a fortress? *Curr Mol Med*, 2002. 2(8): p. 723-38.
467. Mahlkecht, U. and G. Herbein, Macrophages and T-cell apoptosis in HIV infection: a leading role for accessory cells? *Trends Immunol*, 2001. 22(5): p. 256-60.
468. Swingler, S., et al., HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat Med*, 1999. 5(9): p. 997-103.
469. Carbonneil, C., et al., Defective dendritic cell function in HIV-infected patients receiving effective highly active antiretroviral therapy: neutralization of IL-10 production and depletion of CD4+CD25+ T cells

restore high levels of HIV-specific CD4+ T cell responses induced by dendritic cells generated in the presence of IFN-alpha. *J Immunol*, 2004. 172(12): p. 7832-40.

470. Granelli-Piperno, A., et al., HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(20): p. 7669-74.

471. Gumperz, J.E. and M.B. Brenner, CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr Opin Immunol*, 2001. 13(4): p. 471-8.

472. Mitsuya, H., et al., 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. 82(20): p. 7096-100.

473. Public Health Service, Approval of AZT', News release. 1987.

474. Gao, W.Y., et al., Differential phosphorylation of azidothymidine, dideoxycytidine, and dideoxyinosine in resting and activated peripheral blood mononuclear cells. *J Clin Invest*, 1993. 91(5): p. 2326-33.

475. Hostetler, K.Y., D.A. Carson, and D.D. Richman, Phosphatidylazidothymidine. Mechanism of antiretroviral action in CEM cells. *J Biol Chem*, 1991. 266(18): p. 11714-7.

476. Merluzzi, V.J., et al., Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Science*, 1990. 250(4986): p. 1411-3.

477. Romero, D.L., et al., Nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors that potently and specifically block human immunodeficiency virus type 1 replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(19): p. 8806-10.

478. Yang, S.S., et al., Characteristics of a group of nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors with structural diversity and potent anti-

human immunodeficiency virus activity. *Leukemia*, 1995. 9 Suppl 1: p. S75-85.

479. Vacca, J.P., et al., L-735,524: an orally bioavailable human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(9): p. 4096-100.

480. Markowitz, M., et al., Selection and analysis of human immunodeficiency virus type 1 variants with increased resistance to ABT-538, a novel protease inhibitor. *J Virol*, 1995. 69(2): p. 701-6.

481. Williams, A.B., New horizons: antiretroviral therapy in 1997. *J Assoc Nurses AIDS Care*, 1997. 8(4): p. 26-38.

482. Roche. 2004.

483. Carr, A., Improvement of the study, analysis, and reporting of adverse events associated with antiretroviral therapy. *Lancet*, 2002. 360(9326): p. 81-5.

484. Drechsler, H. and W.G. Powderly, Switching effective antiretroviral therapy: a review. *Clin Infect Dis*, 2002. 35(10): p. 1219-30.

485. Hruz, P.W., H. Murata, and M. Mueckler, Adverse metabolic consequences of HIV protease inhibitor therapy: the search for a central mechanism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001. 280(4): p. E549-53.

486. Egger, M., et al., Highly active antiretroviral therapy and coronary heart disease: the need for perspective. *Aids*, 2001. 15 Suppl 5: p. S193-201.

487. Sterling, T.R., When should highly active antiretroviral therapy be initiated? *Hopkins HIV Rep*, 2001. 13(2): p. 1, 11.

488. Stone, V.E., Strategies for optimizing adherence to highly active antiretroviral therapy: lessons from research and clinical practice. *Clin Infect Dis*, 2001. 33(6): p. 865-72.

489. Bartlett, J.A., Addressing the challenges of adherence. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2002. 29 Suppl 1: p. S2-10.
490. Wild, C., et al., A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. 89(21): p. 10537-41.
491. Wild, C.T., et al., 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*, 1994. 91(21): p. 9770-4.
492. Cooley, L.A. and S.R. Lewin, HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy. *J Clin Virol*, 2003. 26(2): p. 121-32.
493. Moore, J.P. and R.W. Doms, The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(19): p. 10598-602.
494. Reeves, J.D., et al., Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(25): p. 16249-54.
495. Fumero, E. and D. Podzamczar, New patterns of HIV-1 resistance during HAART. *Clin Microbiol Infect*, 2003. 9(11): p. 1077-84.
496. Marcelin, A.G., et al., Characterization of genotypic determinants in HR-1 and HR-2 gp41 domains in individuals with persistent HIV viraemia under T-20. *Aids*, 2004. 18(9): p. 1340-2.
497. Nameki, D., et al., Mutations conferring resistance to human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitors are restricted by gp41 and Rev-responsive element functions. *J Virol*, 2005. 79(2): p. 764-70.
498. Lu, J., et al., Relative replicative fitness of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide (T-20). *J Virol*, 2004. 78(9): p. 4628-37.

499. Hartley, O., et al., Medicinal chemistry applied to a synthetic protein: development of highly potent HIV entry inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(47): p. 16460-5.
500. Tagat, J.R., et al., Piperazine-based CCR5 antagonists as HIV-1 inhibitors. IV. Discovery of 1-[(4,6-dimethyl-5-pyrimidinyl)carbonyl]-4-[4-[2-methoxy-1(R)-4-(trifluoromethyl)phenyl]ethyl-3(S)-methyl-1-piperazinyl]-4-methylpiperidine (Sch-417690/Sch-D), a potent, highly selective, and orally bioavailable CCR5 antagonist. *J Med Chem*, 2004. 47(10): p. 2405-8.
501. Reeves, J.D., et al., Impact of mutations in the coreceptor binding site on human immunodeficiency virus type 1 fusion, infection, and entry inhibitor sensitivity. *J Virol*, 2004. 78(10): p. 5476-85.
502. Mukhtar, M., Z. Parveen, and R.J. Pomerantz, Technology evaluation: PRO-542, Progenics Pharmaceuticals inc. *Curr Opin Mol Ther*, 2000. 2(6): p. 697-702.
503. Billich, A., S-1360 Shionogi-GlaxoSmithKline. *Curr Opin Investig Drugs*, 2003. 4(2): p. 206-9.
504. Procyon Biopharma. 2004. [en ligne] <http://www.procyonbiopharma.com/>(Page consultée le 15 décembre 2004)
505. Bonnenfant, S., et al., Styrylquinolines, integrase inhibitors acting prior to integration: a new mechanism of action for anti-integrase agents. *J Virol*, 2004. 78(11): p. 5728-36.
506. Fikkert, V., et al., Multiple mutations in human immunodeficiency virus-1 integrase confer resistance to the clinical trial drug S-1360. *Aids*, 2004. 18(15): p. 2019-28.
507. Boulassel, M.R., et al., Circulating levels of IL-7 but not IL-15, IGF-1, and TGF-beta are elevated during primary HIV-1 infection. *HIV Clin Trials*, 2004. 5(5): p. 357-9.

508. Llano, A., et al., Interleukin-7 in plasma correlates with CD4 T-cell depletion and may be associated with emergence of syncytium-inducing variants in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals. *J Virol*, 2001. 75(21): p. 10319-25.
509. Buonaguro, L., et al., Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *J Virol*, 1992. 66(12): p. 7159-67.
510. Kahn, J.O. and B.D. Walker, Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med*, 1998. 339(1): p. 33-9.
511. Pett, S.L. and A.D. Kelleher, Cytokine therapies in HIV-1 infection: present and future. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2003. 1(1): p. 83-96.
512. Team, T.A.C.T.G.S., 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*, 2004. 36(1): p. 576-587.
513. Jacobson, M.A., et al., A Phase I, placebo-controlled trial of multi-dose recombinant human interleukin-12 in patients with HIV infection. *Aids*, 2002. 16(8): p. 1147-54.
514. Fumero, E., F. Garcia, and J.M. Gatell, Immunosuppressive drugs as an adjuvant to HIV treatment. *J Antimicrob Chemother*, 2004. 53(3): p. 415-7.
515. Pierres, A., A.M. Benoliel, and P. Bongrand, [Adhesion molecules and cancer]. *Rev Med Interne*, 1999. 20(12): p. 1099-113.
516. Folkman, J. and A. Moscona, Role of cell shape in growth control. *Nature*, 1978. 273(5661): p. 345-9.
517. Klotz, S.A. and R.L. Smith, Glycosaminoglycans inhibit *Candida albicans* adherence to extracellular matrix proteins. *FEMS Microbiol Lett*, 1992. 78(2-3): p. 205-8.

518. Stossel, T.P., On the crawling of animal cells. *Science*, 1993. 260(5111): p. 1086-94.
519. Pauli, B.U., et al., Organ-preference of metastasis. The role of endothelial cell adhesion molecules. *Cancer Metastasis Rev*, 1990. 9(3): p. 175-89.
520. Cozens-Roberts, C., D.A. Lauffenburger, and J.A. Quinn, Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. I. Probabilistic model and analysis. *Biophys J*, 1990. 58(4): p. 841-56.
521. Hammer, D.A. and D.A. Lauffenburger, A dynamical model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces. *Biophys J*, 1987. 52(3): p. 475-87.
522. Bell, G.I., M. Dembo, and P. Bongrand, Cell adhesion. Competition between nonspecific repulsion and specific bonding. *Biophys J*, 1984. 45(6): p. 1051-64.
523. Cai, T.Q. and S.D. Wright, Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha M beta 2) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion. *J Exp Med*, 1996. 184(4): p. 1213-23.
524. Dustin, M.L. and T.A. Springer, T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature*, 1989. 341(6243): p. 619-24.
525. Ybarrondo, B., et al., Contribution of lymphocyte function-associated-1/intercellular adhesion molecule-1 binding to the adhesion/signaling cascade of cytotoxic T lymphocyte activation. *J Exp Med*, 1994. 179(1): p. 359-63.
526. Bachmann, M.F., et al., Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation. *Immunity*, 1997. 7(4): p. 549-57.

527. Abraham, C., J. Griffith, and J. Miller, The dependence for leukocyte function-associated antigen-1/ICAM-1 interactions in T cell activation cannot be overcome by expression of high density TCR ligand. *J Immunol*, 1999. 162(8): p. 4399-405.
528. Abraham, C. and J. Miller, Molecular mechanisms of IL-2 gene regulation following costimulation through LFA-1. *J Immunol*, 2001. 167(9): p. 5193-201.
529. Kandula, S. and C. Abraham, LFA-1 on CD4+ T cells is required for optimal antigen-dependent activation in vivo. *J Immunol*, 2004. 173(7): p. 4443-51.
530. Van Seventer, G.A., et al., The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol*, 1990. 144(12): p. 4579-86.
531. Hynes, R.O., Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 1987. 48(4): p. 549-54.
532. Hogg, N., The leukocyte integrins. *Immunol Today*, 1989. 10(4): p. 111-4.
533. Ruoslahti, E., Integrins. *J Clin Invest*, 1991. 87(1): p. 1-5.
534. Harris, E.S., et al., The leukocyte integrins. *J Biol Chem*, 2000. 275(31): p. 23409-12.
535. Gahmberg, C.G., M. Tolvanen, and P. Kotovuori, Leukocyte adhesion--structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands. *Eur J Biochem*, 1997. 245(2): p. 215-32.
536. Kurzinger, K., et al., A novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): cellular distribution, quantitative expression, and structure. *J Immunol*, 1981. 127(2): p. 596-602.
537. Springer, T., et al., Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol*, 1979. 9(4): p. 301-6.

- 538. Springer, T.A., L.J. Miller, and D.C. Anderson, p150,95, the third member of the Mac-1, LFA-1 human leukocyte adhesion glycoprotein family. J Immunol, 1986. 136(1): p. 240-5.**
- 539. Van der Vieren, M., et al., A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. Immunity, 1995. 3(6): p. 683-90.**
- 540. Buyn, J.P., et al., Constitutive and induced phosphorylation of the alpha- and beta-chains of the CD11/CD18 leukocyte integrin family. Relationship to adhesion-dependent functions. J Immunol, 1990. 144(1): p. 191-7.**
- 541. Vedder, N.B. and J.M. Harlan, Increased surface expression of CD11b/CD18 (Mac-1) is not required for stimulated neutrophil adherence to cultured endothelium. J Clin Invest, 1988. 81(3): p. 676-82.**
- 542. Sengelov, H., et al., Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. J Clin Invest, 1993. 92(3): p. 1467-76.**
- 543. Marlin, S.D., et al., LFA-1 immunodeficiency disease. Definition of the genetic defect and chromosomal mapping of alpha and beta subunits of the lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) by complementation in hybrid cells. J Exp Med, 1986. 164(3): p. 855-67.**
- 544. Suomalainen, H.A., et al., Genetic assignment of GP90, leukocyte adhesion glycoprotein to human chromosome 21. Somat Cell Mol Genet, 1986. 12(3): p. 297-302.**
- 545. Taylor, G.M., et al., Down's syndrome lymphoid cell lines exhibit increased adhesion due to the over-expression of lymphocyte function-associated antigen (LFA-1). Immunology, 1988. 64(3): p. 451-6.**
- 546. Ostermann, G., et al., JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. Nat Immunol, 2002. 3(2): p. 151-8.**

- 547. Dustin, M.L., et al., Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol*, 1986. 137(1): p. 245-54.**
- 548. Simmons, D., M.W. Makgoba, and B. Seed, ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature*, 1988. 331(6157): p. 624-7.**
- 549. Staunton, D.E., et al., Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*, 1988. 52(6): p. 925-33.**
- 550. Newman, P.J., et al., PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*, 1990. 247(4947): p. 1219-22.**
- 551. Trask, B., et al., Fluorescence in situ hybridization mapping of human chromosome 19: cytogenetic band location of 540 cosmids and 70 genes or DNA markers. *Genomics*, 1993. 15(1): p. 133-45.**
- 552. Roebuck, K.A. and A. Finnegan, Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol*, 1999. 66(6): p. 876-88.**
- 553. Rahman, A., et al., Protein kinase C-activated oxidant generation in endothelial cells signals intercellular adhesion molecule-1 gene transcription. *Mol Pharmacol*, 1999. 55(3): p. 575-83.**
- 554. Shrikant, P., et al., Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interferon-gamma in astrocytes. *J Neuroimmunol*, 1994. 51(2): p. 209-20.**
- 555. Tsakadze, N.L., et al., Signals mediating cleavage of intercellular adhesion molecule-1. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004. 287(1): p. C55-63.**
- 556. van de Stolpe, A. and P.T. van der Saag, Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med*, 1996. 74(1): p. 13-33.**

- 557. Staunton, D.E., et al., The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell*, 1990. 61(2): p. 243-54.**
- 558. Fisher, K.L., et al., Identification of the binding site in intercellular adhesion molecule 1 for its receptor, leukocyte function-associated antigen 1. *Mol Biol Cell*, 1997. 8(3): p. 501-15.**
- 559. D'Souza, S.E., et al., Identification of an active sequence within the first immunoglobulin domain of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) that interacts with fibrinogen. *J Biol Chem*, 1996. 271(39): p. 24270-7.**
- 560. Arefieva, T.L. and T.L. Krasnikova, Monocytic cell adhesion to intact and plasmin-modified fibrinogen: possible involvement of Mac-1 (CD11b/CD18) and ICAM-1 (CD54). *J Cell Physiol*, 2001. 188(3): p. 403-9.**
- 561. Piela-Smith, T.H., L. Aneiro, and J.H. Korn, Binding of human rhinovirus and T cells to intercellular adhesion molecule-1 on human fibroblasts. Discordance between effects of IL-1 and IFN-gamma. *J Immunol*, 1991. 147(6): p. 1831-6.**
- 562. Lineberger, D.W., et al., Domains 1 and 2 of ICAM-1 are sufficient to bind human rhinoviruses. *Virus Res*, 1992. 24(2): p. 173-86.**
- 563. Ockenhouse, C.F., et al., Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1, and human rhinovirus. *Cell*, 1992. 68(1): p. 63-9.**
- 564. Miller, J., et al., Intercellular adhesion molecule-1 dimerization and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. *J Exp Med*, 1995. 182(5): p. 1231-41.**
- 565. Reilly, P.L., et al., The native structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a dimer. Correlation with binding to LFA-1. *J Immunol*, 1995. 155(2): p. 529-32.**

566. Yang, Y., et al., Structural basis for dimerization of ICAM-1 on the cell surface. *Mol Cell*, 2004. 14(2): p. 269-76.

567. Jun, C.D., et al., Dimerization and the effectiveness of ICAM-1 in mediating LFA-1-dependent adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(12): p. 6830-5.

568. Rothlein, R., T.K. Kishimoto, and E. Mainolfi, Cross-linking of ICAM-1 induces co-signaling of an oxidative burst from mononuclear leukocytes. *J Immunol*, 1994. 152(5): p. 2488-95.

569. Etienne-Manneville, S., et al., ICAM-1-coupled cytoskeletal rearrangements and transendothelial lymphocyte migration involve intracellular calcium signaling in brain endothelial cell lines. *J Immunol*, 2000. 165(6): p. 3375-83.

570. Gardiner, E.E. and S.E. D'Souza, A mitogenic action for fibrinogen mediated through intercellular adhesion molecule-1. *J Biol Chem*, 1997. 272(24): p. 15474-80.

571. Gardiner, E.E. and S.E. D'Souza, Sequences within fibrinogen and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) modulate signals required for mitogenesis. *J Biol Chem*, 1999. 274(17): p. 11930-6.

572. Pluskota, E., Y. Chen, and S.E. D'Souza, Src homology domain 2-containing tyrosine phosphatase 2 associates with intercellular adhesion molecule 1 to regulate cell survival. *J Biol Chem*, 2000. 275(39): p. 30029-36.

573. Carpen, O., et al., Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and alpha-actinin. *J Cell Biol*, 1992. 118(5): p. 1223-34.

574. Heiska, L., et al., Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem*, 1998. 273(34): p. 21893-900.

575. Sligh, J.E., Jr., et al., Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(18): p. 8529-33.

576. Grzelewska-Rzymowska, I. and M. Pietrzakowicz, [Role of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and its soluble form (sICAM) in chronic airway inflammation]. Pol Merkuriusz Lek, 2004. 16(92): p. 179-82.

577. Witkowska, A.M. and M.H. Borawska, Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. Eur Cytokine Netw, 2004. 15(2): p. 91-8.

578. Asada, M., et al., Structural study of the sugar chains of human leukocyte cell adhesion molecules CD11/CD18. Biochemistry, 1991. 30(6): p. 1561-71.

579. Qu, A. and D.J. Leahy, Crystal structure of the I-domain from the CD11a/CD18 (LFA-1, alpha L beta 2) integrin. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(22): p. 10277-81.

580. Qu, A. and D.J. Leahy, The role of the divalent cation in the structure of the I domain from the CD11a/CD18 integrin. Structure, 1996. 4(8): p. 931-42.

581. Kamata, T., R. Wright, and Y. Takada, Critical threonine and aspartic acid residues within the I domains of beta 2 integrins for interactions with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and C3bi. J Biol Chem, 1995. 270(21): p. 12531-5.

582. McGuire, S.L. and M.L. Bajt, Distinct ligand binding sites in the I domain of integrin alpha M beta 2 that differentially affect a divalent cation-dependent conformation. J Biol Chem, 1995. 270(43): p. 25866-71.

583. Edwards, C.P., et al., Identification of amino acids in the CD11a I-domain important for binding of the leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) to intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). J Biol Chem, 1995. 270(21): p. 12635-40.

- 584. Binnerts, M.E. and Y. van Kooyk, How LFA-1 binds to different ligands. Immunol Today, 1999. 20(5): p. 240-5.**
- 585. Diamond, M.S., et al., The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. J Cell Biol, 1993. 120(4): p. 1031-43.**
- 586. Landis, R.C., R.I. Bennett, and N. Hogg, A novel LFA-1 activation epitope maps to the I domain. J Cell Biol, 1993. 120(6): p. 1519-27.**
- 587. Michishita, M., V. Videm, and M.A. Arnaout, A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. Cell, 1993. 72(6): p. 857-67.**
- 588. Randi, A.M. and N. Hogg, I domain of beta 2 integrin lymphocyte function-associated antigen-1 contains a binding site for ligand intercellular adhesion molecule-1. J Biol Chem, 1994. 269(17): p. 12395-8.**
- 589. Lu, C., et al., The binding sites for competitive antagonistic, allosteric antagonistic, and agonistic antibodies to the I domain of integrin LFA-1. J Immunol, 2004. 173(6): p. 3972-8.**
- 590. Champe, M., B.W. McIntyre, and P.W. Berman, Monoclonal antibodies that block the activity of leukocyte function-associated antigen 1 recognize three discrete epitopes in the inserted domain of CD11a. J Biol Chem, 1995. 270(3): p. 1388-94.**
- 591. Pardi, R., et al., Conserved regions in the cytoplasmic domains of the leukocyte integrin alpha L beta 2 are involved in endoplasmic reticulum retention, dimerization, and cytoskeletal association. J Immunol, 1995. 155(3): p. 1252-63.**
- 592. Peter, K. and T.E. O'Toole, Modulation of cell adhesion by changes in alpha L beta 2 (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction. J Exp Med, 1995. 181(1): p. 315-26.**

593. Springer, T.A., Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(1): p. 65-72.
594. van Kooyk, Y., S.J. van Vliet, and C.G. Figdor, The actin cytoskeleton regulates LFA-1 ligand binding through avidity rather than affinity changes. *J Biol Chem*, 1999. 274(38): p. 26869-77.
595. Rojiani, M.V., et al., In vitro interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin alpha subunits. *Biochemistry*, 1991. 30(41): p. 9859-66.
596. Coppolino, M., et al., Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *J Biol Chem*, 1995. 270(39): p. 23132-8.
597. Coppolino, M.G., et al., Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature*, 1997. 386(6627): p. 843-7.
598. Weber, C., et al., Role of alpha L beta 2 integrin avidity in transendothelial chemotaxis of mononuclear cells. *J Immunol*, 1997. 159(8): p. 3968-75.
599. Tohyama, Y., et al., The critical cytoplasmic regions of the alphaL/beta2 integrin in Rap1-induced adhesion and migration. *Mol Biol Cell*, 2003. 14(6): p. 2570-82.
600. Reedquist, K.A., et al., The small GTPase, Rap1, mediates CD31-induced integrin adhesion. *J Cell Biol*, 2000. 148(6): p. 1151-8.
601. Katagiri, K., et al., Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Mol Cell Biol*, 2000. 20(6): p. 1956-69.

602. Katagiri, K., et al., Rap1 functions as a key regulator of T-cell and antigen-presenting cell interactions and modulates T-cell responses. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(4): p. 1001-15.
603. Bajt, M.L., T. Goodman, and S.L. McGuire, Beta 2 (CD18) mutations abolish ligand recognition by I domain integrins LFA-1 (alpha L beta 2, CD11a/CD18) and MAC-1 (alpha M beta 2, CD11b/CD18). *J Biol Chem*, 1995. 270(1): p. 94-8.
604. Tuckwell, D.S. and M.J. Humphries, A structure prediction for the ligand-binding region of the integrin beta subunit: evidence for the presence of a von Willebrand factor A domain. *FEBS Lett*, 1997. 400(3): p. 297-303.
605. Goodman, T.G. and M.L. Bajt, Identifying the putative metal ion-dependent adhesion site in the beta2 (CD18) subunit required for alphaLbeta2 and alphaMbeta2 ligand interactions. *J Biol Chem*, 1996. 271(39): p. 23729-36.
606. Xiong, Y.M. and L. Zhang, Structure-function of the putative I-domain within the integrin beta 2 subunit. *J Biol Chem*, 2001. 276(22): p. 19340-9.
607. Douglass, W.A., et al., The role of the cysteine-rich region of the beta2 integrin subunit in the leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1, alphaLbeta2, CD11a/CD18) heterodimer formation and ligand binding. *FEBS Lett*, 1998. 440(3): p. 414-8.
608. Hyland, R.H., et al., Chimeras of the integrin beta subunit mid-region reveal regions required for heterodimer formation and for activation. *Cell Commun Adhes*, 2001. 8(2): p. 61-9.
609. Hibbs, M.L., et al., Regulation of adhesion of ICAM-1 by the cytoplasmic domain of LFA-1 integrin beta subunit. *Science*, 1991. 251(5001): p. 1611-3.
610. Fabbri, M., et al., A tyrosine-based sorting signal in the beta2 integrin cytoplasmic domain mediates its recycling to the plasma

membrane and is required for ligand-supported migration. *Embo J*, 1999. 18(18): p. 4915-25.

611. Sirim, P., et al., Calcium signaling through the beta 2-cytoplasmic domain of LFA-1 requires intracellular elements of the T cell receptor complex. *J Biol Chem*, 2001. 276(46): p. 42945-56.

612. Chiricolo, M., et al., Cell adhesion molecules CD11a and CD18 in blood monocytes in old age and the consequences for immunological dysfunction. Preliminary results. *Gerontology*, 1995. 41(4): p. 227-34.

613. Corbi, A.L., et al., Chromosomal location of the genes encoding the leukocyte adhesion receptors LFA-1, Mac-1 and p150,95. Identification of a gene cluster involved in cell adhesion. *J Exp Med*, 1988. 167(5): p. 1597-607.

614. Cornwell, R.D., K.A. Gollahon, and D.D. Hickstein, Description of the leukocyte function-associated antigen 1 (LFA-1 or CD11a) promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(9): p. 4221-5.

615. Nueda, A., et al., Characterization of the CD11a (alpha L, LFA-1 alpha) integrin gene promoter. *J Biol Chem*, 1993. 268(26): p. 19305-11.

616. Lopez-Rodriguez, C., et al., Identification of Sp1-binding sites in the CD11c (p150,95 alpha) and CD11a (LFA-1 alpha) integrin subunit promoters and their involvement in the tissue-specific expression of CD11c. *Eur J Immunol*, 1995. 25(12): p. 3496-503.

617. Lu, Q., et al., Effect of DNA methylation and chromatin structure on ITGAL expression. *Blood*, 2002. 99(12): p. 4503-8.

618. Lu, Q., et al., Demethylation of ITGAL (CD11a) regulatory sequences in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2002. 46(5): p. 1282-91.

619. Rosmarin, A.G., R. Levy, and D.G. Tenen, Cloning and analysis of the CD18 promoter. *Blood*, 1992. 79(10): p. 2598-604.

620. Rosmarin, A.G., et al., GABP and PU.1 compete for binding, yet cooperate to increase CD18 (beta 2 leukocyte integrin) transcription. *J Biol Chem*, 1995. 270(40): p. 23627-33.
621. Rosmarin, A.G., et al., CD18 (beta 2 leukocyte integrin) promoter requires PU.1 transcription factor for myeloid activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(3): p. 801-5.
622. Rosmarin, A.G., et al., Sp1 cooperates with the ets transcription factor, GABP, to activate the CD18 (beta2 leukocyte integrin) promoter. *J Biol Chem*, 1998. 273(21): p. 13097-103.
623. Bottinger, E.P., et al., The human beta 2 integrin CD18 promoter consists of two inverted Ets cis elements. *Mol Cell Biol*, 1994. 14(4): p. 2604-15.
624. Lee, J.O., et al., Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*, 1995. 80(4): p. 631-8.
625. Shimaoka, M., et al., Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell*, 2003. 112(1): p. 99-111.
626. Takagi, J., et al., Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*, 2002. 110(5): p. 599-11.
627. Kim, M., C.V. Carman, and T.A. Springer, Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science*, 2003. 301(5640): p. 1720-5.
628. Dustin, M.L., T.G. Bivona, and M.R. Philips, Membranes as messengers in T cell adhesion signaling. *Nat Immunol*, 2004. 5(4): p. 363-72.
629. Constantin, G., et al., Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity*, 2000. 13(6): p. 759-69.

630. Du, X.P., et al., Ligands "activate" integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa). *Cell*, 1991. 65(3): p. 409-16.
631. Kim, M., et al., The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin α L β 2. *J Cell Biol*, 2004. 167(6): p. 1241-53.
632. Emsley, J., et al., Structural basis of collagen recognition by integrin α 2 β 1. *Cell*, 2000. 101(1): p. 47-56.
633. Kucik, D.F., et al., Adhesion-activating phorbol ester increases the mobility of leukocyte integrin LFA-1 in cultured lymphocytes. *J Clin Invest*, 1996. 97(9): p. 2139-44.
634. Salas, A., et al., Rolling adhesion through an extended conformation of integrin α L β 2 and relation to α I and β I-like domain interaction. *Immunity*, 2004. 20(4): p. 393-406.
635. van Kooyk, Y., et al., Activation of LFA-1 through a Ca²⁺(+)-dependent epitope stimulates lymphocyte adhesion. *J Cell Biol*, 1991. 112(2): p. 345-54.
636. van Kooyk, Y., et al., Role of intracellular Ca²⁺ levels in the regulation of CD11a/CD18 mediated cell adhesion. *Cell Adhes Commun*, 1993. 1(1): p. 21-32.
637. van Kooyk, Y., et al., Efficiency of antibodies directed against adhesion molecules to prolong skin graft survival in mice. *Transplant Proc*, 1994. 26(2): p. 401-3.
638. van Kooyk, Y. and C.G. Figdor, Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 2000. 12(5): p. 542-7.
639. Krauss, K. and P. Altevogt, Integrin leukocyte function-associated antigen-1-mediated cell binding can be activated by clustering of membrane rafts. *J Biol Chem*, 1999. 274(52): p. 36921-7.

640. Stewart, M.P., A. McDowall, and N. Hogg, LFA-1-mediated adhesion is regulated by cytoskeletal restraint and by a Ca²⁺-dependent protease, calpain. *J Cell Biol*, 1998. 140(3): p. 699-707.
641. Yan, B., et al., Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, 2001. 276(30): p. 28164-70.
642. Erb, E.M., et al., Integrin alphaIIb beta3 reconstituted into lipid bilayers is nonclustered in its activated state but clusters after fibrinogen binding. *Biochemistry*, 1997. 36(24): p. 7395-402.
643. Tadokoro, S., et al., Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science*, 2003. 302(5642): p. 103-6.
644. Calderwood, D.A., Integrin activation. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 5): p. 657-66.
645. Lodish, *Biologie Moléculaire de la Cellule*. 3e ed. 1997: De Boeck Université.
646. Cours de virologie fondamentale (issus du cours de virologie fondamentale de l'institut Pasteur) CYTOSQUELETTE: TRANSPORT VIRAL et ALTERATIONS VIRO-INDUITES. 2003. [en ligne] <http://virologie.free.fr/02-cytosquelette/cytosquelette.htm> (Pages consultées le 7 janvier 2005)
647. Université de Bordeaux, *Biologie cellulaire*, Le cytosquelette. [en ligne] http://www.ulyse.u-bordeaux.fr/kramer1i/biocell_diffusion/gbb.cel.fa.104.b3/content/access.htm (Pages consultées le 7 janvier 2005)
648. Dufort, P.A. and C.J. Lumsden, How profilin/barbed-end synergy controls actin polymerization: a kinetic model of the ATP hydrolysis circuit. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1996. 35(4): p. 309-30.
649. Blanchoin, L., T.D. Pollard, and R.D. Mullins, Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr Biol*, 2000. 10(20): p. 1273-82.

650. Silacci, P., et al., Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci*, 2004. 61(19-20): p. 2614-23.
651. Perrin, B.J. and A. Huttenlocher, Calpain. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002. 34(7): p. 722-5.
652. Yin, H.L. and P.A. Janmey, Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu Rev Physiol*, 2003. 65: p. 761-89.
653. Bubb, M.R., et al., Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J Biol Chem*, 2000. 275(7): p. 5163-70.
654. Ritchie, K. and A. Kusumi, Role of the membrane skeleton in creation of microdomains. *Subcell Biochem*, 2004. 37: p. 233-45.
655. Fujiwara, T., et al., Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol*, 2002. 157(6): p. 1071-81.
656. Hara, T. and S.M. Fu, Human T cell activation. I. Monocyte-independent activation and proliferation induced by anti-T3 monoclonal antibodies in the presence of tumor promoter 12-o-tetradecanoyl phorbol-13 acetate. *J Exp Med*, 1985. 161(4): p. 641-56.
657. Chatila, T.A. and R.S. Geha, Phosphorylation of T cell membrane proteins by activators of protein kinase C. *J Immunol*, 1988. 140(12): p. 4308-14.
658. Chatila, T.A., R.S. Geha, and M.A. Arnaout, Constitutive and stimulus-induced phosphorylation of CD11/CD18 leukocyte adhesion molecules. *J Cell Biol*, 1989. 109(6 Pt 2): p. 3435-44.
659. Valmu, L., et al., Phosphorylation of the beta-subunit of CD11/CD18 integrins by protein kinase C correlates with leukocyte adhesion. *Eur J Immunol*, 1991. 21(11): p. 2857-62.
660. Hellberg, C., et al., The Ca²⁺ signaling capacity of the beta 2-integrin on HL60-granulocytic cells is abrogated following

phosphorylation of its CD18-chain: relation to impaired protein tyrosine phosphorylation. *Exp Cell Res*, 1995. 217(1): p. 140-8.

661. Valmu, L., et al., The cytoskeletal association of CD11/CD18 leukocyte integrins in phorbol ester-activated cells correlates with CD18 phosphorylation. *Eur J Immunol*, 1999. 29(7): p. 2107-18.

662. Fagerholm, S., et al., Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the integrin CD18 chain by protein kinase C isoforms in leukocytes. *J Biol Chem*, 2002. 277(3): p. 1728-38.

663. Garnotel, R., et al., The binding of type I collagen to lymphocyte function-associated antigen (LFA) 1 integrin triggers the respiratory burst of human polymorphonuclear neutrophils. Role of calcium signaling and tyrosine phosphorylation of LFA 1. *J Biol Chem*, 1995. 270(46): p. 27495-503.

664. Umehara, H., et al., Signal transduction via phosphorylated adhesion molecule, LFA-1 beta (CD18), is increased by culture of natural killer cells with IL-2 in the generation of lymphokine-activated killer cells. *Int Immunol*, 1993. 5(1): p. 19-27.

665. Owen, D.J. and P.R. Evans, A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science*, 1998. 282(5392): p. 1327-32.

666. Shiratori, T., et al., Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2. *Immunity*, 1997. 6(5): p. 583-9.

667. Pavalko, F.M. and S.M. LaRoche, Activation of human neutrophils induces an interaction between the integrin beta 2-subunit (CD18) and the actin binding protein alpha-actinin. *J Immunol*, 1993. 151(7): p. 3795-807.

668. Sampath, R., P.J. Gallagher, and F.M. Pavalko, Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-

dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin. *J Biol Chem*, 1998. 273(50): p. 33588-94.

669. Sharma, C.P., R.M. Ezzell, and M.A. Arnaout, Direct interaction of filamin (ABP-280) with the beta 2-integrin subunit CD18. *J Immunol*, 1995. 154(7): p. 3461-70.

670. Liu, S., D.A. Calderwood, and M.H. Ginsberg, Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci*, 2000. 113 (Pt 20): p. 3563-71.

671. Hannigan, G.E., et al., Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature*, 1996. 379(6560): p. 91-6.

672. Perez, O.D., et al., Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1. *Nat Immunol*, 2003. 4(11): p. 1083-92.

673. Schaller, M.D., et al., Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol*, 1995. 130(5): p. 1181-7.

674. Kolanus, W., et al., Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell*, 1996. 86(2): p. 233-42.

675. Geiger, C., et al., Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *Embo J*, 2000. 19(11): p. 2525-36.

676. Katagiri, K., et al., RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat Immunol*, 2003. 4(8): p. 741-8.

677. Woodside, D.G., et al., The N-terminal SH2 domains of Syk and ZAP-70 mediate phosphotyrosine-independent binding to integrin beta cytoplasmic domains. *J Biol Chem*, 2002. 277(42): p. 39401-8.

678. Liliental, J. and D.D. Chang, Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit. *J Biol Chem*, 1998. 273(4): p. 2379-83.
679. Petty, H.R., R.G. Worth, and R.F. Todd, 3rd, Interactions of integrins with their partner proteins in leukocyte membranes. *Immunol Res*, 2002. 25(1): p. 75-95.
680. Martel, V., et al., Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem*, 2001. 276(24): p. 21217-27.
681. Hemmings, L., et al., Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site. *J Cell Sci*, 1996. 109 (Pt 11): p. 2715-26.
682. Calderwood, D.A., et al., The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *J Biol Chem*, 1999. 274(40): p. 28071-4.
683. Beckerle, M.C., et al., Colocalization of calcium-dependent protease II and one of its substrates at sites of cell adhesion. *Cell*, 1987. 51(4): p. 569-77.
684. Suga, K., et al., CD98 induces LFA-1-mediated cell adhesion in lymphoid cells via activation of Rap1. *FEBS Lett*, 2001. 489(2-3): p. 249-53.
685. Sebzda, E., et al., Rap1A positively regulates T cells via integrin activation rather than inhibiting lymphocyte signaling. *Nat Immunol*, 2002. 3(3): p. 251-8.
686. Katagiri, K., M. Shimonaka, and T. Kinashi, Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C-gamma1. *J Biol Chem*, 2004. 279(12): p. 11875-81.

687. Bos, J.L., J. de Rooij, and K.A. Reedquist, Rap1 signalling: adhering to new models. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(5): p. 369-77.
688. Bivona, T.G. and M.R. Philips, Ras pathway signaling on endomembranes. *Curr Opin Cell Biol*, 2003. 15(2): p. 136-42.
689. Yamada, K.M. and S. Miyamoto, Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. 7(5): p. 681-9.
690. Dransfield, I., et al., Divalent cation regulation of the function of the leukocyte integrin LFA-1. *J Cell Biol*, 1992. 116(1): p. 219-26.
691. Stephens, P., et al., KIM127, an antibody that promotes adhesion, maps to a region of CD18 that includes cysteine-rich repeats. *Cell Adhes Commun*, 1995. 3(5): p. 375-84.
692. Ortlepp, S., et al., Antibodies that activate beta 2 integrins can generate different ligand binding states. *Eur J Immunol*, 1995. 25(3): p. 637-43.
693. Porter, J.C., et al., Signaling through integrin LFA-1 leads to filamentous actin polymerization and remodeling, resulting in enhanced T cell adhesion. *J Immunol*, 2002. 168(12): p. 6330-5.
694. Petruzzelli, L., M. Takami, and R. Herrera, Adhesion through the interaction of lymphocyte function-associated antigen-1 with intracellular adhesion molecule-1 induces tyrosine phosphorylation of p130cas and its association with c-CrkII. *J Biol Chem*, 1996. 271(13): p. 7796-801.
695. Wacholtz, M.C., S.S. Patel, and P.E. Lipsky, Leukocyte function-associated antigen 1 is an activation molecule for human T cells. *J Exp Med*, 1989. 170(2): p. 431-48.
696. Kanner, S.B., et al., Beta 2-integrin LFA-1 signaling through phospholipase C-gamma 1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(15): p. 7099-103.

697. Arroyo, A.G., et al., Induction of tyrosine phosphorylation during ICAM-3 and LFA-1-mediated intercellular adhesion, and its regulation by the CD45 tyrosine phosphatase. *J Cell Biol*, 1994. 126(5): p. 1277-86.
698. Rodriguez-Fernandez, J.L., et al., The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes. *Mol Biol Cell*, 1999. 10(6): p. 1891-907.
699. Sanchez-Martin, L., et al., Signaling through the leukocyte integrin LFA-1 in T cells induces a transient activation of Rac-1 that is regulated by Vav and PI3K/Akt-1. *J Biol Chem*, 2004. 279(16): p. 16194-205.
700. Bianchi, E., et al., Integrin LFA-1 interacts with the transcriptional co-activator JAB1 to modulate AP-1 activity. *Nature*, 2000. 404(6778): p. 617-21.
701. Shimizu, Y., LFA-1: more than just T cell Velcro. *Nat Immunol*, 2003. 4(11): p. 1052-4.
702. Kuijpers, T.W., et al., Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. *J Clin Invest*, 1997. 100(7): p. 1725-33.
703. Anderson, D.C., et al., The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis*, 1985. 152(4): p. 668-89.
704. Hogg, N., et al., A novel leukocyte adhesion deficiency caused by expressed but nonfunctional beta2 integrins Mac-1 and LFA-1. *J Clin Invest*, 1999. 103(1): p. 97-106.
705. Alon, R., et al., A novel genetic leukocyte adhesion deficiency in subsecond triggering of integrin avidity by endothelial chemokines results in impaired leukocyte arrest on vascular endothelium under shear flow. *Blood*, 2003. 101(11): p. 4437-45.

706. Kinashi, T., et al., LAD-III, a leukocyte adhesion deficiency syndrome associated with defective Rap1 activation and impaired stabilization of integrin bonds. *Blood*, 2004. 103(3): p. 1033-6.
707. Wan, M.X., et al., A statin-based inhibitor of lymphocyte function antigen-1 protects against ischemia/reperfusion-induced leukocyte adhesion in the colon. *Br J Pharmacol*, 2003. 140(2): p. 395-401.
708. Yusuf-Makagiansar, H., et al., Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. *Med Res Rev*, 2002. 22(2): p. 146-67.
709. Gauvreau, G.M., et al., The effects of an anti-CD11a mAb, efalizumab, on allergen-induced airway responses and airway inflammation in subjects with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 2003. 112(2): p. 331-8.
710. Jois, S.D. and T.J. Teruna, A peptide derived from LFA-1 protein that modulates T-cell adhesion binds to soluble ICAM-1 protein. *J Biomol Struct Dyn*, 2003. 20(5): p. 635-44.
711. Xu, C.R., et al., Structural and ICAM-1-docking properties of a cyclic peptide from the I-domain of LFA-1: an inhibitor of ICAM-1/LFA-1-mediated T-cell adhesion. *J Biomol Struct Dyn*, 2002. 19(5): p. 789-99.
712. Bechard, D., et al., Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*, 2001. 167(6): p. 3099-106.
713. Wegner, C.D., et al., Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science*, 1990. 247(4941): p. 456-9.
714. Kavanaugh, A.F., et al., Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1. *Arthritis Rheum*, 1994. 37(7): p. 992-9.
715. Vugmeyster, Y., et al., Efalizumab (anti-CD11a)-induced increase in peripheral blood leukocytes in psoriasis patients is preferentially

mediated by altered trafficking of memory CD8⁺ T cells into lesional skin. *Clin Immunol*, 2004. 113(1): p. 38-46.

716. Krueger, G.G. and C.N. Ellis, Alefacept therapy produces remission for patients with chronic plaque psoriasis. *Br J Dermatol*, 2003. 148(4): p. 784-8.

717. Lebwohl, M., et al., A novel targeted T-cell modulator, efalizumab, for plaque psoriasis. *N Engl J Med*, 2003. 349(21): p. 2004-13.

718. Woska, J.R., Jr., et al., A small-molecule antagonist of LFA-1 blocks a conformational change important for LFA-1 function. *J Leukoc Biol*, 2001. 70(2): p. 329-34.

719. Kelly, T.A., et al., Cutting edge: a small molecule antagonist of LFA-1-mediated cell adhesion. *J Immunol*, 1999. 163(10): p. 5173-7.

720. Shimaoka, M., et al., Small molecule integrin antagonists that bind to the beta2 subunit I-like domain and activate signals in one direction and block them in the other. *Immunity*, 2003. 19(3): p. 391-402.

721. Kallen, J., et al., Structural basis for LFA-1 inhibition upon lovastatin binding to the CD11a I-domain. *J Mol Biol*, 1999. 292(1): p. 1-9.

722. Weitz-Schmidt, G., et al., Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med*, 2001. 7(6): p. 687-92.

723. Steffens, C.M. and T.J. Hope, Localization of CD4 and CCR5 in living cells. *J Virol*, 2003. 77(8): p. 4985-91.

724. To, L.P., et al., Development and characterization of a whole-cell radioligand binding assay for [125I]gp120 of HIV-1. *J Immunoassay*, 1992. 13(1): p. 61-83.

- 725. Schnittman, S.M., et al., Characterization of GP120 binding to CD4 and an assay that measures ability of sera to inhibit this binding. J Immunol, 1988. 141(12): p. 4181-6.**
- 726. Staropoli, I., et al., Processing, stability, and receptor binding properties of oligomeric envelope glycoprotein from a primary HIV-1 isolate. J Biol Chem, 2000. 275(45): p. 35137-45.**
- 727. Pinter, A., et al., Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. J Virol, 1989. 63(6): p. 2674-9.**
- 728. McInerney, T.L., et al., Mutation-directed chemical cross-linking of human immunodeficiency virus type 1 gp41 oligomers. J Virol, 1998. 72(2): p. 1523-33.**
- 729. Ivey-Hoyle, M., et al., Envelope glycoproteins from biologically diverse isolates of immunodeficiency viruses have widely different affinities for CD4. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. 88(2): p. 512-6.**
- 730. Moore, J.P., et al., Virions of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates resistant to soluble CD4 (sCD4) neutralization differ in sCD4 binding and glycoprotein gp120 retention from sCD4-sensitive isolates. J Virol, 1992. 66(1): p. 235-43.**
- 731. Tominaga, Y., et al., Affinity and kinetic analysis of the molecular interaction of ICAM-1 and leukocyte function-associated antigen-1. J Immunol, 1998. 161(8): p. 4016-22.**
- 732. Foti, M., et al., p56Lck anchors CD4 to distinct microdomains on microvilli. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(4): p. 2008-13.**
- 733. Picker, L.J., et al., The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. Cell, 1991. 66(5): p. 921-33.**
- 734. Tohya, K. and M. Kimura, Ultrastructural evidence of distinctive behavior of L-selectin and LFA-1 (alphaLbeta2 integrin) on lymphocytes**

- adhering to the endothelial surface of high endothelial venules in peripheral lymph nodes. *Histochem Cell Biol*, 1998. 110(4): p. 407-16.
735. Moore, K.L., et al., P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol*, 1995. 128(4): p. 661-71.
736. Berlin, C., et al., alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell*, 1995. 80(3): p. 413-22.
737. Cuschieri, A. and S. Mughal, Surface morphology of mitogen-activated human lymphocytes and their derivatives in vitro. *J Anat*, 1985. 140 (Pt 1): p. 93-104.
738. Hashemi, B.B., et al., T cell activation responses are differentially regulated during clinorotation and in spaceflight. *Faseb J*, 1999. 13(14): p. 2071-82.
739. Majstoravich, S., et al., Lymphocyte microvilli are dynamic, actin-dependent structures that do not require Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) for their morphology. *Blood*, 2004. 104(5): p. 1396-403.
740. Ku, C.C., et al., Tropism of varicella-zoster virus for human tonsillar CD4(+) T lymphocytes that express activation, memory, and skin homing markers. *J Virol*, 2002. 76(22): p. 11425-33.
741. Dustin, M.L., The immunological synapse. *Arthritis Res*, 2002. 4 Suppl 3: p. S119-25.
742. Vicente-Manzanares, M. and F. Sanchez-Madrid, Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol*, 2004. 4(2): p. 110-22.
743. Inomata, M., et al., Involvement of calpain in integrin-mediated signal transduction. *Arch Biochem Biophys*, 1996. 328(1): p. 129-34.
744. Yonezawa, N., et al., Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *J Biol Chem*, 1990. 265(15): p. 8382-6.

745. Rhee, S.G. and Y.S. Bae, Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem*, 1997. 272(24): p. 15045-8.
746. Fernandez, R. and S.J. Suchard, Syk activation is required for spreading and H₂O₂ release in adherent human neutrophils. *J Immunol*, 1998. 160(10): p. 5154-62.
747. Yan, S.R., M. Huang, and G. Berton, Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72syk tyrosine kinase and formation of protein complexes containing p72syk and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen. *J Immunol*, 1997. 158(4): p. 1902-10.
748. Katagiri, T., et al., Protein-tyrosine kinase Pyk2 is involved in interleukin-2 production by Jurkat T cells via its tyrosine 402. *J Biol Chem*, 2000. 275(26): p. 19645-52.
749. Miura, Y., et al., Pyk2 and Syk participate in functional activation of granulocytic HL-60 cells in a different manner. *Blood*, 2000. 96(5): p. 1733-9.
750. Willeke, T., et al., A role for Syk-kinase in the control of the binding cycle of the beta2 integrins (CD11/CD18) in human polymorphonuclear neutrophils. *J Leukoc Biol*, 2003. 74(2): p. 260-9.
751. Mocsai, A., et al., Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity*, 2002. 16(4): p. 547-58.
752. Manes, S., et al., Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Rep*, 2000. 1(2): p. 190-6.
753. Hug, P., et al., Glycosphingolipids promote entry of a broad range of human immunodeficiency virus type 1 isolates into cell lines expressing CD4, CXCR4, and/or CCR5. *J Virol*, 2000. 74(14): p. 6377-85.
754. Del Real, G., et al., Blocking of HIV-1 infection by targeting CD4 to nonraft membrane domains. *J Exp Med*, 2002. 196(3): p. 293-301.

- 755. Kwik, J., et al., Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(24): p. 13964-9.**
- 756. Cabello-Agueros, J.F., E.O. Hernandez-Gonzalez, and A. Mujica, The role of F-actin cytoskeleton-associated gelsolin in the guinea pig capacitation and acrosome reaction. Cell Motil Cytoskeleton, 2003. 56(2): p. 94-108.**
- 757. Eitzen, G., Actin remodeling to facilitate membrane fusion. Biochim Biophys Acta, 2003. 1641(2-3): p. 175-81.**
- 758. Fackler, O.T., et al., Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions. Mol Cell, 1999. 3(6): p. 729-39.**
- 759. Campbell, E.M., R. Nunez, and T.J. Hope, Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. J Virol, 2004. 78(11): p. 5745-55.**
- 760. Cavrois, M., et al., HIV-1 virion fusion assay: uncoating not required and no effect of Nef on fusion. Virology, 2004. 328(1): p. 36-44.**
- 761. Margolick, J.B., et al., Amplification of HTLV-III/LAV infection by antigen-induced activation of T cells and direct suppression by virus of lymphocyte blastogenic responses. J Immunol, 1987. 138(6): p. 1719-23.**
- 762. Blanco, J., et al., Preferential attachment of HIV particles to activated and CD45RO+CD4+ T cells. AIDS Res Hum Retroviruses, 2002. 18(1): p. 27-38.**
- 763. Bounou, S., et al., The importance of virus-associated host ICAM-1 in human immunodeficiency virus type 1 dissemination depends on the cellular context. Faseb J, 2004. 18(11): p. 1294-6.**

764. van Kooyk, Y. and T.B. Geijtenbeek, A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions. *Immunol Rev*, 2002. 186: p. 47-56.
765. Barber, D.F., M. Faure, and E.O. Long, LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J Immunol*, 2004. 173(6): p. 3653-9.
766. Perez, O.D., et al., LFA-1 signaling through p44/42 is coupled to perforin degranulation in CD56+CD8+ natural killer cells. *Blood*, 2004. 104(4): p. 1083-93.
767. Chong, A.S., et al., CD54/ICAM-1 is a costimulator of NK cell-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol*, 1994. 157(1): p. 92-105.
768. Barbeau, B., et al., Modulation of human immunodeficiency virus type 1-induced syncytium formation by the conformational state of LFA-1 determined by a new luciferase-based syncytium quantitative assay. *J Virol*, 1998. 72(9): p. 7125-36.
769. Sims, T.N. and M.L. Dustin, The immunological synapse: integrins take the stage. *Immunol Rev*, 2002. 186: p. 100-17.
770. Hogg, N., et al., T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci*, 2003. 116(Pt 23): p. 4695-705.
771. Ott, M., et al., Immune hyperactivation of HIV-1-infected T cells mediated by Tat and the CD28 pathway. *Science*, 1997. 275(5305): p. 1481-5.
772. Huang, L., C.J. Li, and A.B. Pardee, Human immunodeficiency virus type 1 TAT protein activates B lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. 237(2): p. 461-4.
773. Becker, Y., HIV-1 induced AIDS is an allergy and the allergen is the Shed gp120--a review, hypothesis, and implications. *Virus Genes*, 2004. 28(3): p. 319-31.

774. Gougeon, M.L. and L. Montagnier, Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell deletion in AIDS. *Molecular control and effect of highly active anti-retroviral therapy. Ann N Y Acad Sci*, 1999. 887: p. 199-212.
775. Luo, D., et al., Involvement of LFA-1 in hepatic NK cell (pit cell)-mediated cytolysis and apoptosis of colon carcinoma cells. *J Hepatol*, 1999. 31(1): p. 110-6.
776. Ito, M., et al., Role of adhesion molecules in natural killer cell-induced DNA fragmentation of cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Viral Immunol*, 1996. 9(4): p. 219-24.
777. Owens, T., A role for adhesion molecules in contact-dependent T help for B cells. *Eur J Immunol*, 1991. 21(4): p. 979-83.
778. McLeod, S.J., et al., The Rap GTPases regulate integrin-mediated adhesion, cell spreading, actin polymerization, and Pyk2 tyrosine phosphorylation in B lymphocytes. *J Biol Chem*, 2004. 279(13): p. 12009-19.
779. Giguere, J.F. and M.J. Tremblay, Statin compounds reduce human immunodeficiency virus type 1 replication by preventing the interaction between virion-associated host intercellular adhesion molecule 1 and its natural cell surface ligand LFA-1. *J Virol*, 2004. 78(21): p. 12062-5.
780. del Real, G., et al., Statins inhibit HIV-1 infection by down-regulating Rho activity. *J Exp Med*, 2004. 200(4): p. 541-7.
781. Santé Canada, Bulletin canadien des effets indésirables Janvier 2002. 2002, Gouvernement du Canada. [en ligne] http://www.hc-sc.gc.ca/hpfb-dgpsa/tpd-dpt/adrv12n1_f.html#rhabdomyolysis_and_myopathy (Pages consultées le 31 janvier 2005)
782. Fichtenbaum, C.J., et al., Pharmacokinetic interactions between protease inhibitors and statins in HIV seronegative volunteers: ACTG Study A5047. *Aids*, 2002. 16(4): p. 569-77.

783. Welzenbach, K., U. Hommel, and G. Weitz-Schmidt, Small molecule inhibitors induce conformational changes in the I domain and the I-like domain of lymphocyte function-associated antigen-1. Molecular insights into integrin inhibition. J Biol Chem, 2002. 277(12): p. 10590-8.

Annexe A Article supplémentaire

En parallèle de mon projet principal, j'ai investigué le rôle de co-stimulation de la tétraspanine CD81 dans la transcription du VIH-1. Ces travaux ont notamment mené à un article publié dans la revue *The Journal of Virology* en avril 2005 (J Virol. 2005 Apr;79(7):4316-28).

Résumé

La protéine CD81 fait partie de la grande famille des tétraspanines. Ces dernières forment des microdomaines membranaires et recrutent des molécules d'adhésion, des récepteurs et des protéines participant à la transduction de signaux au centre de la synapse immunologique. Il a été démontré que le CD81 a la capacité de délivrer un co-signal aux lymphocytes T déclenchant la production de cytokines et la prolifération cellulaire. Puisque la transcription du VIH est intimement liée à la stimulation antigénique, la capacité du CD81 à activer la transcription du VIH a été évaluée en combinaison avec un anti-CD3. Les résultats démontrent que l'engagement du CD81 amplifie le signal orchestré par le RCT pour activer le LTR du VIH-1 dans les cellules Jurkat et les lymphocytes T CD4⁺ primaires. Ce phénomène dépend des facteurs de transcription NF- κ B, NFAT et AP-1, trois facteurs contribuant à la transcription du VIH. En conclusion, ces données confirment que l'engagement du CD81 coopère avec le RCT dans la réplication du VIH.

Tetraspanin CD81 provides a co-stimulatory signal resulting in an increased human immunodeficiency virus type 1 gene expression in primary CD4⁺ T lymphocytes through NF- κ B, NFAT and AP-1 transduction pathways

Mélanie R. Tardif and Michel J. Tremblay*

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

Running title: TCR/CD81 co-stimulation of HIV-1

*Corresponding author, mailing address:

Laboratory of Human Immuno-Retrovirology

Research Center in Infectious Diseases, RC709

CHUL Research Center

2705 Laurier Blvd., Quebec (QC), Canada, G1V 4G2

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

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

Abstract

The tetraspanin superfamily member CD81 has been shown to form microdomains in the plasma membrane and to participate in the recruitment of numerous adhesion molecules, receptors and signalling proteins in the central zone of the immune synapse. Beside its structural role, CD81 also delivers a co-signal for T cells to trigger cytokine production and cellular proliferation, thus suggesting a key role in some fundamental biological functions. It has been shown that signalling events initiated through T cell receptor (TCR)/CD3 complex and the co-activator CD28 positively affect human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) gene expression, but no study had investigated the putative co-stimulatory activity of CD81 on HIV-1 transcriptional activity. We observed that CD81 engagement potentiates TCR/CD3-mediated signal resulting in an enhancement of HIV-1 transcription and *de novo* virus production in both established Jurkat cells and primary CD4⁺ T lymphocytes in a magnitude that approximates that of CD28. These observations were made when using transiently transfected plasmids (i.e. non integrated viral DNA) and fully competent viruses (i.e. stably integrated provirus). Moreover, the CD81-mediated enhancement of HIV-1 gene expression is linked with an increased nuclear translocation of transcription factors known to positively regulate virus transcription, i.e. NF- κ B, NFAT and AP-1. These findings suggest that engagement of CD81 decreases the signalling threshold required to initiate TCR/CD3-mediated induction of integrated HIV-1 proviral DNA in primary CD4⁺ T cells.

Introduction

Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) replication can be initiated following an antigen-specific major histocompatibility complex-restricted signal through the T cell receptor (TCR)/CD3 complex (10, 42, 43). Virus transcription is further enhanced by a co-stimulatory signal usually induced by the co-engagement of CD28 (11, 42). Ligation of both TCR/CD3 and CD28 triggers multiple signalling pathways, which converge in the activation of transcription factors such as nuclear factor kappa-B (NF- κ B), nuclear factor for activated T cells (NFAT) and activator protein-1 (AP-1). While CD28 is generally considered as the primary receptor for delivering co-stimulatory signals to T lymphocytes, various studies have revealed that signalling transduction through other cell surface constituents can also cooperate with TCR/CD3-dependent biochemical to more fully activate T cells. Such alternate co-stimulatory signals could involve members of the tetraspanin super family.

Tetraspanin proteins are made of four transmembrane domains and are widely expressed on different cell types including epithelial cells and leukocytes. The tetraspanin family comprises several members including CD81, CD82, CD63, CD9 and CD151. These proteins modulate a number of biological effects such as cell-cell adhesion, proliferation and differentiation (9, 40). Although the exact mechanism by which these proteins modulate signal transduction pathways remains mostly undefined, it seems to be linked with the ability of tetraspanins to form various complexes with other membrane proteins. Indeed, tetraspanins interact with other tetraspanins and their associated partners to form a larger complex behaving as a membrane microdomain (48). Thus, the organization of multiple proteins into a network appears to be one of the main roles of the tetraspanin proteins.

CD81 is a member of the tetraspanin family that is expressed on B cells, T cells, antigen-presenting cells (APCs) and some non-lymphoid tumours (26). CD81 has been proposed to play a key role during antigenic presentation since it colocalizes with the TCR/CD3 complex in the supramolecular activation complex (30). The CD81 protein contributes to the formation of specialized micro domains in the plasma membrane, recruiting various adhesion molecules, receptors and signalling proteins to the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APCs (48). In addition, micro array analyses of the gene expression profiles of resting and activated Jurkat and human peripheral blood T cells have demonstrated that CD81 is upregulated upon T cell activation supporting the hypothesis that this tetraspanin plays a role in T cell activation (29). Although the cytoplasmic tail of CD81 lacks the common signalling motif, it provides a co-stimulatory signal in T cells that enhances INF- γ and TNF- α production and promotes thymocyte proliferation (26, 45). These properties seem to be associated with the capacity of CD81 to form complexes with cell surface proteins such as CD4, CD8 (21), β 1 integrins and other tetraspanin proteins, as well as with signalling proteins like protein kinase C and phosphatidylinositol-4-kinase (4, 19). Thus, CD81 may act as a linker protein that promotes and stabilizes the formation of signalling complexes, which are required for several biological responses.

The induction of HIV-1 transcription is tightly regulated by specific interactions of the viral transcriptional *trans* activator Tat (15, 27), but cellular transcription factors also contribute actively to provirus transactivation. They do so by binding the *cis*-acting DNA sequences in the HIV-1 long terminal repeat (LTR). One of the main mediators of the HIV-1 transcription is NF- κ B, which binds the two NF- κ B-binding motifs located in the enhancer sequence of the LTR promoter (31). The classic NF- κ B complex (p50/p65 heterodimer) is sequestered in the cytoplasm by interaction with its inhibitor (i.e. I κ B- α , β , ϵ and γ) (18). Upon cell activation, I κ B is phosphorylated, which is followed by ubiquitination and proteasome-mediated degradation allowing translocation of NF- κ B into the nucleus. The rate of viral transcription in response to T cell activation can also be modulated by other

cellular transcription factors such as NFAT (12) and AP-1 (24). The latter is composed of Jun homodimers or Jun/Fos heterodimers. NFAT acts in synergy with NF- κ B on the enhancer region of the HIV-1 LTR to positively modulate viral transcription (25). Conversely, AP-1 binds the 5' region of the LTR located upstream of the enhancer region (1). It was also shown that AP-1 can cooperate with NF- κ B to activate the HIV-1 LTR through the dual NF- κ B-binding sites (47). Whereas NFAT translocation is mainly regulated by the phosphatase calcineurin, which is itself activated upon elevation of $[Ca^{2+}]_i$ (34), AP-1 activity is regulated by c-Jun N-terminal kinase (JNK) and extracellular signal-related kinase (ERK) activation (23). Consequently, cytokines, mitogens and T cell activators triggering the activation of NF- κ B, NFAT and/or AP-1 can contribute to the HIV-1 provirus transactivation.

In this report, we demonstrate that engagement of cell surface human CD81 triggers HIV-1 replication independently of the TCR/CD3 signal in Jurkat T lymphoid cells. Moreover, CD81 and TCR/CD3 act in a concerted manner to enhance HIV-1 transcriptional activity in both Jurkat cells and purified human CD4⁺ T lymphocytes. These signalling events initiate signal transduction pathways converging toward NF- κ B, NFAT and AP-1 activation, which modulate positively HIV-1 transcription and production of progeny virus.

Materials and Methods

Cells. Jurkat cells (clone E6.1) were obtained through the AIDS Repository Reagent Program (Germantown, MD) whereas 293T cells were kindly provided by W.C. Greene (The J. Gladstone Institutes, San Francisco, CA). Human embryonic kidney 293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal calf serum (FCS), while Jurkat cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were isolated by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation, whereas CD4⁺ T cells were purified from freshly isolated PBMCs by immunomagnetic negative selection as indicated by the manufacturer (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). The purity of CD4⁺ T cells was determined by cytofluorometry analysis and was always greater than 97%. Isolated PBMCs and purified CD4⁺ T cells were cultured for two days in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FCS in the presence of phytohemagglutinin (1 µg/ml) and recombinant human interleukin-2 (IL-2) (50 U/ml).

Antibodies. The hybridoma cell line OKT3 that produces the anti-CD3ζ monoclonal antibody was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA). Purified anti-CD28 antibody (clone 9.3) was kindly provided by J.A. Ledbetter (Bristol-Myers Squibb Pharmaceutical Research Institute, Princeton, NJ). The anti-CD81 antibody (clone 5A6) was a generous gift from S. Levy (Department of Medicine, Division of Oncology, Stanford University Medical Center, Stanford, CA) and has been previously described (35). The anti-IκBα and anti-phospho-IκBα were purchased from Cell signalling (Beverly, MA), whereas the anti-actin was obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). Hybridomas that produce 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 and ATCC, respectively. Antibodies obtained from these cells were purified with the mAbTrap protein G affinity

columns according to the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

Vectors. pNL4-3 is a full length infectious molecular clone of HIV-1 while pNL4-3 Luc⁺E⁻R⁺ produces Env-deficient reporter HIV-1 particles. These vectors were provided by the AIDS Repository Reagent Program. The pHCMV-G molecular construct codes for the broad-host-range vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G under the control of human cytomegalovirus promoter. To study HIV-1 transcriptional activity in Jurkat cells, we have used the pLTRx-LUC plasmid that contains a 722-base pair fragment from HIV-1_{LAI} and the luciferase reporter gene. This plasmid was a kind gift from O. Schwartz (Unité d'oncologie virale, Institut Pasteur, France). The vector pCEP4Tat that carries the HIV-1_{SF-2} Tat gene was provided by the AIDS Repository Reagent Program. The involvement of NF-κB was studied with pLTR-Luc and pmκBLTR-Luc that were kindly given by K. Calame (Columbia University, NY). These constructs contain the luciferase reporter gene under the control of wild type and NF-κB-mutated HIV-1 HXB2 LTR. pNF-κB-LUC contains five consensus NF-κB sequences upstream of the luciferase reporter gene along with a minimal promoter (Stratagene). The induction of NFAT activity was studied with the pNFAT-LUC molecular construct that harbours the luciferase reporter gene under the control of the minimal IL-2 promoter that carries three tandem copies of the NFAT-binding site. This plasmid was generously provided by G. Crabtree (Howard Hughes Medical Institute, Stanford, CA).

Production of viral stocks. Viruses were produced by the calcium phosphate co-precipitation method in 293T cells as described previously (17). Briefly, 293T cells were transfected with pNL4-3 to produce HIV-1 particles or co-transfected with pNL4-3 Luc⁺E⁻R⁺ and pHCMV-G to obtain HIV-1-based viruses pseudotyped with VSV-G. Virus preparations were normalized for virion content by using an in-house enzymatic assay

specific for the major viral p24 protein. In this test, 183-H12-5C and 31-90-25 are used in combination to quantify p24 levels (6).

Cell transfection and stimulation. Jurkat cells were electroporated with the various vectors using a Gene Pulser apparatus (Bio-Rad) as described previously (3). Briefly, at 40 h post-transfection, cells (10^5) were plated in 96-well flat-bottom plates. In some experiments, cells were pre-treated for 45 min before stimulation with subcytostatic/subcytotoxic concentrations of calcineurin inhibitor FK506 (Sigma), proteasome inhibitor MG-132 (Sigma), MEK inhibitor PD98059 (Calbiochem), or JNK inhibitor SP600125 (Calbiochem). When indicated, cells were treated with various combinations of anti-CD3 (clone OKT3, 0.025 to 0.5 $\mu\text{g/ml}$), anti-CD28 (clone 9.3, 1 $\mu\text{g/ml}$) and anti-CD81 antibodies (clone 5A6, 2 $\mu\text{g/ml}$) followed by cross-linking with a goat anti-mouse IgG (GAM) (10 $\mu\text{g/ml}$) in a final volume of 100 μl . Stimulations were done at 37°C for the indicated times. Finally, cells were lysed and luciferase activity (as expressed in Relative Light Units-RLU) was monitored as described previously (17). To evaluate the ability of MG-132 to inhibit the proteasome activity and impair degradation of phosphorylated I κ B α , Jurkat cells were pre-treated with different concentrations of MG-132 for 30 min at 37°C. Cells were then stimulated for 0, 5, 15 and 30 min with TNF- α (20 ng/ml) at 37°C. Cells were next washed and lysed in sample buffer.

Virus infection. Jurkat cells and CD4⁺ T cells (10^7 cells) were incubated with luciferase-encoding HIV-1 pseudotyped with VSV-G (350 ng of p24) at 37°C for 48 h before treatment with the tested antibodies. Cells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in 10 ml of complete culture medium and 10^5 cells were transferred into each well of 96-well flat-bottom tissue culture plates. Next, cells infected with luciferase-encoding viruses were stimulated as described above and luciferase activity was analyzed at 8, 24, or 48 h post-treatment. To quantify viral production upon stimulation, CD4⁺ T lymphocytes were infected with fully infectious NL4-3 (10 ng of p24

per 10^5 cells) for 48 h at 37°C. After washing, 10^5 cells were plated in 96-well flat-bottom plates pre-coated with goat anti-mouse IgG (20 µg/ml), anti-CD3 (clone OKT3 at 0.5 µg/ml), anti-CD28 (clone 9.3 at 2 µg/ml) and anti-CD81 (clone 5A6 at 4 µg/ml) used either alone or in various combinations. Cell-free supernatants were harvested at 48 and 96 h post-stimulation and then frozen at -20°C until assayed for p24 contents.

FACS analysis. To monitor CD81 expression on Jurkat and PHA/IL-2-treated CD4⁺ T lymphocytes, cells were incubated with the anti-CD81 (5A6) or an isotype-matched irrelevant control antibody for 30 min at 4°C. To evaluate whether HIV-1 infection can down-regulate surface expression of CD81 on CD4⁺ T cells, cells were infected or not with NL4-3 for three days before proceeding to labelling with the anti-CD81. Cells were next washed with ice-cold PBS and then incubated with a R-phycoerythrin-conjugated goat anti-mouse secondary antibody for 30 min at 4°C. After two washes, cells were fixed in 2% paraformaldehyde and analyzed by cell sorting (Epics ELITE ESP, Coulter Electronics, Burlington, ON).

Electrophoresis and Western blotting: Samples were boiled for 7 min before being loaded onto 10% SDS-PAGE. Proteins were then transferred to Immobilon membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA). Immunoblotting was performed first with the anti-phospho-IκBα. Next, the membrane was stripped and blotted with the anti-IκBα. To measure the amount of protein loaded in the gel, membrane was stripped again and immunoblotted with an anti-actin. Proteins were detected with the enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (Pierce) followed by exposure to an X-Omat film.

Nuclear extracts and Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA). Primary CD4⁺ T lymphocytes (7×10^6) that were starved for 16 h for IL-2 were either left untreated or stimulated for 6 h at 37°C with various combinations of 5A6 (2 µg/ml), 9.3 (1 µg/ml) and

OKT3 (0.25 $\mu\text{g/ml}$) in the presence of GAM (10 $\mu\text{g/ml}$) in a final volume of 1 ml. Cells were then washed twice with ice-cold PBS and the nuclear extracts were prepared according to a previously reported protocol (3). EMSA was performed by incubating 10 μg of nuclear proteins with 20 μl of 1x binding buffer (100 mM HEPES, [pH 7.9], 40% glycerol, 10% Ficoll, 250 mM KCl, 10 mM dithiothreitol, 5 mM EDTA, 250 mM μg poly(dI-dC), NaCl, 10 μg of nuclease-free bovine serum albumin fraction V) containing 0.8 ng of γ - ^{32}P -labelled double-stranded DNA oligonucleotide for 20 min at room temperature. The enhancer region (-107/-77) from the NL4-3 strain of HIV-1 (5'-CAAGGGACTTCCGCTGGGGACTTCCAGGG-3'); the distal NFAT binding site from the murine interleukin-2 promoter (5'-TCGAGCCCAAAGAGGAAAATTTGTTTCATG-3'); the consensus NF- κ B binding site (5'-ATGTGAGGGGACTTCCAGGC-3'); the consensus AP-1 binding site (5'-CGCTTGATGACTCAGCCGGAA-3'); the consensus SP1 binding site (5'-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAG-3') and the consensus binding site for Oct-2A (5'-GGAGTATCCAGCTCCGTAGCATGCAAATCCTCTGG-3') (used as a control for non-specific competition) were utilized as probes and/or for competition assays. The DNA/protein complexes were resolved from free-labelled DNA by electrophoresis in native 4% (w/v) polyacrylamide gels. The gels were subsequently dried and exposed to an X-ray Kodak film. Cold competition assays were carried out by adding a 100-fold molar excess of unlabeled dsDNA oligonucleotide simultaneously with the labelled probe. Supershift assays were performed by pre-incubation of nuclear extracts with 1 μg of antibody against NF- κ B p50 (Santa Cruz) or NF- κ B p65 (kindly given by Nancy Rice, National Cancer Institute, Frederick, MD, USA) for 30 min on ice prior to the addition of the binding buffer containing the labelled probe. Laser densitometry was performed with an Alpha Imager 2000 digital imaging and analysis system (Alpha Innotech Corporation, San Leandro (CA), USA).

Statistical analysis. Results presented are expressed as means \pm SD of triplicate samples. Statistical significance between groups was determined by analysis of variance.

Calculations were made with Microsoft Excel. P values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

TCR/CD3-dependent induction of HIV-1 transcription of unintegrated and integrated proviral DNA is augmented upon CD81 ligation, both in the absence or presence of Tat. It was previously demonstrated that CD81 delivers a co-stimulatory signal upon engagement of the TCR/CD3 complex that results in phosphorylation of specific signalling proteins in Jurkat cells and PBMCs (39, 45). Since HIV-1 transcription is intimately linked to the cellular activation state, we monitored the impact of CD81-mediated signalling events on HIV-1 LTR transcriptional activity. To this end, Jurkat cells were first transiently transfected with pLTRx-LUC, a vector containing the luciferase gene placed under the control of the complete HIV-1 LTR region. As shown in Fig. 1A, engagement of the tetraspanin CD81 alone through the use of the monoclonal antibody 5A6 gives rise to a signalling cascade that augments weakly HIV-1 LTR activity (2.2-fold increase). Interestingly, co-engagement of CD81 and TCR/CD3 complex resulted in a higher induction of HIV-1 LTR-driven reporter gene activity. A comparable induction of virus transcription was obtained following co-engagement of TCR/CD3 and the well-known co-stimulatory molecule CD28 (i.e. OKT3/9.3 treatment). Furthermore, cross-linking of CD81 and TCR/CD3 complex in the presence of CD28 resulted in a more potent induction of HIV-1 LTR-oriented gene expression (7.3-fold increase). Given that saturating concentrations of anti-CD81 and anti-CD28 antibody were used in such studies (i.e. 2 µg/ml for 5A6 and 1 µg/ml for 9.3), it can be proposed that CD81 and CD28 use distinct signalling pathways in Jurkat cells, thus leading to an additive effect on HIV-1 transcription. Moreover, the CD81-dependent activating effect is further augmented upon the addition of a suboptimal concentration of the anti-CD3 antibody OKT3 (i.e. 0.025 µg/ml) (Fig. 1B), suggesting that engagement of CD81 reduces the activation threshold resulting in a more potent up regulation of HIV-1 LTR activity in Jurkat cells in response to anti-CD3. These findings demonstrate that CD81 efficiently enhances TCR/CD3-mediated HIV-1 LTR transcription.

HIV-1 transcription is known to be markedly enhanced by the virus-encoded transactivating Tat protein (27). We wanted to determine whether Tat could mask any co-stimulatory effect mediated by CD81 and/or modify the intracellular biochemical events associated with such a co-stimulatory molecule. To this end, a similar experimental strategy was applied except that Jurkat cells were also co-transfected with a Tat encoding vector (i.e. pCEP4-Tat). As expected, the presence of Tat leads to a significant increase in HIV-1 LTR-driven luciferase activity (i.e. 36-fold increase). More importantly, Tat further amplifies HIV-1 transcription in the presence of the different inducers tested (Fig. 1C). For example, engagement of CD81 produces a 4.1-fold increase, whereas a 20-fold increase was obtained upon co-ligation of CD81 and TCR/CD3. Co-engagement of CD81, TCR/CD3 and CD28 further enhances HIV-1 transcriptional activity (34.6-fold increase).

Integration into the host chromosome is an essential step of the HIV-1 life cycle. The provirus is coated with histones and non-histone proteins thus forming a nucleosome. The cellular factors required for transcription of integrated viral genetic material (i.e. proviral DNA) may thus differ from those required for activation of unintegrated viral DNA (i.e. transiently transfected vector) (14, 33). In order to take this fact into account, Jurkat cells were infected with reporter HIV-1 particles pseudotyped with the VSV-G envelope protein. Transcription of integrated HIV-1 is again increased by the anti-CD81 antibody 5A6 when used alone and co-ligation of CD81 and TCR/CD3 results in an additive effect (Fig. 1D). The observed up regulatory effect on transcription of integrated viral genetic material is linked with CD81-mediated signal transduction events and is not attributable to a difference in virus infectivity since pseudotyped virus can only achieve a single round of infection.

The tetraspanin CD81 cooperates with TCR/CD3 to more fully activate transcription of integrated HIV-1 and enhance the production of de novo virus particles in primary CD4⁺ T lymphocytes. To more closely approximate in vivo situations, experiments were performed also in primary CD4⁺ T lymphocytes, a cell type considered as a major target and reservoir

of HIV-1. Flow cytometric analyses revealed that high levels of CD81 are expressed on both Jurkat cells and primary CD4⁺ T lymphocytes (Fig. 2A). These primary human cells were infected with recombinant luciferase-encoding HIV-1 particles that were pseudotyped with the VSV-G envelope and were next subjected to the stimuli at 48 h post-infection. In contrast to what is seen in the established Jurkat cell line, engagement of CD81 alone is not sufficient *per se* to achieve HIV-1 transcription in CD4⁺ T cells. However, co-stimulation of CD81 and TCR/CD3 results in a greater than 10-fold increase in virus gene expression (Fig. 2B). It should be noted that co-ligation of CD81 and TCR/CD3 is a less potent activator of HIV-1 transcription in CD4⁺ T lymphocytes than co-engagement of CD28 and TCR/CD3. Moreover, engagement of CD81, CD28 and TCR/CD3 complex does not mediate a more important increase in HIV-1 transcription than co-ligation of CD28 and TCR/CD3, an observation that is different from data obtained in Jurkat cells.

The HIV-1 replicative cycle is complex and is under the influence of various viral and cellular proteins. Our next series of investigations was thus performed with fully competent viruses (i.e. the prototypic X4-utilizing virus strain NL4-3) that were used to inoculate mitogen-stimulated CD4⁺ T lymphocytes. Forty-eight hours post-infection, HIV-1-infected cells were incubated in plates coated with anti-CD81, anti-CD28 and/or anti-TCR/CD3 antibodies, alone or in various combinations. Virus release was assessed by measuring p24 levels in cell-free culture supernatants at 96 h post-treatment with the tested antibodies. Data shown in Fig. 2C indicate that co-engagement of CD81 and TCR/CD3 complex mediates a higher virus production than ligation of TCR/CD3 alone, thus confirming the co-stimulatory capacity of the tetraspanin CD81 with regard to HIV-1 biology. Surprisingly, there is no direct correlation between CD28- and TCR/CD3-mediated induction of HIV-1 transcription and virus production (compare Figs. 2B and 2C). It is noteworthy that CD81 surface expression is not affected neither in Jurkat cells nor in primary CD4⁺ T cells upon HIV-1 infection (data not shown). Our results demonstrate that CD81 provides a co-stimulatory signal comparable to the one mediated by CD28,

resulting in an augmentation of TCR/CD3-mediated HIV-1 production in primary CD4⁺ T cells.

The co-stimulating property of the tetraspanin CD81 is linked with its capacity to mediate nuclear translocation of various transcription factors that can bind to the HIV-1 enhancer region. We scrutinized the mechanism(s) through which the CD81-dependent biochemical events can amplify TCR/CD3-mediated induction of HIV-1 gene expression. In an attempt to define whether the observed up-regulating effect of CD81 on virus gene expression is due to an effect on transcription factors that can bind to the viral DNA regulatory sequences, we performed electrophoretic mobility shift assays (EMSA) with a labelled probe containing the minimal enhancer region of the HIV-1 LTR (i.e. positions -107 to -77 relative to the initiation transcription site). Nuclear extracts from primary CD4⁺ T lymphocytes co-stimulated through CD81 and TCR/CD3 complex contained more HIV-1 enhancer-bound proteins than samples subjected to ligation of TCR/CD3 alone (Fig. 3A). This is convincingly demonstrated when the intensity of the complexes is quantified with an Alpha Imager 200 digital imaging and analysis system. The specificity of the complexes was established by competition with a 100-fold excess of a specific (i.e. cold HIV-1 enhancer) or non-specific probe (i.e. Oct-2A). The intensity of the bands were comparable when using a negative internal control (i.e. SP1), thus confirming that the amount of the extracts used was the same and the observed results were specific (Fig. 3B). These data indicate that the signalling cascade triggered by CD81 when combined with TCR/CD3 ligation increase translocation of transcription factors into the nucleus that bind to the HIV-1 enhancer domain.

NF-κB is activated upon co-stimulation of CD81 and TCR/CD3 and this event strongly contributes to the enhanced HIV-1 transcription in both Jurkat cells and primary CD4⁺ T cells. NF-κB is recognized as a powerful activator of HIV-1 transcription. Therefore, we next studied the possible CD81-mediated induction of NF-κB by transient transfection of

Jurkat cells with pNF- κ B-Luc, a vector containing multiple tandem copies of NF- κ B binding sites. As depicted in Fig. 4A, treatment of these cells with the 5A6 antibody results in an activation of NF- κ B to a level comparable to TCR/CD3 engagement. This induction is further amplified upon cross-linking of CD81 and TCR/CD3. The observed CD81- and TCR/CD3-dependent induction of NF- κ B was abolished when a plasmid containing a mutated NF- κ B binding site (i.e. pLTRm κ B-Luc) was used instead (Fig. 4B). Next, Jurkat cells were inoculated with VSV-G pseudotyped HIV-1 particles and were treated with a subcytostatic/subcytotoxic dose of MG-132 (i.e. 1 and 10 μ M) before antibody-mediated engagement of the studied cell surface components. MG-132 is a proteasome inhibitor that blocks degradation of phosphorylated I κ B α and consequently inhibits NF- κ B translocation from the cytosol to the nucleus. The capacity of MG-132 to impair the degradation of phosphorylated I κ B α upon TNF- α stimulation is shown in Fig. 4C. Data from Fig. 4D confirm the importance of NF- κ B in the enhancement of transcription of integrated HIV-1 genome that is seen upon occupancy of cell surface CD81 and TCR/CD3 complex. However, experiments performed in CD4⁺ T lymphocytes revealed that, as it was the case for Jurkat cells, the CD81-triggered enhancement of TCR/CD3-dependent effect on virus transcription is not completely abrogated by MG-132 (Fig. 4E), even at the highest concentration tested (i.e. 10 μ M, data not shown). This suggests that another or other transcription factor(s) might be activated once CD81 and TCR/CD3 are occupied on the surface of primary CD4⁺ T cells. Mobility shift assays performed with a NF- κ B specific labelled probe provide additional evidence that the anti-CD3-dependent nuclear translocation of NF- κ B is augmented upon engagement of CD81 in CD4⁺ T lymphocytes (Figs. 5A). Experiments conducted with the cold NF- κ B oligonucleotides and the negative internal control SP1 (Fig. 5B) confirmed the specificity of the retarded complexes and that similar amounts of nuclear extracts were loaded. Comparable observations were made when using the labelled HIV-1 enhancer region as a probe (Fig. 5C). It should be noted that the complex specific for NF- κ B was super shifted when nuclear extracts were pretreated with a polyclonal anti-p50 or anti-p65 antibody.

Co-ligation of CD81 and TCR/CD3 complex also mediates an NFAT-dependent increase in HIV-1 transcriptional activity. Considering that NFAT represents another transcription factor known to positively affect HIV-1 LTR-driven gene expression, we assessed whether engagement of the tetraspanin CD81 can modulate NFAT activity using Jurkat cells transfected with pNFAT-LUC, a vector bearing multiple NFAT binding sites. Engagement of CD81 alone does not trigger a signal leading to NFAT activation but it strongly increases TCR/CD3-mediated nuclear translocation of NFAT (Fig. 6A). To assess the participation of NFAT in the enhanced virus transcription upon engagement of CD81 and TCR/CD3, the Jurkat cells that were inoculated with pseudotyped reporter viruses were treated with FK506 prior to stimulation. The molecular mechanism of action of FK506 has been well defined in T cells and involves inhibition of calcineurin phosphatase activity, an event that is critical for nuclear translocation of NFAT. This immunosuppressant caused a dose-dependent diminution of CD81- and TCR/CD3-mediated induction of transcription of integrated HIV-1 genome in both Jurkat (Fig. 6B) and primary CD4⁺ T cells (Fig. 6C). Our data are perfectly in line with previous work showing the cooperative effect of CD81 with TCR/CD3 in mediating an NFAT-dependent increase of cytokine production (39, 45). The capacity of the tetraspanin CD81 to enhance TCR/CD3-mediated induction of NFAT into primary CD4⁺ T cells was next tested by EMSA. Engagement of the TCR/CD3 complex leads to a weak signal specific for NFAT (Figs. 7A). However, the intensity of the migrating NFAT complex is significantly increased when CD81 is also engaged. The specificity of the signal is provided through the use of an unlabeled specific (i.e. NFAT) and non-specific probes (i.e. Oct-2A) as well as when the negative internal control SP1 (Fig. 7B).

Co-stimulating ability of CD81 that leads to increased TCR/CD3-mediated virus transcription in CD4⁺ T cells requires AP-1 stimulation via ERK1/2 and JNK. Previous studies have shown that AP-1 can positively regulate HIV-1 through the AP-1 binding sites located in the 5'-HIV-1 LTR region. It has also been reported that ERK1/2 MAPK-dependent AP-1 activation leads to the formation of AP-1/NF- κ B complexes, resulting in

an enhancement of HIV-1 transcriptional activity (47). ERK1/2 activation induces *c-fos* expression and contributes to *c-jun* gene induction, whereas phosphorylation of *c-jun*, which is required for an optimal AP-1 DNA binding activity, is mediated by JNK (22, 23). These observations when coupled with our previous findings with the NFAT multimer reporter gene that is derived from the IL-2 promoter and consists of composite NFAT/AP-1 sites (Fig. 6A) prompted us to investigate the involvement of the AP-1 transcription factor. Data illustrated in Fig. 8A demonstrate that co-ligation of CD81 and TCR/CD3 in CD4⁺ T cells results in a significant increase in the intensity of AP-1 binding complexes when compared to engagement of the TCR/CD3 complex alone, whereas the intensity of the bands remained unchanged with the negative internal control SP1 (Fig. 8B). The implication of ERK1/2 was tested by treating CD4⁺ T lymphocytes infected with pseudotyped HIV-1 reporter viruses with PD098059, an inhibitor of ERK1/2, before incubation with the tested antibodies. As shown in Fig. 8C, the ERK1/2-mediated signalling pathways are required to achieve the enhanced virus gene expression in response to co-engagement of CD81 and TCR/CD3. Comparable results were obtained when the pharmaceutical agent SP600125, which impairs the ability of JNK to phosphorylate *c-jun*, was used instead (Fig. 8D).

Discussion

There is a paucity of data concerning the ability of tetraspanin proteins to initiate and/or potentiate signal transduction events in primary T lymphocytes. It is known that CD81, CD82, CD9 and CD53 can provide a co-signal when coupled with TCR/CD3 engagement to produce increased levels of IL-2 as well as other cytokines in the established Jurkat cell line and in murine T cells (45), but the signalling pathways involved in these biological effects have not yet been fully elucidated. Moreover, no physiological ligand has so far been identified for CD81, except the hepatitis C virus (HCV) envelope protein E2 (16). Nevertheless, studies performed with antibodies specific for CD81 have clearly demonstrated the potential of this membrane protein to amplify the signalling cascades in response to TCR/CD3 engagement, in both Jurkat cells and PBMCs resulting in NFAT-dependent cytokine production. It was also reported that binding of HCV E2 protein to CD81 triggers a co-stimulatory signal for human CD4⁺ T lymphocytes through the activation of p56^{lck} (39). Since both HCV E2 and anti-CD81 antibody can deliver a co-stimulatory signal through this tetraspanin and activate CD4⁺ T cells, we were interested in studying whether engagement of CD81 can modulate HIV-1 transcription in this cell subset.

Induction of HIV-1 gene expression in CD4⁺ T lymphocytes is influenced by several stimuli. However, the exact mechanisms by which co-stimulatory molecules other than CD28 control viral transcription are poorly known. In this report, we show for the first time that the tetraspanin CD81 acts as a co-activator of HIV-1 transcription upon a concomitant ligation of TCR/CD3 complex to enhance virus gene expression in both Jurkat cells and primary CD4⁺ T cells. Our results also indicate that the CD81-directed enhancement of HIV-1 production necessitates the involvement of several cellular transcription factors.

Homotypic adhesion is one of the most apparent biological effects induced very early upon engagement of CD81 in absence of other stimulations in Jurkat and primary CD4⁺ T cells. T cell adhesion has already been proposed to provide the first signal, resulting in a lowering of the threshold required for initiation of TCR/CD3 signalling (2, 37). This phenomenon seems to be connected to a filling of the intracellular Ca²⁺ stores and to an increase of the amount of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in the plasma membrane (37, 44). The induction of an intracellular calcium flux in response to CD81 cross-linking has already been described in T cells suggesting that CD81 engagement can prime such cells for activation of certain signalling pathways (39). Interestingly, our experiments using Jurkat cells have shown that ligation of CD81 alone can activate HIV-1 transcriptional activity through NF-κB activation indicating that signalling events can occur via CD81 in CD4-expressing T lymphoid cells. Nevertheless, the engagement of CD81 alone is not sufficient by itself to induce HIV-1 transcription in primary CD4⁺ T cells. It can be proposed that variations in signal transducer(s) and/or signalling complex(es) might be responsible for the differences in CD81-mediated activation of HIV-1 transcription between primary CD4⁺ T cells and Jurkat cells. This observation is reminiscent of the reported biochemical defects in Jurkat cells. For example, Jurkat cells carry a defect in expression of the D3 phosphoinositide phosphatase, PTEN, which leads to a constitutive activation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) signalling pathway. By virtue of the cardinal role played by PI3K in several biological responses, the constitutive PI3K activation results in the presence of a number of signalling proteins recruited at the plasma membrane as well as in the persistence of ERK1/2 and JNK activation (38). Since numerous biochemical transducers are already located close to the plasma membrane waiting to transmit the signal toward the nucleus, the signal mediated through membrane receptors is faster and intensified. This might help to explain how the engagement of CD81 alone can induce HIV-1 transcription through an NF-κB-dependent pathway in Jurkat cells but not in CD4⁺ T lymphocytes that require additional signals (e.g. via TCR/CD3 complex).

An increase in TCR/CD3-dependent HIV-1 transcriptional activity is observed in Jurkat cells upon engagement of CD81. The magnitude of the co-stimulatory effect mediated by CD81 is comparable to that of CD28, a well-recognized potent co-stimulatory molecule. Moreover, the effects of both types of co-stimulation are additive, therefore suggesting that signalling events triggered by each co-activator might be different in Jurkat cells as previously proposed (45). In contrast, experiments performed in primary CD4⁺ T cells demonstrate that CD28 delivers a stronger co-signal than does CD81, when measuring induction of HIV-1 gene expression. However, production of HIV-1 particles is equally up regulated upon co-ligation of TCR/CD3 and either CD81 or CD28 in CD4⁺ T lymphocytes.

We demonstrate for the first time that occupancy of CD81 results in enhancement of NF- κ B, NFAT and AP-1 DNA-binding activities in response to TCR/CD3 stimulation in primary CD4⁺ T lymphocytes. Through the use of NF- κ B- and NFAT-regulated reporter gene constructs and specific chemical agents, we provide evidence that the co-stimulating activity of CD81 implicates degradation of I κ B α and activation of the calmodulin/calcineurin pathway. In addition, we found that co-ligation of CD81 led to an augmentation of AP-1 nuclear translocation, an event that was also accompanied by an increased phosphorylation of ERK1/2 (data not shown). These results confirm previous observations showing that the CD81-induced co-signal favours the formation of an efficient AP-1 complex, formed by *c-jun* and *c-fos*, which is regulated at least in part by ERK1/2 and JNK (23). These findings suggest that ligation of the tetraspanin CD81 might play a role in the formation and stabilization of the signalling complex which may assist TCR/CD3-mediated biochemical events in the activation of downstream transcription factors. Furthermore, we found that the CD81- and TCR/CD3-mediated increase in HIV-1 transcription was more severely decreased by the proteasome inhibitor MG-132 than the TCR/CD3-dependent virus gene expression. Since MG-132 has been also shown to activate AP-1 (32, 46), it can be postulated that the negative impact of this compound on viral transcription is partially compensated by a possible AP-1-directed up regulatory effect on HIV-1 LTR domain. As for AP-1, this transcription factor has been reported to activate

HIV-1 expression through binding sites located both in the modulatory region and the non-translated leader sequence (1, 8, 36). Moreover, it was reported that the *c-fos/c-jun* complex cooperates with NF- κ B to promote HIV-1 transcription through the NF- κ B binding region (47). While treatment of cells with an ERK1/2 (i.e. PD098059) or JNK inhibitor (i.e. SP600125) affects HIV-1 transcriptional activity in response to the co-stimulating property of CD81, the involvement of AP-1 through its own binding sites or in cooperation with NF- κ B onto HIV-1 LTR remains to be determined.

One of the unique features of the tetraspanins is their ability to form a network of multimolecular complexes, the 'tetraspanin web'. Indeed, it has been shown that these transmembrane proteins are physically associated with a wide variety of partner proteins such as signalling enzymes, several immunoglobulin super family proteins, proteoglycans, complement regulatory proteins, integrins, growth factors, growth factor receptors and even other tetraspanins (5). The various molecular interactions between tetraspanins and intracellular signalling molecules have been proposed to influence the efficiency of the signal transmitted toward the nucleus. Some members of the tetraspanin family have already been shown to activate cells by increasing tyrosine phosphorylation and cytoskeleton remodelling (13, 49). While there is little evidence indicating that CD81 can generate signalling events by itself in primary T lymphocytes, it is clear that it might favour the recruitment and formation of downstream signalling complexes. Signalling pathways activated upon engagement of the TCR/CD3 complex initiate phosphorylation of numerous tyrosine kinases, assembly of signalling complexes and a cascade of biochemical events that converge to generate cellular responses. Co-stimulation usually provides an intensification of signal transduction orchestrated by TCR/CD3 engagement but it also triggers its own signalling events to generate other responses. It can be proposed that engagement of CD81 increases and stabilizes the scaffolding of signalling complexes, a phenomenon that might extend signal transmission and promote HIV-1 production in primary CD4⁺ T lymphocytes in the absence of CD28 stimulation. This scenario is conceivable considering that the virus-encoded regulatory Nef protein has been reported to

down-regulate CD28 cell surface expression resulting in an impairment of TCR/CD28-initiated signal (41). It should be noted that surface expression of CD81 is not modulated upon HIV-1 infection of Jurkat cells and CD4⁺ T lymphocytes. The precise biochemical transducers and signal transduction pathways that are responsible for the CD81 co-stimulating property leading to induction of HIV-1 transcriptional activity remain to be elucidated.

Although we demonstrate that CD81 co-stimulation enhances virus production in cells acutely infected with HIV-1, additional studies indicate that co-engagement of CD81 and TCR/CD3 is not sufficient to drive virus production in latently infected cells. Indeed, treatment of PBMCs from three asymptomatic HIV-1-infected persons with cross-linked anti-CD3 and anti-CD81 is not promoting expression of Tat mRNA as monitored by real-time PCR (data not shown). This early-expressed viral gene was tested because it is a good indicator for latent HIV-1 reactivation (28). Our inability to drive HIV-1 gene expression in PBMCs from HIV-1-infected individuals is not surprising when one considers that activation of latent virus in primary human cells is a complex phenomenon. For example, although activation of NF- κ B is known to be critical to achieve viral reactivation, all pathways that stimulate NF- κ B do not necessarily reactivate latent virus (7). Moreover, several inducers that trigger HIV-1 reactivation from latency in T cell lines are less potent when tested in primary human T cells. This is exemplified by the previous demonstration that only 1% of resting CD4⁺ T cells containing HIV-1 DNA was induced to transcribe viral genes following activation of such cells with a stimuli that mediate global T-cell activation, i.e. PHA used in the presence of irradiated allogeneic PBMCs in culture medium supplemented with IL-2 (20).

Altogether our findings suggest that engagement of tetraspanin CD81 decreases the signalling threshold required to initiate TCR/CD3-mediated induction of HIV-1 gene expression in primary CD4⁺ T lymphocytes. The clustering of CD81 in the contact area of

the immune synapse in both T lymphocytes and APCs is in favour of this hypothesis (30). Considering that CD81 has been described as a putative receptor for HCV and HCV/HIV-1 co-infections are frequent, it can be proposed that CD4⁺ T cells acutely infected with HIV-1 might be subjected to signalling effects produced by the binding of HCV particles to the cell surface, a process leading ultimately to a diminution of the threshold necessary to achieve TCR/CD3-mediated induction of virus gene expression. Experiments are currently underway to assess this possibility.

Acknowledgements

We are grateful to S. Méthot for editorial assistance. This work has been rendered possible through the financial assistance from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) HIV/AIDS Program to M.J.T. (grant #HOP-15575). The work was performed by M.R.T. in partial fulfillment of a Ph.D. degree in the Microbiology-Immunology Program, Faculty of Medicine, Laval University. M.R.T. holds a CIHR Doctoral Award while M.J.T. is the recipient of the Canada Research Chair in Human Immuno-Retrovirology (Tier 1 level).

References

1. **Al-Harhi, L., and K. A. Roebuck.** 1998. Human immunodeficiency virus type-1 transcription: role of the 5'-untranslated leader region (review). *Int J Mol Med* 1:875-81.
2. **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* 7:549-57.
3. **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* 277:28714-24.
4. **Berditchevski, F., K. F. Toliyas, K. Wong, C. L. Carpenter, and M. E. Hemler.** 1997. A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem* 272:2595-8.
5. **Boucheix, C., and E. Rubinstein.** 2001. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci* 58:1189-205.
6. **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.
7. **Brooks, D. G., P. A. Arlen, L. Gao, C. M. Kitchen, and J. A. Zack.** 2003. Identification of T cell-signaling pathways that stimulate latent HIV in primary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:12955-60.
8. **Canonne-Hergaux, F., D. Aunis, and E. Schaeffer.** 1995. Interactions of the transcription factor AP-1 with the long terminal repeat of different human immunodeficiency virus type 1 strains in Jurkat, glial, and neuronal cells. *J Virol* 69:6634-42.

9. **Charrin, S., S. Manie, M. Billard, L. Ashman, D. Gerlier, C. Boucheix, and E. Rubinstein.** 2003. Multiple levels of interactions within the tetraspanin web. *Biochem Biophys Res Commun* 304:107-12.
10. **Copeland, K. F., and J. L. Heeney.** 1996. T helper cell activation and human retroviral pathogenesis. *Microbiol Rev* 60:722-42.
11. **Copeland, K. F., P. J. Hendrikx, A. G. Haaksma, S. Fiering, R. Van Lier, J. Goudsmit, and J. L. Heeney.** 1995. Comparison of the response to T-cell activation by integrated HIV-1 and HTLV-1 LTR-lacZ vectors. *Virology* 209:633-6.
12. **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* 94:179-91.
13. **Delaguillaumie, A., C. Lagaudriere-Gesbert, M. R. Popoff, and H. Conjeaud.** 2002. Rho GTPases link cytoskeletal rearrangements and activation processes induced via the tetraspanin CD82 in T lymphocytes. *J Cell Sci* 115:433-43.
14. **El Kharroubi, A., G. Piras, R. Zensen, and M. A. Martin.** 1998. Transcriptional activation of the integrated chromatin-associated human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol Cell Biol* 18:2535-44.
15. **Emerman, M., and M. H. Malim.** 1998. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 280:1880-4.
16. **Flint, M., C. Maidens, L. D. Loomis-Price, C. Shotton, J. Dubuisson, P. Monk, A. Higginbottom, S. Levy, and J. A. McKeating.** 1999. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 73:6235-44.
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. **Ghosh, S., and M. Karin.** 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl:S81-96.
19. **Hemler, M. E.** 1998. Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 10:578-85.
20. **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* 77:7383-92.
21. **Imai, T., M. Kakizaki, M. Nishimura, and O. Yoshie.** 1995. Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82. *J Immunol* 155:1229-39.
22. **Karin, M.** 1998. Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses. *Ann N Y Acad Sci* 851:139-46.
23. **Karin, M.** 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 270:16483-6.
24. **Kingsman, S. M., and A. J. Kingsman.** 1996. The regulation of human immunodeficiency virus type-1 gene expression. *Eur J Biochem* 240:491-507.
25. **Kinoshita, S., L. Su, M. Amano, L. A. Timmerman, H. Kaneshima, and G. P. Nolan.** 1997. The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells. *Immunity* 6:235-44.
26. **Levy, S., S. C. Todd, and H. T. Maecker.** 1998. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 16:89-109.
27. **Liang, C., and M. A. Wainberg.** 2002. The role of Tat in HIV-1 replication: an activator and/or a suppressor? *AIDS Rev* 4:41-9.

28. **Lin, X., D. Irwin, S. Kanazawa, L. Huang, J. Romeo, T. S. Yen, and B. M. Peterlin.** 2003. Transcriptional profiles of latent human immunodeficiency virus in infected individuals: effects of Tat on the host and reservoir. *J Virol* 77:8227-36.
29. **Lin, Z., G. C. Fillmore, T. H. Um, K. S. Elenitoba-Johnson, and M. S. Lim.** 2003. Comparative microarray analysis of gene expression during activation of human peripheral blood T cells and leukemic Jurkat T cells. *Lab Invest* 83:765-76.
30. **Mittelbrunn, M., M. Yanez-Mo, D. Sancho, A. Ursa, and F. Sanchez-Madrid.** 2002. Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. *J Immunol* 169:6691-5.
31. **Nabel, G., and D. Baltimore.** 1987. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* 326:711-3.
32. **Nakayama, K., A. Furusu, Q. Xu, T. Konta, and M. Kitamura.** 2001. Unexpected transcriptional induction of monocyte chemoattractant protein 1 by proteasome inhibition: involvement of the c-Jun N-terminal kinase-activator protein 1 pathway. *J Immunol* 167:1145-50.
33. **Okada, M., and K. T. Jeang.** 2002. Differential requirements for activation of integrated and transiently transfected human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* 76:12564-73.
34. **Okamura, H., J. Aramburu, C. Garcia-Rodriguez, J. P. Viola, A. Raghavan, M. Tahiriani, X. Zhang, J. Qin, P. G. Hogan, and A. Rao.** 2000. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell* 6:539-50.
35. **Oren, R., S. Takahashi, C. Doss, R. Levy, and S. Levy.** 1990. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol* 10:4007-15.

36. **Rabbi, M. F., M. Saifuddin, D. S. Gu, M. F. Kagnoff, and K. A. Roebuck.** 1997. U5 region of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat contains TRE-like cAMP-responsive elements that bind both AP-1 and CREB/ATF proteins. *Virology* 233:235-45.
37. **Randriamampita, C., G. Boulla, P. Revy, F. Lemaitre, and A. Trautmann.** 2003. T cell adhesion lowers the threshold for antigen detection. *Eur J Immunol* 33:1215-23.
38. **Seminario, M. C., and R. L. Wange.** 2003. Lipid phosphatases in the regulation of T cell activation: living up to their PTEN-tial. *Immunol Rev* 192:80-97.
39. **Soldaini, E., A. Wack, U. D'Oro, S. Nuti, C. Olivieri, C. T. Baldari, and S. Abrignani.** 2003. T cell costimulation by the hepatitis C virus envelope protein E2 binding to CD81 is mediated by Lck. *Eur J Immunol* 33:455-64.
40. **Stipp, C. S., T. V. Kolesnikova, and M. E. Hemler.** 2003. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci* 28:106-12.
41. **Swigut, T., N. Shohdy, and J. Skowronski.** 2001. Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *Embo J* 20:1593-604.
42. **Tong-Starkesen, S. E., P. A. Luciw, and B. M. Peterlin.** 1989. Signaling through T lymphocyte surface proteins, TCR/CD3 and CD28, activates the HIV-1 long terminal repeat. *J Immunol* 142:702-7.
43. **Tsunetsugu-Yokota, Y., T. Kato, S. Yasuda, Z. Matsuda, Y. Suzuki, Y. Koyanagi, N. Yamamoto, K. Akagawa, M. W. Cho, and T. Takemori.** 2000. Transcriptional regulation of HIV-1 LTR during antigen-dependent activation of primary T cells by dendritic cells. *J Leukoc Biol* 67:432-40.
44. **Van Seventer, G. A., E. Bonvini, H. Yamada, A. Conti, S. Stringfellow, C. H. June, and S. Shaw.** 1992. Costimulation of T cell receptor/CD3-mediated activation of resting human CD4⁺ T cells by leukocyte function-associated antigen-1 ligand intercellular

cell adhesion molecule-1 involves prolonged inositol phospholipid hydrolysis and sustained increase of intracellular Ca²⁺ levels. *J Immunol* 149:3872-80.

45. **Witherden, D. A., R. Boismenu, and W. L. Havran.** 2000. CD81 and CD28 costimulate T cells through distinct pathways. *J Immunol* 165:1902-9.

46. **Wu, H. M., K. H. Chi, and W. W. Lin.** 2002. Proteasome inhibitors stimulate activator protein-1 pathway via reactive oxygen species production. *FEBS Lett* 526:101-5.

47. **Yang, X., Y. Chen, and D. Gabuzda.** 1999. ERK MAP kinase links cytokine signals to activation of latent HIV-1 infection by stimulating a cooperative interaction of AP-1 and NF-kappaB. *J Biol Chem* 274:27981-8.

48. **Yunta, M., and P. A. Lazo.** 2003. Tetraspanin proteins as organisers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal* 15:559-64.

49. **Yunta, M., J. L. Oliva, R. Barcia, V. Horejsi, P. Angelisova, and P. A. Lazo.** 2002. Transient activation of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) activity by ligation of the tetraspan CD53 antigen in different cell types. *Eur J Biochem* 269:1012-21.

Figure legends

Figure 1. The tetraspanin CD81 cooperates with TCR/CD3 to enhance HIV-1 transcriptional activity in Jurkat cells. Jurkat cells transiently transfected with pLTRx-LUC (panels A and B), cotransfected with pLTRx-LUC and pCEP4-Tat (panel C), or infected with reporter HIV-1 virus pseudotyped with VSV-G (panel D) were either left untreated or incubated for 8 (panels A, B and C) or 24 h (panel D) with the indicated cross-linked antibodies in various combinations (5A6 at 2 $\mu\text{g/ml}$; OKT3 at 0.25 $\mu\text{g/ml}$; and 9.3 at 1 $\mu\text{g/ml}$). Cells were next lysed to assess HIV-1 LTR-encoded reporter gene activity. Results are shown as fold increase over samples treated with GAM (used as negative controls) and are calculated from the mean \pm S.D. of three different lysed cell samples in the same experimental setting. The mean luciferase counts of control cells were 2.2 RLU in panel A, 10.5 RLU in panel B, 80.5 RLU in panel C and 3.4 RLU in panel D. Results are representative of three independent experiments. The asterisks indicate significant differences between cells stimulated with OKT3/5A6, OKT3/9.3, or OKT3/9.3/5A6 and cells treated with OKT3 alone (* $P < 0.05$, ** $P < 0.02$).

Figure 2. CD81 acts as a costimulatory molecule to enhance TCR/CD3-mediated induction of HIV-1 transcription and virus production in primary CD4⁺ T lymphocytes. A) Flow cytometric analyses of CD81 surface expression on Jurkat cells and purified CD4⁺ T lymphocytes after staining with an isotype-matched control antibody (dotted lines) or the anti-CD81 5A6 antibody (continuous lines). Primary CD4⁺ T cells were inoculated with VSV-G pseudotyped reporter viruses and were either left untreated or treated for 48 h with cross-linked 5A6 (2 $\mu\text{g/ml}$), OKT3 (0.25 $\mu\text{g/ml}$) and/or 9.3 (1 $\mu\text{g/ml}$). Cells were next lysed to assess HIV-1 LTR-encoded reporter gene activity. The mean luciferase activity in control cells was 10 RLU. B) CD4⁺ T lymphocytes were infected with fully competent HIV-1 viruses (i.e. NL4-3 strain) and were either left untreated or treated with the listed cross-linked antibodies. Cell-free supernatants were harvested 96 h post-stimulation and

p24 contents were measured through an enzymatic assay. Results are calculated from the mean \pm S.D. of three different cell samples in the same experimental setting. Results are representative of three independent experiments. The asterisks indicate significant differences between cells stimulated with OKT3/5A6, OKT3/9.3, or OKT3/9.3/5A6 and cells treated with OKT3 only (*P < 0.05, ** P < 0.01).

Figure 3. CD81-mediated costimulatory capacity enhances nuclear translocation of transcription factors that can bind to the HIV-1 enhancer region. Primary CD4⁺ T lymphocytes were incubated for 6 h either with goat anti-mouse IgG (used as a negative control-Ctrl) or the indicated antibodies (5A6 at 2 μ g/ml; OKT3 at 0.25 μ g/ml) before nuclear extraction. Nuclear proteins were then incubated with a labelled HIV-1 enhancer probe (A) or the labelled negative internal control SP1 (B) and the complexes were resolved on a native 4% acrylamide gel. The specificity of the migrating complexes was verified by competition with a specific (i.e. HIV-1 enhancer-Cold probe) or non-specific probe (i.e. Oct-2A probe). The intensity of the bands was quantified with an Alpha Imager 2000 digital imaging and analysis system. Results are representative of three independent experiments. The arrows on the left side indicate the specific migrating complexes.

Figure 4. CD81-directed costimulatory signal leads to an augmented induction of NF- κ B resulting in increased HIV-1 transcription in Jurkat and CD4⁺ T cells. Jurkat cells were transiently transfected with pNF- κ B-LUC (panel A) or transfected with pLTR-LUC or pm κ B-LTR-LUC (panel B). In panel C, untreated or MG-132-treated Jurkat cells were stimulated for indicated time periods with TNF- α (20 ng/ml) and then lysed in sample buffer. Samples were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with indicated antibodies. In some instances, Jurkat cells (panel D) and primary CD4⁺ T lymphocytes (panel E) were used as targets for pseudotyped reporter HIV-1 particles. For Jurkat and CD4⁺ T cells inoculated with reporter HIV-1 particles pseudotyped with VSV-G envelope proteins, cells were either left untreated or were pre-treated for 1 h with the proteasome

inhibitor MG-132 at the indicated concentrations. Next, cells were either left untreated or were treated for 8 (panels A, B and D) or 24 h (panel E) with the listed cross-linked antibodies (5A6 at 2 $\mu\text{g/ml}$; OKT3 at 0.25 $\mu\text{g/ml}$; and/or 9.3 at 1 $\mu\text{g/ml}$). Finally, cells were lysed to assess HIV-1 LTR-encoded reporter gene activity. Results are shown as fold increase over samples treated with GAM (used as negative controls) and are calculated from the mean \pm S.D. of three different lysed cell samples in the same experimental setting. The mean luciferase counts of control cells were 13 RLU in panel A, 19 (LTR-Luc) and 2.2 RLU (m κ BLTR-Luc) in panel B, 61 (w/o MG-132) and 223 RLU (1 μM MG-132) in panel D and 10 (w/o MG-132), 10.7 (0,1 μM MG-132) and 4.3 RLU (1 μM MG-132) in panel E. Results are representative of three independent experiments. The asterisks indicate significant differences between cells treated with MG-132 and untreated cells (* $p < 0.05$).

Figure 5. Nuclear translocation of NF- κ B is augmented upon co-ligation of CD81 and OKT3/CD3 complex in primary CD4⁺ T lymphocytes. Primary CD4⁺ T lymphocytes were incubated for 6 h either with GAM (used as a negative control-Ctrl) or the indicated antibodies before nuclear extraction (5A6 at 2 $\mu\text{g/ml}$; OKT3 at 0.25 $\mu\text{g/ml}$). Nuclear proteins were then incubated with a labelled NF- κ B specific probe (A) or the labelled negative internal control SP1 (B) and the complexes were resolved on a native 4% acrylamide gel. The intensity of the bands was quantified with an Alpha Imager 2000 digital imaging and analysis system. (C) The labelled HIV-1 enhancer region was also used as a probe and the resolved complexes were super shifted with anti-p50 or anti-p65 antibodies. The specificity of the migrating complexes was verified by competition with a specific (i.e. NF- κ B specific for panel A or HIV-1 enhancer for panel C) or non-specific probe (i.e. Oct-2A). Results are representative of three independent experiments. Arrows indicate the antibody-mediated migrating and super shifted complexes.

Figure 6. The co-signal provided by CD81 further enhances TCR/CD3-mediated induction of NFAT, an event that leads to increased HIV-1 transcription in Jurkat and primary CD4⁺

T cells. Jurkat cells were transiently transfected with pNFAT-LUC (panel A) or infected with VSV-G pseudotyped reporter virus (panel B). In some experiments, primary CD4⁺ T lymphocytes were used as targets for pseudotyped reporter HIV-1 particles (panel C). For Jurkat and CD4⁺ T cells inoculated with reporter HIV-1 particles pseudotyped with VSV-G envelope proteins, cells were either left untreated or were pre-treated for 1 h with FK506 at the indicated concentrations. Next, cells were either left untreated or were treated for 8 (panels A and B) or 24 h (panel C) with the indicated cross-linked antibodies (5A6 at 2 µg/ml; OKT3 at 0.25 µg/ml; and/or 9.3 at 1 µg/ml). Finally, cells were lysed to assess HIV-1 LTR-encoded reporter gene activity. Results are shown as fold increase over samples treated with goat-anti-mouse IgG (used as negative controls) and are calculated from the mean ± S.D. of three different lysed cell samples in the same experimental setting. The mean luciferase counts of control cells were 0.5 RLU in panel A, 7.5 (w/o and 0.2 ng/ml FK506) and 7.9 RLU (2 ng/ml FK506) in panel B, and 10 (w/o and 0.2 ng/ml FK506) and 9 RLU (2 ng/ml FK506) in panel C. Results are representative of three independent experiments. The asterisks indicate significant differences between cells treated with FK506 and untreated cells (*p < 0.05, ** p < 0.005).

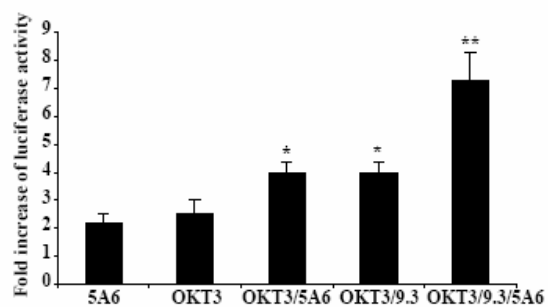
Figure 7. CD81 cooperates with TCR/CD3 to increase NFAT nuclear translocation where it can bind to the HIV-1 enhancer region. Primary CD4⁺ T lymphocytes were incubated for 6 h either with GAM (used as a negative control-Ctrl) or the indicated antibodies before nuclear extraction (5A6 at 2 µg/ml; OKT3 at 0.25 µg/ml). Nuclear proteins were then incubated with a labelled NFAT specific probe (A) or the labelled negative internal control SP1 (B) and the complexes were resolved on a native 4% acrylamide gel. The intensity of the bands was quantified with an Alpha Imager 2000 digital imaging and analysis system. Results are representative of three independent experiments.

Figure 8. Co-engagement of CD81 and TCR/CD3 leads to increased AP-1 DNA-binding activity and HIV-1 transcription in CD4⁺ T cells through ERK1/2- and JNK-dependent

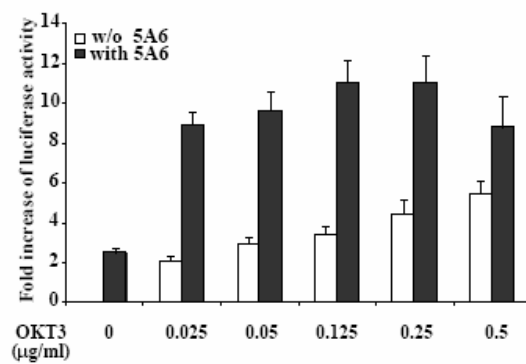
pathways. Primary CD4⁺ T lymphocytes were incubated for 6 h either with GAM (used as a negative control-Ctrl) or the indicated cross-linked antibodies before nuclear extraction (5A6 at 2 µg/ml; OKT3 at 0.25 µg/ml). Nuclear proteins were then incubated with a labelled specific AP-1 probe (A) or the labelled negative internal control SP1 (B) and the complexes were resolved on a native 4% acrylamide gel. The arrow indicates the antibody-mediated migrating complexes. The intensity of the bands was quantified with an Alpha Imager 2000 digital imaging and analysis system. The specificity of the migrating complexes was verified by competition with a specific (i.e. AP-1 specific) or non-specific probe (i.e. Oct-2A). Results are representative of two independent experiments. In some experiments, primary CD4⁺ T cells were infected with VSV-G pseudotyped reporter virus and were either left untreated or pre-treated for 1 h with the ERK inhibitor PD098059 (40 µM) (panel C) or the JNK inhibitor SP600125 (40 µM) (panel D). Next, cells were either left untreated or were treated for 24 h with the listed cross-linked antibodies (5A6 at 2 µg/ml; OKT3 at 0.25 µg/ml; and/or 9.3 at 1 µg/ml). Finally, cells were lysed to assess HIV-1 LTR-encoded reporter gene activity. Results are shown as fold increase over samples treated with GAM (used as negative controls) and are calculated from the mean ± S.D. of three different lysed cell samples in the same experimental setting. The mean luciferase activity in control cells was 1.2 RLU for untreated cells, 1.3 RLU in PD098059-treated cells and 0.6 RLU in SP600125-treated cells. Results are representative of three independent experiments. The asterisks indicate significant differences between cells treated with FK506 or SP600125 and untreated cells (*P < 0.05, ** P < 0.02).

Figure 1

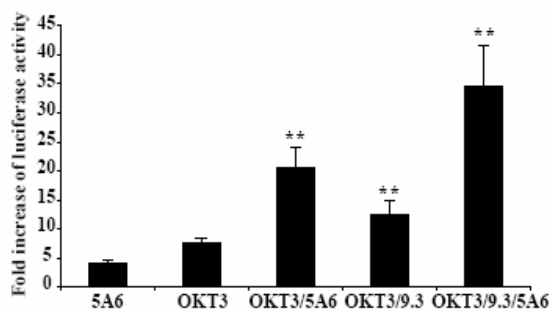
A



B



C



D

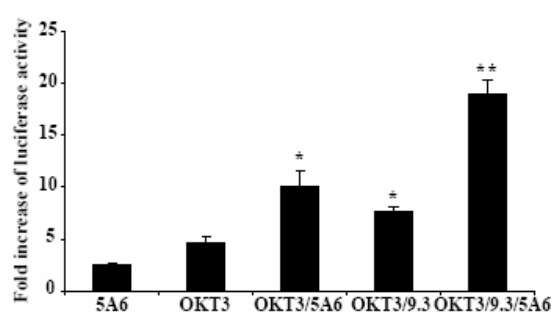


Figure 2

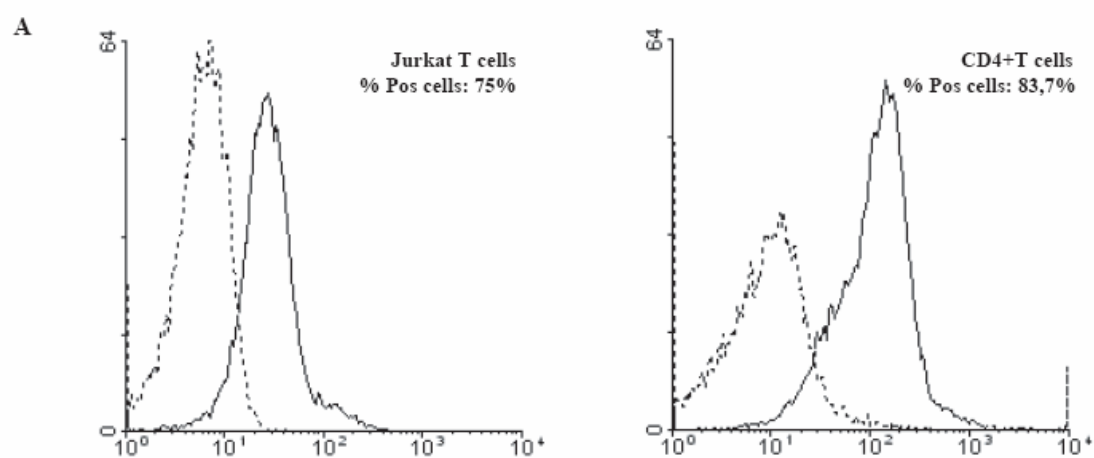
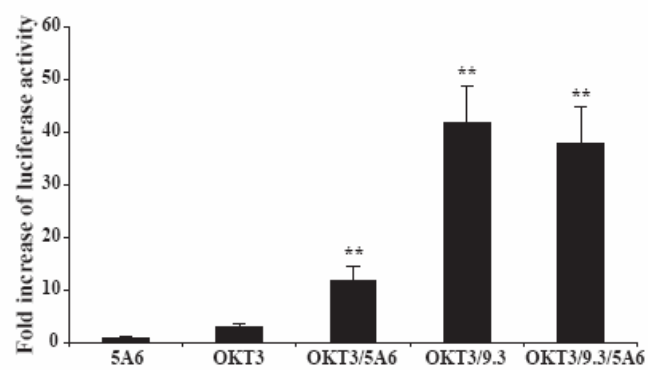
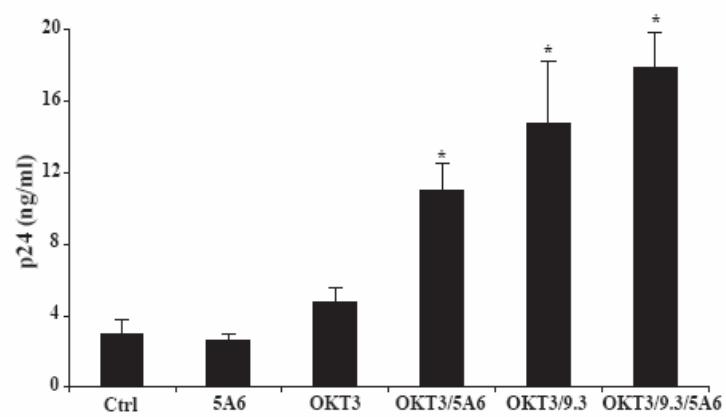
**B****C**

Figure 3

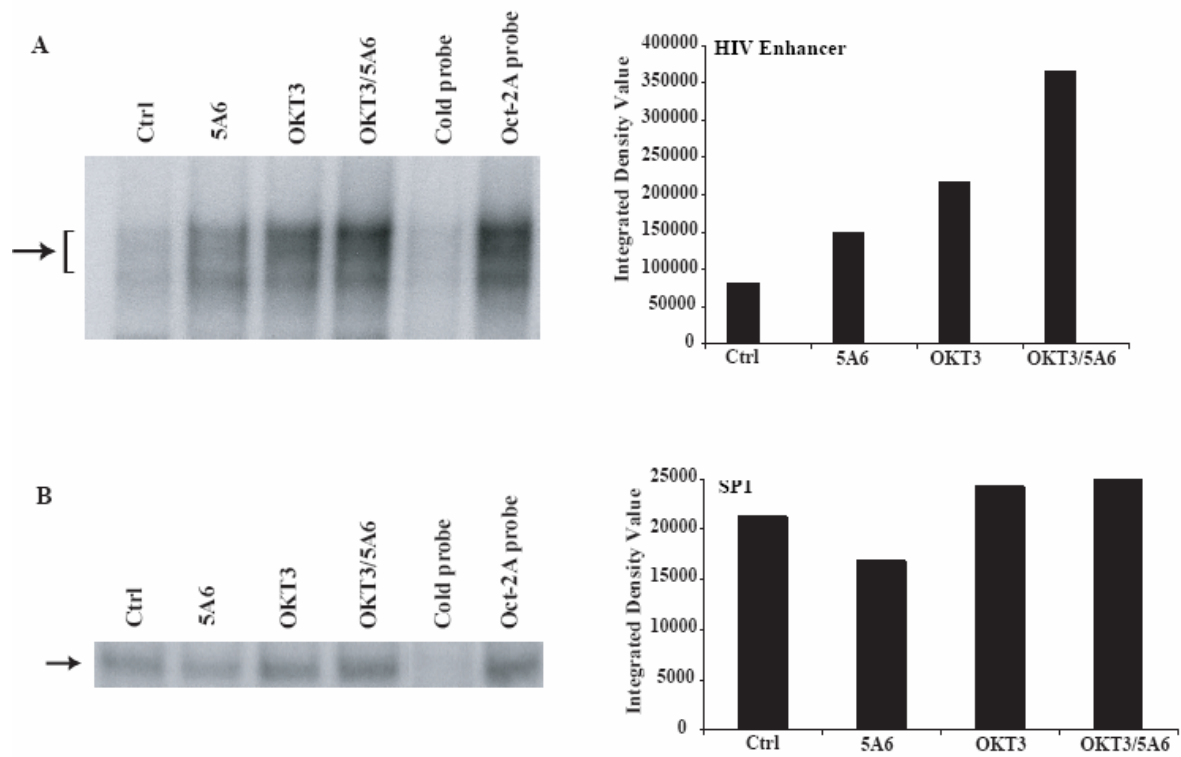


Figure 4

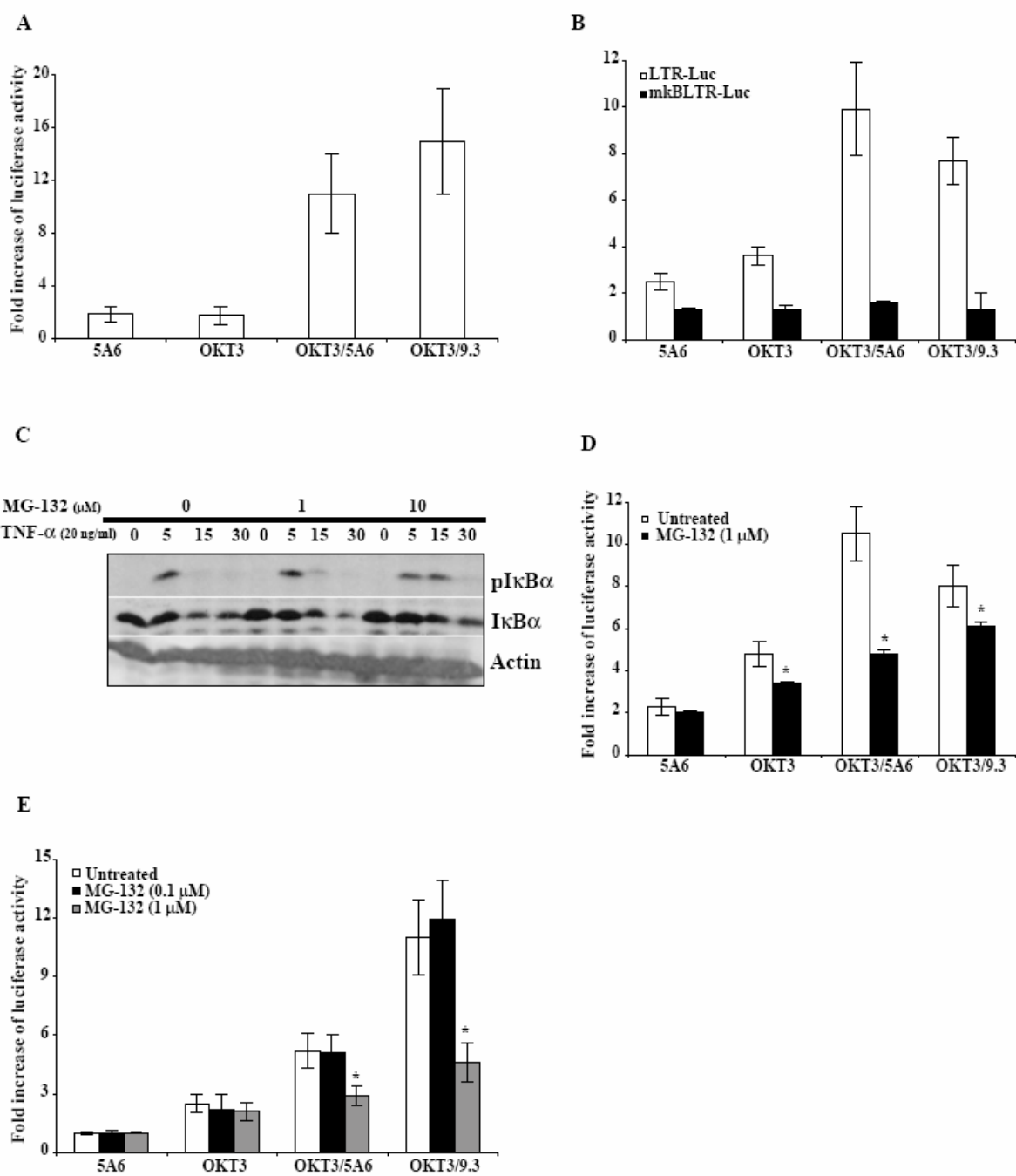


Figure 5

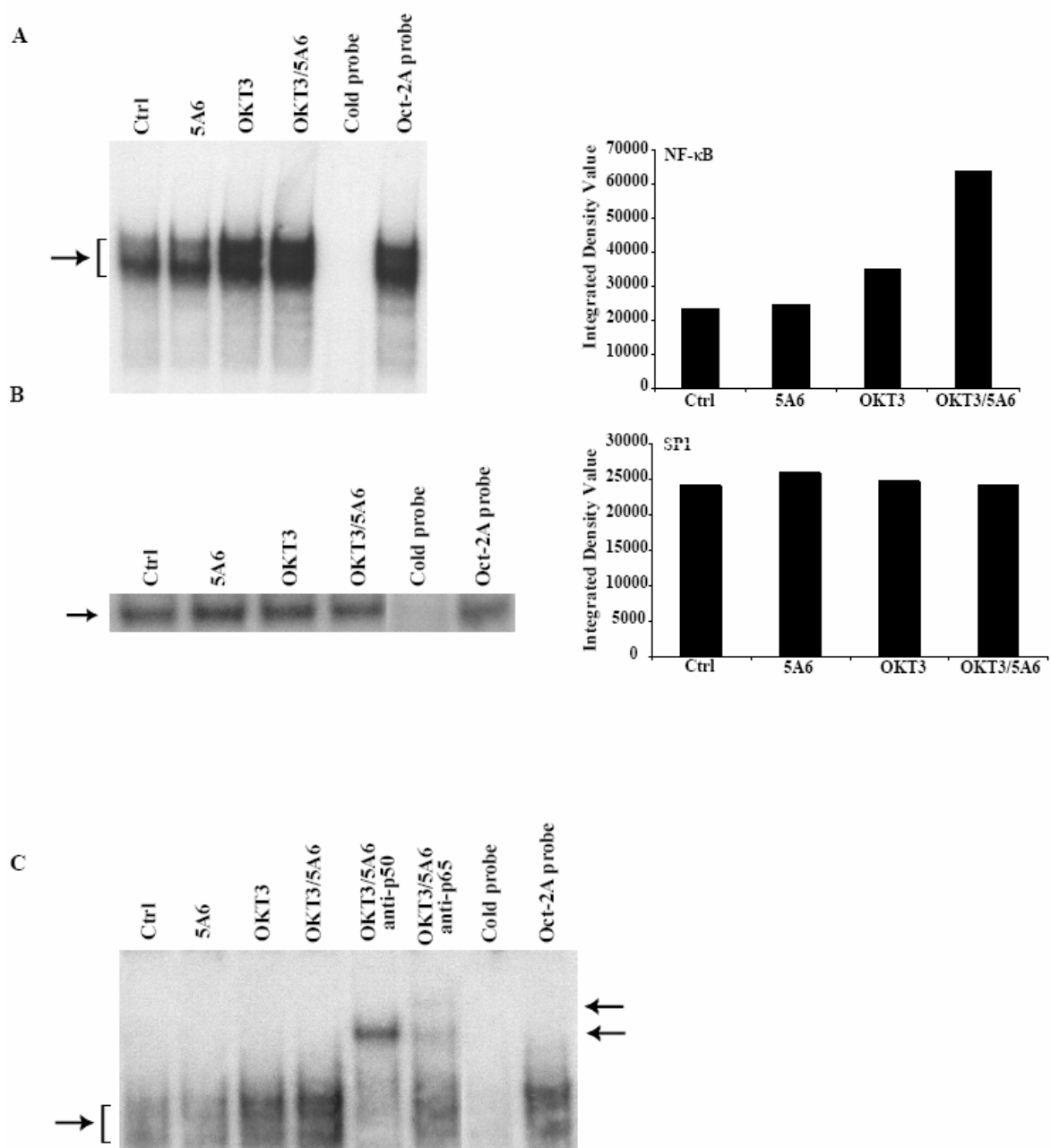
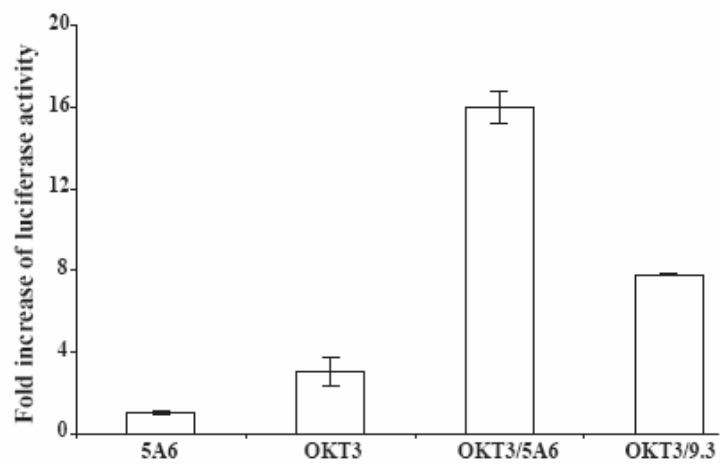
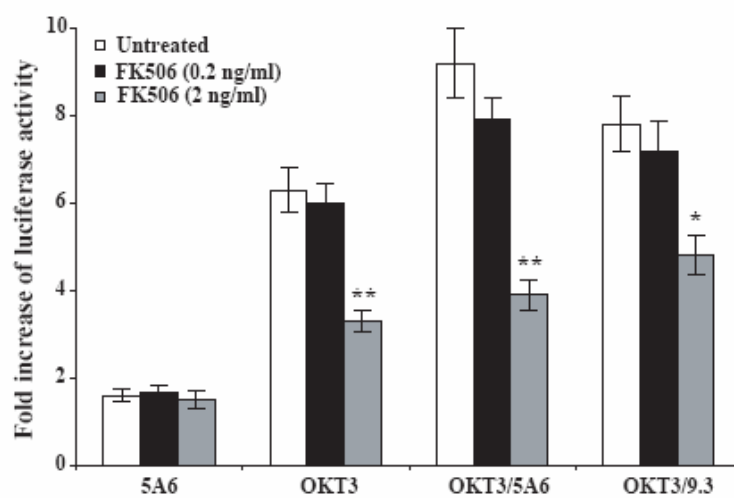


Figure 6

A



B



C

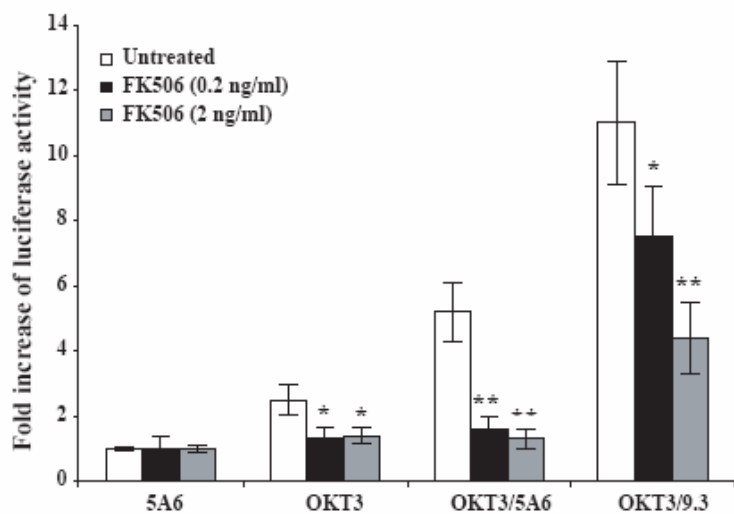
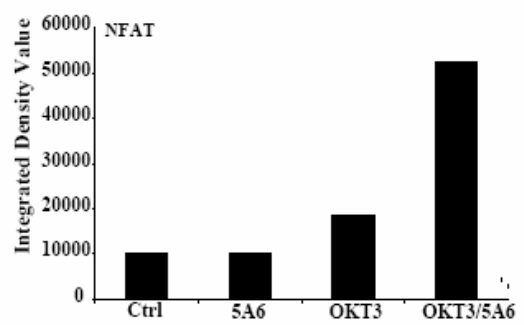
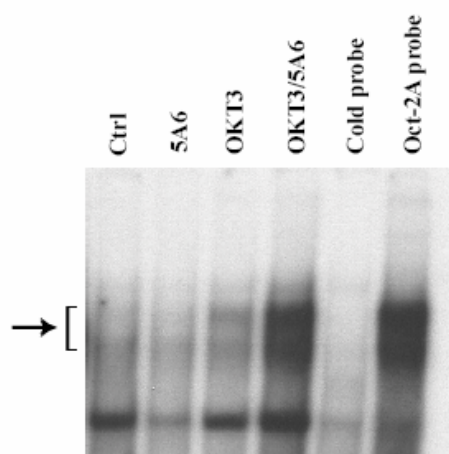


Figure 7

A



B

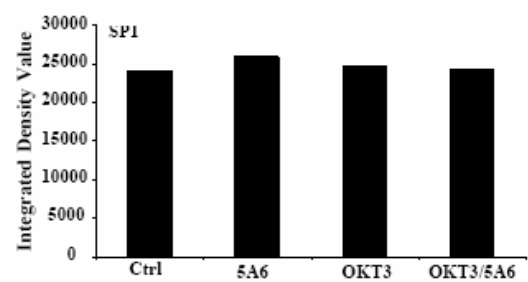
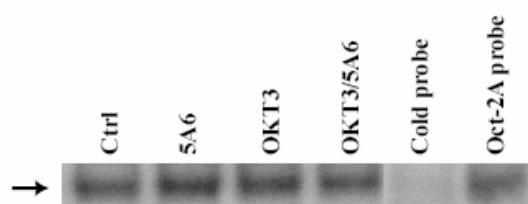
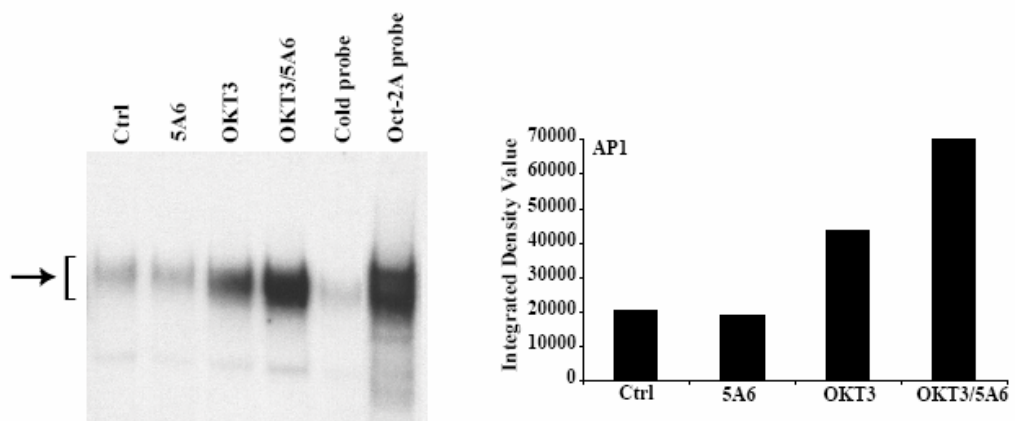
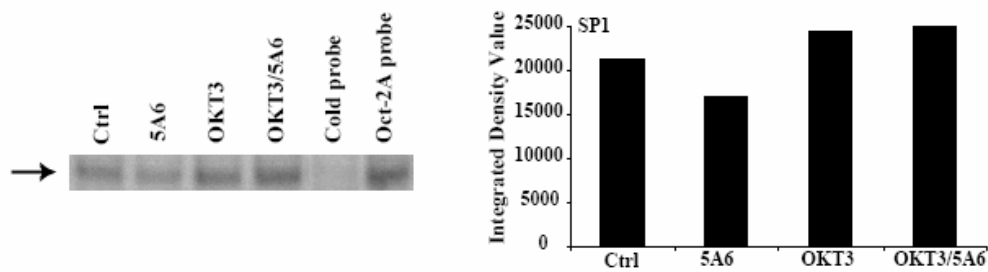


Figure 8

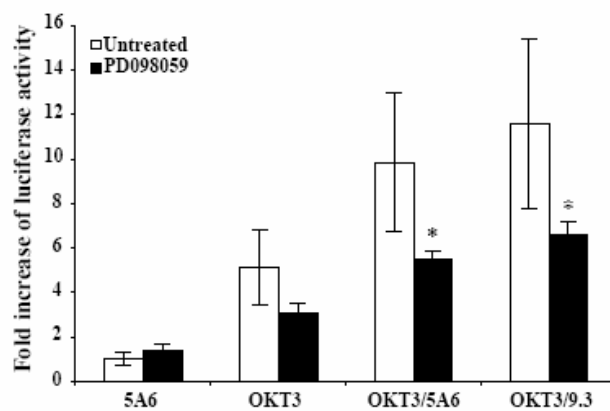
A



B



C



D

