

SONIA GAUTHIER

**EFFETS DE DIVERSES CYTOKINES ET DE LA
TOXINE DU CHOLÉRA SUR LA SUSCEPTIBILITÉ
DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES À
L'INFECTION PAR LE VIH-1.**

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

MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE
MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2009

Résumé

Les infections pédiatriques par le VIH-1 demeurent un problème de santé majeur dans les pays en voie de développement. En 2007, 2 millions d'enfants âgés de 0 à 14 ans étaient porteurs du VIH-1. Or, plus de 99% des cas pédiatriques de VIH-1 résultent de la transmission du virus de la mère à l'enfant.

L'allaitement est responsable de plus de 40% des cas pédiatriques du VIH-1. La transmission survient principalement au niveau des intestins et implique, entre autres, l'infection des cellules épithéliales intestinales. Les facteurs influençant l'infection de ces cellules par le VIH-1 demeurent cependant peu connus. Afin de mieux les comprendre, nous avons analysé l'effet de différentes cytokines et d'un produit bactérien, la toxine du choléra, sur la susceptibilité des cellules épithéliales intestinales à l'infection par le VIH-1.

Nous avons découvert que plusieurs cytokines pouvaient influencer l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1. Les cytokines de type pro-inflammatoire telles que l'IL-1 (α et β) et le TNF- α sont capables d'induire la transcription virale, tandis que les cytokines IL-4 et IL-13 inhibent l'infection par le VIH-1. Cette inhibition survient à une étape subséquente à la fusion virale et entraîne une diminution de la synthèse de l'ADN proviral complet. Nous avons également découvert que la toxine produite par la bactérie *Vibrio cholerae*, la toxine du choléra, est également capable d'inhiber l'infection par le VIH-1 et que cette inhibition n'impliquait pas l'activation de la protéine kinase A (PKA). Ces résultats permettent de mieux comprendre comment l'environnement des cellules épithéliales intestinales peut influencer leur susceptibilité à l'infection par le VIH-1. Une meilleure compréhension de l'influence de l'environnement intestinal sur la susceptibilité des cellules épithéliales intestinales à l'infection par le VIH-1 est essentielle à l'élaboration de nouvelles stratégies afin de réduire la transmission du VIH-1 par l'allaitement.

Abstract

Paediatric HIV-1 infection is still a major health concern in developing countries. In 2007, 2 millions childrens below 14 years old were infected by HIV-1. More than 99% of those paediatric HIV-1 infection result from mother-to-child transmission.

Breastfeeding is responsible for more than 40% of paediatric HIV-1 infection. Transmission occurs principally in the intestine and involves, notably, the infection of intestinal epithelial cells. Mechanisms influencing infection of those cells by HIV-1 are still poorly characterized. In order to better understand those factors, we analysed the effects of cytokines and of a bacterial product, the cholera toxin, on the susceptibility of intestinal epithelial cells to HIV-1 infection.

We have found that many cytokines can influence the infection of intestinal epithelial cells by HIV-1. Proinflammatory cytokines such as IL-1 (α and β) and TNF- α stimulate viral transcription. In contrast, IL-4 and IL-13 inhibit HIV-1 infection. This inhibition occurs at a post-fusion step and results in a decreased synthesis of complete proviral DNA. We also found that the toxin produced by *Vibrio cholerae*, the cholera toxin, inhibits HIV-1 infection of intestinal epithelial cells and that this inhibition does not depend on protein kinase A (PKA) activation. Those results allow a better comprehension of how the intestinal environment can influence susceptibility of intestinal epithelial cells to HIV-1 infection and will contribute to the elaboration of new strategies for reducing HIV-1 transmission through breastfeeding.

Avant-Propos

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Michel J. Tremblay, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je tiens également à le remercier pour m'avoir permis d'explorer mes idées et hypothèses. J'ai pris la décision de faire un doctorat parce qu'un projet en cours sur la transmission mère-enfant me tenait vraiment à cœur. Lorsqu'il s'est avéré que le projet ne fonctionnerait pas, j'ai longtemps réfléchi à savoir si je voulais continuer. Michel m'a permis d'explorer plusieurs de mes idées afin que je puisse me trouver à nouveau un projet auquel je tiens vraiment. Je voudrais donc par le fait même remercier Michel Ouellet qui a accepté que je travaille sur l'autophagie. Malgré que ce projet n'ait pas fonctionné, il m'a permis de réaliser qu'il y a avait beaucoup de projets intéressants et qu'il suffisait seulement de trouver le bon.

Je veux aussi remercier tous les membres de l'équipe du Dr Michel Tremblay, ceux qui ont déjà fini, mais également les vieux de la vieille qui sont encore présents et les petits nouveaux qui ne sont en fait plus nouveaux depuis déjà bien longtemps! Un remerciement particulier à Sylvie Méthot pour la révision des articles, des résumés et autres documents.

Cela peut paraître étrange, mais je tiens également à remercier David Fabre, un conférencier de nos *sit-in* du jeudi midi. À la fin novembre 2007 il est venu nous donner une conférence sur la déplétion des lymphocytes T CD4+ dans les intestins. Bingo! En sortant de la conférence, j'ai fait une recherche rapide sur PubMed et j'ai décidé de travailler sur les interactions entre le VIH-1 et les cellules épithéliales intestinales. Me voici maintenant, un an plus tard, à vous présenter ma thèse sur cette idée survenue un jeudi midi!

Finalement, je voudrais remercier mon conjoint qui me soutient dans la vie de tous les jours, qui m'a encouragée tout au long de mon doctorat et qui a cru en moi chaque fois que je lui disais que j'avais trouvé un nouveau projet. Je sais que même quand je lui demandais des conseils pour mon doctorat je finissais toujours par faire à ma tête, mais sans son écoute attentive, ces quatre dernières années m'auraient paru beaucoup plus longues.

La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi!
Albert Einstein (1879-1955)

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-Propos	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Liste des abréviations.....	x
Section 1 : Introduction.....	1
Chapitre 1 : Les aspects épidémiologiques du VIH-1	2
1.1 L'épidémie du VIH-1.....	2
1.2 La pathogénèse	4
1.2.1 Les phases de l'infection.....	4
1.2.2 La latence et les réservoirs viraux.....	6
1.3 La transmission	7
1.3.1 La transmission sexuelle.....	7
1.3.2 La transmission mère-enfant.....	7
1.3.3 La transmission sanguine.....	9
1.4 Les traitements.....	9
1.4.1 Les antirétroviraux.....	9
1.4.2 Les essais de vaccination	10
Chapitre 2 : Les aspects virologiques et moléculaires du VIH-1	11
2.1 La classification	11
2.2 Le génome viral	12
2.3 Les protéines virales	13
2.3.1 Les protéines structurales.....	13
2.3.2 Les protéines accessoires	14
2.3.2.1 Vif.....	15
2.3.2.2 Vpr	16
2.3.2.3 Vpu.....	17
2.3.2.4 Nef	18
2.3.2.4 Tat et Rev.....	19
2.4 Le cycle viral	19
2.4.1 L'attachement	21
2.4.1.1 Les molécules d'attachement.....	21
2.4.1.2 Les récepteurs et corécepteurs	22
2.4.2 La fusion	24
2.4.3 La transcription inverse	26
2.4.4 La décapsidation	28
2.4.5 Le transport nucléaire	29
2.4.6 L'intégration	30
2.4.7 La transcription virale.....	31
2.4.8 L'export des ARN.....	33

2.4.9 L'assemblage, le bourgeonnement et la maturation	36
2.5 Les mécanismes antiviraux de l'hôte.....	37
2.5.1 APOBEC3G.....	37
2.5.2 TRIM5 α	38
2.6 Les cellules cibles	39
2.6.1 Le tropisme viral.....	39
2.6.2 Les lymphocytes T CD4+.....	40
2.7.3 Les cellules présentatrices d'antigènes.....	40
2.7.4 Les autres cellules cibles.....	41
Chapitre 3 : Le système intestinal.....	43
3.1 La structure	43
3.2 L'immunité innée.....	45
3.2.1 Le mucus.....	45
3.2.2 Les peptides antimicrobiens.....	45
3.2.3 Le complément	46
3.2.4 Les récepteurs Fc	47
3.2.5 Les récepteurs de type <i>Toll-like</i>	47
3.2.6 Les protéines Nod	49
3.3 L'interface entre l'immunité innée et acquise	50
3.3 L'immunité acquise	50
3.3.1 Les lymphocytes B.....	51
3.3.2 Les lymphocytes T CD8+.....	51
3.4 Les cellules épithéliales intestinales	53
3.4.1 La structure de l'épithélium.....	53
3.4.2 Les cellules épithéliales intestinales et la réponse immune.....	55
Chapitre 4 : La flore intestinale	57
4.1 Les bactéries commensales.....	57
4.2 Les pathogènes entériques	57
4.2.1 Les parasites entériques	58
4.2.2 Les virus entériques	59
4.2.3 Les bactéries entériques.....	60
4.3 La toxine du choléra et l'entérotoxine LT d' <i>Escherichia coli</i>	63
4.4 La flore intestinale et le système immunitaire	66
4.4.1 La tolérance versus la réponse immune.....	66
4.4.2 La tolérance.....	69
4.4.3 La réponse immune.....	70
4.4.4. Le rôle des cellules épithéliales intestinales	71
Chapitre 5 : Le VIH-1 et le système intestinal.....	73
5.1 La pathogénèse	73
5.2 Les manifestations cliniques.....	74
5.3 La déplétion des lymphocytes T CD4+	75
Chapitre 6 : Les objectifs de recherche.....	77
6.1 La problématique	77
6.2 Les objectifs.....	77
Section 2 : Articles scientifiques	78
Chapitre 7 : Effets des cytokines sur l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1	79

7.1 Résumé.....	79
7.2 Contributions	79
7.3 Premier article scientifique	80
Chapitre 8 : Effets de la toxine du choléra sur l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1	120
8.1 Résumé.....	120
8.2 Contributions	120
8.3 Deuxième article scientifique	121
Section 3 : Discussion et perspectives	139
Chapitre 9 : Discussion et perspectives	140
9.1 Les cellules épithéliales et la transmission du VIH-1	140
9.2 Le choix du modèle.....	140
9.3 Discussion.....	142
9.3.1 Les effets des diverses cytokines	142
9.3.2 Les effets de la toxine du choléra	145
9.4 Les perspectives.....	148
9.4.1 L'IL-4.....	148
9.4.2 La toxine du choléra	150
9.5 L'importance physiologique de nos travaux.....	151
9.6 Les applications thérapeutiques	153
Chapitre 10 : Conclusion	155
Bibliographie	156
Section 4 : Annexes	190
Annexe 1 : Rôle de la gp120 dans l'infection des trophoblastes par le VIH-1.....	191
Annexe 2 : Effets de l'hémozoïne sur l'infection des MDM humains par le VIH-1	226

Liste des tableaux

Tableau 1	Les molécules d'adhésion de l'hôte incorporées par le VIH-1	22
Tableau 2	Les corécepteurs du VIH-1 et leurs patrons d'expression.....	24
Tableau 3	Les cellules susceptibles à l'infection par le VIH-1	42
Tableau 4	Compartiments anatomiques du GALT	43
Tableau 5	Les récepteurs <i>Toll-like</i> et leurs ligands	48
Tableau 6	Cellules dendritiques mucoales et leurs fonctions proposées	67

Liste des figures

Figure 1	Prévalence mondiale de l'infection par le VIH-1	3
Figure 2	Pathogénèse de l'infection par le VIH-1	4
Figure 3	Moment et taux de transmission mère-enfant du VIH-1	8
Figure 4	Organisation génomique du VIH-1	12
Figure 5	Représentation schématique d'un virus mature du VIH-1	14
Figure 6	Le cycle de réplication du VIH-1	20
Figure 7	Mécanisme de fusion du VIH-1	25
Figure 8	Mécanisme de la transcription inverse du VIH-1	27
Figure 9	Décapsidation et transport nucléaire du VIH-1	29
Figure 10	Mécanisme d'intégration de l'ADN proviral du VIH-1	31
Figure 11	Structure du LTR du VIH-1	32
Figure 12	L'expression des ARNm du VIH-1	34
Figure 13	Transport des ARNm dépendant de Rev	35
Figure 14	Modèle de restriction du VIH-1 par TRIM5 α et l'effet de CypA	38
Figure 15	Représentation des tissus lymphoïdes associés à l'intestin	44
Figure 16	Structures reconnus par les protéines Nod	49
Figure 17	Structure des villis et des cryptes des intestins	54
Figure 18	Structure de la toxine du choléra	62
Figure 19	Mécanismes de transport intracellulaire de la toxine du choléra	64
Figure 20	Mécanisme d'activation de l'adénylate cyclase par la toxine du choléra	65
Figure 21	Réponse immunitaire aux bactéries commensales et aux pathogènes	68

Liste des abbréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Ag	Antigène
ALV	<i>Avian leukosis virus</i>
AMLV	<i>Amphotropic murine leukemia virus</i>
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AP-1	<i>Activator-protein-1</i>
APOBEC	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
BST	<i>Bone marrow stromal antigen</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
CA	Capside
CBD	<i>cAMP binding domain</i>
CCR	<i>C-C chemokine receptor</i>

CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CREB	<i>cAMP-responsive element binding protein</i>
CTA	<i>Cholera toxin subunit A</i>
CTB	<i>Cholera toxin subunit B</i>
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocyte</i>
CTx	<i>Cholera toxin</i>
CXC	<i>C-X-C chemokine receptor</i>
DAG	Diacylglycérol
DCIR	<i>Dendritic cell immunoreceptor</i>
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin</i>
Env	Enveloppe
Epac	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESCRT	<i>Endosomal sorting complex required for transport</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
GalCer	<i>Galactosyl ceramide</i>
GALT	<i>Gut-associated lymphoid tissue</i>

GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
gp	Glycoprotéine
HAART	<i>Highly active antiretroviral therapy</i>
HAX	<i>HS-1 associated protein X</i>
HTLV	<i>Human T-cell leukemia/lymphoma virus</i>
ICAM	<i>Intercellular cell adhesion molecule</i>
ICTV	<i>International committee on taxonomy of viruses</i>
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IN	Intégrase
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
Kb	Kilopaire de base
kDa	Kilodalton
LFA	<i>Leucocyte function-associated antigen</i>
LEDGF	<i>Lens epithelium-derived growth factor</i>
LP	Lamina propria
LTi	<i>lymphoid tissue inducer</i>
LTR	<i>Long terminal repeat</i>

MA	Matrice
MAPK	<i>Microtubule-associated protein kinase</i>
MASP	<i>MBL-associated serine protease</i>
MBL	<i>Mannose-binding lectin</i>
MLN	<i>Mesenteric lymph nodes</i>
MuLV	<i>Murine leukemia virus</i>
NC	Nucléocapside
Nef	<i>Negative factor</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NLR	<i>Nod-like receptor</i>
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i>
NOD	<i>Nucleotid-binding oligomerization domain</i>
NSI	<i>Non-syncytial inducer</i>
PAK	<i>p21 associated kinase</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDI	<i>Protein disulfide isomerase</i>
PGN	Peptidoglycane

PI3K	<i>Phosphoinositide-3 kinase</i>
PIC	<i>Preintegration complex</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PP	Plaques de Peyer
PR	Protéase
p-TEFb	<i>Positive transcription elongation factor b</i>
R	<i>Repeated</i>
Rev	<i>Regulator of expression of virion proteins</i>
RRE	<i>Rev responsive element</i>
RT	<i>Retrotranscriptase</i>
SI	<i>Syncytial inducer</i>
SIDA	Syndrôme d'immunodéficience acquise
SIV	<i>Simian immunodeficiency virus</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SU	Surface
TAR	<i>Trans-activation response</i>
TASK	<i>TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel</i>
Tat	<i>Trans-activator of transcription</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i>

TGF	<i>Transforming growth factor</i>
T _H	<i>T helper</i>
TIR	<i>Toll/IL-1 receptor</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TM	Transmembranaire
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Treg	<i>T regulator</i>
TRIM	<i>Tripartite motif</i>
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopietin</i>
U3 et U5	<i>Unique 3' et unique 5'</i>
UDG	<i>Uracil-DNA glycosylase</i>
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
Vif	<i>Virion infectivity factor</i>
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
Vpr	<i>Viral protein R</i>
Vpu	<i>Viral protein U</i>

Section 1 :

Introduction

Chapitre 1 : Les aspects épidémiologiques du VIH-1

1.1 L'épidémie du VIH-1

Les premiers cas du syndrome de l'immunodéficience humaine (SIDA) sont survenus dans la ville de San Francisco et étaient surtout diagnostiqués chez les homosexuels d'où l'appellation initiale du syndrome de l'immunodéficience humaine relié aux homosexuels. C'est en 1981 que la maladie a été renommée SIDA et le *San Francisco Chronicle* y avait consacré un article décrivant les sept symptômes caractéristiques de la maladie : une fièvre persistant pendant plus de 4-5 jours, une perte de poids inexplicée de 10 à 20 livres en quelques mois, des maux et des douleurs semblables à ceux d'une infection virale persistant pendant plus de 10 jours, des ganglions enflés pendant plus d'une semaine, l'apparition de taches bleu/mauve sur la peau, des lésions d'herpès qui se détériorent et persistent pendant plus de 5 semaines et une perte des capacités sensorielles ou motrices ou une défaillance dans les fonctions neurologiques ou mentales.

Moins de 2 ans suivant la définition de la symptomatologie du SIDA, un virus a été isolé d'une personne souffrant d'un syndrome de lymphoadénopathie par Françoise Barré-Sinoussi dans le laboratoire de Montagnier (1). Après la description de ce virus par le laboratoire du docteur Luc Montagnier, deux autres groupes ont rapporté la présence de rétrovirus chez les patients atteints du SIDA. L'équipe du docteur Gallo a appelé ce virus HTLV-III (2) tandis que l'équipe du docteur Levy a noté la présence de rétrovirus possédant des caractéristiques des virus associés aux lymphoadénopathies (3). C'est en 1985 qu'il a été classé comme étant un *lentivirinae*, une sous-famille appartenant aux *retrovirinae* (4), et en 1986 qu'il a été renommé le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (5). Peu après l'identification du VIH-1, un autre rétrovirus humain a été découvert en Afrique et a été appelé VIH-2 vu son homologie (30 à 60%) tant au niveau de sa séquence que de sa structure (6).

L'épidémie du VIH-1 a cependant débuté bien avant ces premiers cas répertoriés à San Francisco. Le premier cas documenté d'infection par le VIH-1 a été identifié dans un

échantillon prélevé en 1959 en République Démocratique du Congo (7). Grâce à des modèles d'analyse de la diversification des virus et des séquences d'ADN viral à des temps de prélèvements précis, il a été évalué que la diversification du groupe principal du VIH-1 (groupe M) a débuté vers les années 1930 (8, 9). Ces études nous donnent seulement une idée du temps minimal depuis le début de l'épidémie chez l'humain, mais ne nous indiquent pas quand et comment le premier virus a infecté l'humain. Il semble cependant probable que l'épidémie ait débuté en République Démocratique du Congo puisque c'est l'endroit où le plus grand nombre de séquences divergentes ont été retrouvées (9). Le premier cas de VIH-1 serait probablement dû à la transmission par inadvertance du SIV à partir d'un primate infecté (10). Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer le passage du virus entre les singes et l'homme comme des morsures profondes par un animal infecté, des coupures profondes lors du dépeçage d'un animal infecté sans oublier la possibilité d'infection par le sang lors de divers rites et coutumes.

En 2008, plus de 27 ans après la première description du SIDA, on estime à 25 millions le nombre de personnes qui sont décédées des suites du SIDA. De plus, l'épidémie continue à faire rage et en 2007, le nombre de personnes vivant avec le VIH-1 était évalué à 33 millions au niveau mondial et à 73 000 au Canada (Figure 1). En Amérique du Nord, le nombre de nouveaux cas annuels demeure stable, mais l'augmentation de l'espérance de vie due à l'accessibilité aux antirétroviraux entraîne une augmentation du nombre de personnes vivant avec le VIH-1 chaque année.

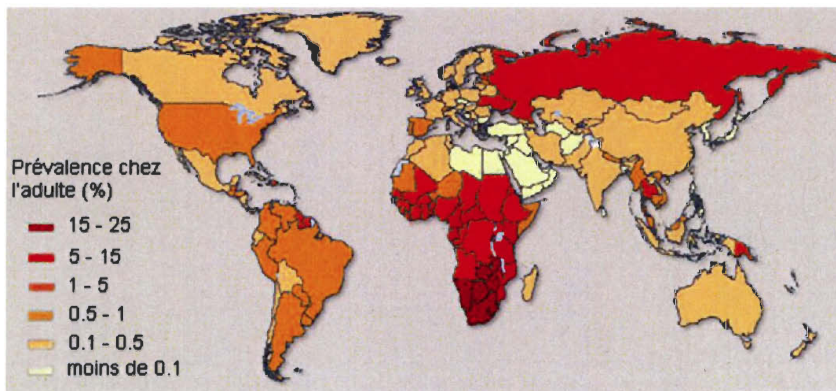


Figure 1 Prévalence mondiale de l'infection par le VIH-1

Carte mondiale indiquant la prévalence du VIH-1 chez les adultes en 2007.

Modifiée de www.unaids.org

1.2 La pathogénèse

1.2.1 Les phases de l'infection

L'infection par le VIH-1 est caractérisée par une déplétion lente mais inexorable des lymphocytes T CD4+ qui, lorsque sous le seuil des 200 cellules par mm^3 , favorisent l'apparition d'infections opportunistes. Le cours de l'infection par le VIH-1 peut se diviser en trois phases : la phase de primo-infection, la phase asymptomatique et la phase SIDA (Figure 2) (10). Les cohortes de patients infectés ont démontré que le temps moyen entre la phase de primo-infection et la phase SIDA est d'environ 12 ans. Cette durée est similaire entre les différents groupes à risque, les différents groupes ethniques et les différentes régions géographiques.

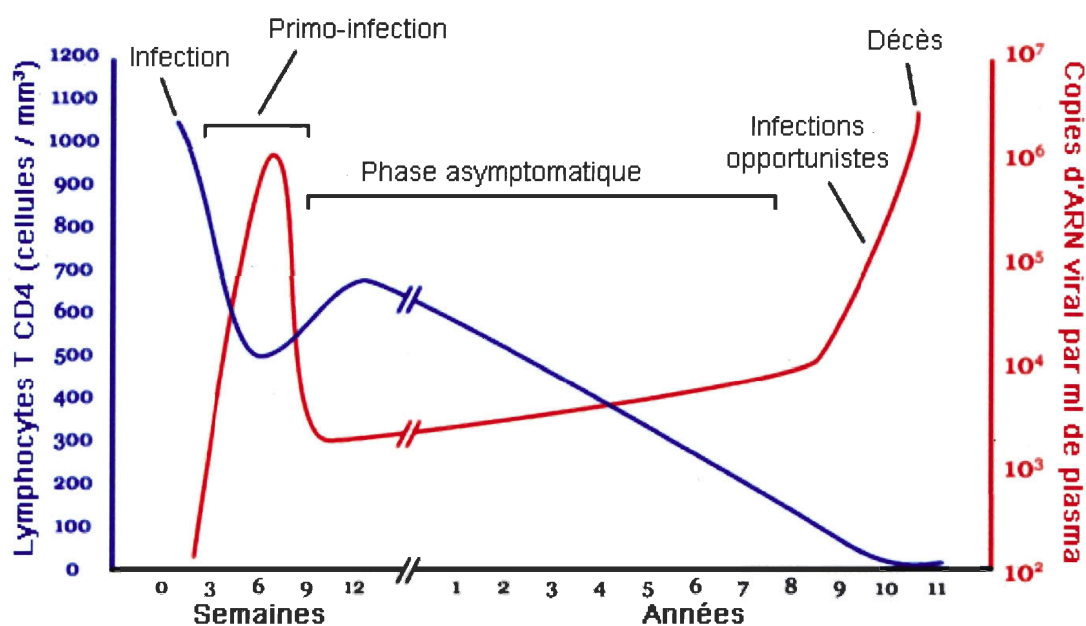


Figure 2 Pathogénèse de l'infection par le VIH-1

La primo-infection est caractérisée par une répllication rapide du VIH-1 accompagnée d'une chute drastique du compte des lymphocytes T CD4+ qui va remonter légèrement. S'ensuit la phase asymptomatique, phase durant laquelle le VIH-1 continue à se répliquer causant ainsi une chute progressive du compte des lymphocytes T CD4+. La phase SIDA est atteinte lorsque le compte des lymphocytes T CD4+ atteint un niveau critique menant à l'apparition de diverses infections opportunistes et éventuellement au décès.

Modifiée de <http://www.microbiologybytes.com/virology/AIDS1.html>

Lors de la primo-infection, le VIH-1 est capté par les cellules dendritiques des muqueuses via, par exemple, le récepteur DC-SIGN et est transporté au niveau des organes lymphoïdes (11) où il infecte les lymphocytes T CD4⁺. Les cellules infectées demeurent alors au niveau des organes lymphoïdes jusqu'à ce qu'un seuil de réplication soit atteint, soit environ de 2 à 6 semaines (12). S'ensuit l'émergence de la virémie au niveau plasmatique où les niveaux d'ARN viraux peuvent atteindre 5 millions de copies d'ARN viral par ml. Certains symptômes caractéristiques d'une grippe, tels que des rougeurs cutanées, des ganglions douloureux et la présence de fièvre peuvent survenir (13, 14). Toutefois, cette phase peut également demeurer asymptomatique. Le pic de virémie s'estompe spontanément après 2 à 4 semaines, secondairement à la réponse immune, pour atteindre un niveau relativement stable. Ce niveau varie considérablement entre les individus et est un bon indicateur du pronostic (15).

La phase asymptomatique qui s'ensuit est caractérisée par une diminution lente et linéaire des lymphocytes T CD4⁺ et une production constante de particules virales (16). Les niveaux d'ARN plasmatiques sont très variables entre les individus se situant entre des concentrations indétectables (moins de 50 copies d'ARN viral par ml) à plus de un million de copies d'ARN viral par ml (15). Durant cette phase, il est estimé qu'environ une cellule mononucléaire du sang périphérique (PBMCs) sur cinquante mille est infectée par le VIH-1 et qu'entre dix et cent millions de virions sont produits chaque jour (17). Cette réplication active du VIH-1 diminue l'espérance de vie des lymphocytes T CD4⁺ passant ainsi de 100 jours à 24-36 heures lorsqu'ils sont infectés (18). Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer la chute des lymphocytes T CD4⁺ lors de la phase asymptomatique comme la lyse des cellules infectées, la mort prématurée de celles-ci accompagnée d'un renouvellement insuffisant et l'apoptose et /ou l'autophagie des cellules non-infectées.

La phase SIDA est caractérisée par un niveau de lymphocytes T CD4⁺ sous le seuil des 200 cellules par μ l et un déclin rapide de ces derniers. Cet état d'immunodéficience rend l'individu susceptible à une variété de pathogènes qui sont normalement éliminés par le système immunitaire. La mort résulte le plus fréquemment d'une infection opportuniste.

1.2.2 La latence et les réservoirs viraux

Un réservoir viral est défini comme étant un type cellulaire ou une localisation anatomique où les virus/cellules infectées persistent avec une cinétique de réplication/niveau de renouvellement plus lent que le pool de virus se répliquant activement. Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent ainsi devenir des réservoirs s'ils sont infectés par le VIH-1 au moment où ils se convertissent en cellules mémoires (19-23). Lors de cette conversion, les cellules deviennent dans un état de repos et les facteurs de l'hôte nécessaires à la réplication sont peu exprimés ou séquestrés. Le VIH-1 peut alors s'intégrer dans l'ADN chromosomique de la cellule et persister pour la durée de vie de la cellule. Les macrophages infectés, ayant un niveau de renouvellement beaucoup plus lent que les lymphocytes T, sont également des réservoirs malgré qu'ils génèrent continuellement des virus.

Ces réservoirs sont une véritable problématique pour la guérison du VIH-1 (21, 24). Chez un individu infecté par le VIH-1, environ un lymphocyte T CD4⁺ quiescent sur un million contient un ADN proviral compétent d'intégré (21, 24, 25). Malgré ce nombre limité de cellules infectées de manière latente, la demi-vie de ces cellules est estimée à 44 mois. Selon ces données, afin qu'une personne infectée puisse éliminer complètement le VIH-1 de son organisme, il faudrait 73 années de suppression complète de la réplication virale (21, 24). Une des stratégies proposée pour éliminer ces réservoirs est de forcer le VIH-1 à sortir de sa latence par des traitements avec diverses cytokines (26-28) ou l'utilisation de la protéine Tat exogène (29). Cette stratégie ne sera cependant utile que si tous les virus latents sont éliminés.

1.3 La transmission

1.3.1 La transmission sexuelle

La transmission hétérosexuelle est responsable d'environ 75 à 85% des infections par le VIH-1 (30). La transmission peut survenir de l'homme vers la femme ou de la femme vers l'homme (31) à une fréquence de 0.03 à 0.5% chez les couples discordants (32). Les virions libres ainsi que les macrophages/lymphocytes infectés retrouvés dans le sperme (33) et les sécrétions cervico-vaginales (34) sont responsables de la transmission sexuelle. En Amérique du Nord, ce type de transmission est le principal mode de transmission du VIH-1. Les relations sexuelles non-protégées entre hommes sont responsables de 40% des nouvelles infections par le VIH-1 au Canada contre 33% pour les relations hétérosexuelles à risques (Agence de santé publique du Canada, 2007).

1.3.2 La transmission mère-enfant

La transmission mère-enfant du VIH-1 peut survenir *in utero*, *intrapartum* (lors du travail) ou pendant l'allaitement (35) et est responsable de la majorité des cas d'infections pédiatriques par le VIH-1. Le taux de transmission varie entre 30 et 45% lorsque l'enfant est allaité selon la répartition suivante : 5 à 10% *in utero*, 10 à 20% *intrapartum* et 10 à 20% lors de l'allaitement (Figure 3). Lorsqu'une préparation de lait de formule est utilisée, la transmission se situe entre 15 et 30%. Dans les pays développés, la disponibilité de la trithérapie, l'accouchement par césarienne élective ainsi que l'utilisation de lait de formule a permis de réduire la transmission mère-enfant à moins de 1%.

La majorité de la transmission *in utero* survient durant le troisième trimestre de la grossesse et implique le passage du virus à travers le placenta (36, 37). La transmission *intrapartum* survient lorsque, à l'accouchement, l'enfant passe dans le canal vaginal et ingère les sécrétions et le sang contaminés de la mère. Ce mécanisme de transmission compte pour approximativement le deux-tiers des cas de transmission chez les enfants non-allaités (38)

et peut être abaissé en procédant à une césarienne électorive (39). Finalement, la transmission mère-enfant lors de l'allaitement est la conséquence de la présence de virions libres (40) et de cellules infectées (41, 42), principalement des macrophages, dans le lait maternel.

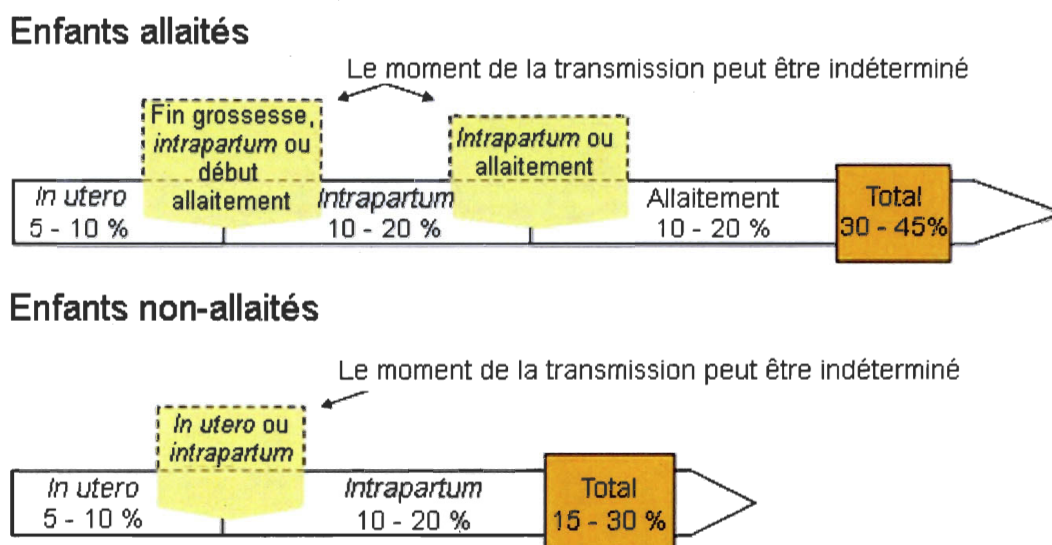


Figure 3 Moment et taux de transmission mère-enfant du VIH-1

La transmission mère-enfant survient durant la grossesse (*in utero*), lors de l'accouchement (*intrapartum*) ou via l'allaitement.

Modifiée de Lehman et al (35)

Le système intestinal peut être impliqué dans tous les types de transmission mère-enfant soit suite à l'ingestion du liquide amniotique (*in utero*), des sécrétions cervico-vaginales et/ou du sang (*intrapartum*) ou du lait (*post-partum* → allaitement) contaminés par des virions libres et/ou des cellules infectées (43-46). L'estomac des nouveaux-nés et des enfants nourris seulement au lait n'a pas un pH très acide et la majorité des virus arrivent intact au niveau des intestins (44, 47). À ce niveau, les virus peuvent infecter les cellules épithéliales intestinales, être transportés au niveau du GALT par les cellules M ou être captés par les cellules dendritiques qui extensionnent leurs dendrites au niveau de la lumière intestinale (43, 45, 48-50). Une fois que le virus a atteint le GALT, il peut infecter ses cellules cibles préférentielles, à savoir les lymphocytes T CD4+.

1.3.3 La transmission sanguine

Depuis 1985, les produits sanguins sont analysés pour la présence d'anticorps spécifiques contre le VIH-1 (10) et les cas d'infection par le sang contaminé sont maintenant quasi inexistantes en Amérique du Nord. Ce mode de transmission consiste principalement en la transmission du virus suite à l'échange de seringues souillées par les utilisateurs de drogues intraveineuses et est responsable de 19% des nouvelles infections au Canada (Agence de santé publique du Canada, 2007).

1.4 Les traitements

1.4.1 Les antirétroviraux

Il y a présentement 21 drogues antirétrovirales approuvées par la FDA (*food and drug administration*) qui peuvent être divisées en quatre classes : les inhibiteurs de fusion, les inhibiteurs de la transcriptase inverse nucléotidiques et non-nucléotidiques et les inhibiteurs de la protéase. La thérapie antirétrovirale hautement active ou HAART (*highly active antiretroviral therapy*) consiste en une combinaison de trois ou quatre drogues antirétrovirales appartenant habituellement à au moins deux classes distinctes. La combinaison la plus commune est composée de deux inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse et un inhibiteur de protéase ou un inhibiteur non-nucléotidique de la transcriptase inverse. Le traitement HAART ralentit et dans certains cas arrête l'évolution virale, mais vu l'existence des réservoirs viraux ces traitements ne peuvent pas éliminer totalement le VIH-1. Le but ultime des traitements antirétroviraux est d'obtenir une baisse de la charge virale à moins de 50 copies d'ARN viral par ml de sang, minimisant ainsi l'évolution virale et l'apparition de résistances. Les causes d'échec des traitements et du développement de résistances sont la non-observance, une mauvaise combinaison des diverses classes d'antirétroviraux et la monothérapie. Le problème de résistance est compliqué par l'existence des réservoirs viraux qui créent une résistance permanente (51, 52). De plus, plusieurs mutations confèrent une résistance croisée à d'autres antirétroviraux.

1.4.2 Les essais de vaccination

Le développement d'un vaccin contre le VIH-1 est une tâche difficile car le virus possède des propriétés très distinctes des virus dont la vaccination est disponible. Les vaccins approuvés chez l'humain sont divisés en trois classes : les pathogènes vivants atténués (ex. varicelle), les pathogènes inactivés (ex. hépatite A) et les sous-unités protéiques (ex. papilloma) (53). La stratégie de vaccination à l'aide de particules de VIH-1 atténuées est beaucoup trop risquée car des mutations pourraient rendre de nouveau le virus infectieux (54). L'utilisation de particules virales inactivées induit la production d'anticorps contre les molécules de l'hôte incorporées par le virus et non contre les protéines virales (55). Finalement, l'utilisation de la gp120 comme sous-unité protéique entraîne la production d'anticorps, mais ces derniers n'ont pas montré d'effet protecteur (56).

Plusieurs propriétés du VIH-1 ralentissent le développement d'un vaccin efficace. Premièrement, l'enveloppe du VIH-1 est difficile à neutraliser car c'est une protéine hautement glycosylée et les régions conservées ciblées par les anticorps neutralisant sont camouflées par les régions variables (57). Deuxièmement, l'infidélité de la transcriptase inverse résulte en une diversité beaucoup plus grande que les autres virus dont un vaccin est disponible. Troisièmement, le VIH-1 infecte les cellules du système immunitaire qui sont critiques pour la réponse immune. Quatrièmement, le VIH-1 est capable d'échapper au système immunitaire grâce à la latence et en diminuant l'expression du CMH de classe 1 (58). Les efforts de vaccination se concentrent maintenant surtout sur la production d'une réponse immunitaire basée sur les lymphocytes T cytotoxiques, mais il est important de noter que ce type de vaccination protégerait contre le VIH-1 en contrôlant et non en prévenant l'infection (53).

Chapitre 2 : Les aspects virologiques et moléculaires du VIH-1

2.1 La classification

La famille des rétrovirus, dont fait partie le VIH-1, est un groupe très diversifié de virus présents chez tous les vertébrés. Ces virus ont un cycle de réplication unique qui les différencie des autres virus. Leur particule virale contient un génome d'ARN qui, suite à l'entrée dans la cellule, est rétrotranscrit en ADN double brin et s'intègre dans l'ADN chromosomique cellulaire. Les rétrovirus ont originellement été classifiés en quatre sous-familles (types A à D) selon la forme et la position de leur nucléocapside. Avec la découverte constante de nouveaux rétrovirus, les classifications se sont succédées et le comité international de la taxonomie des virus (ICTV) divise maintenant la famille des *retrovirinae* en deux sous-familles et sept genres. Dans la sous-famille des *orthoretrovirinae*, on retrouve les genres *alpharetrovirus*, *betaretrovirus*, *gammaretrovirus*, *deltaretrovirus*, *epsilonretrovirus* et *lentivirus*. Dans la sous-famille des *spumaretrovirinae*, on retrouve le genre *spumavirus*. Le VIH-1 fait partie de la sous-famille des *orthoretrovirinae* sous le genre *lentivirus*.

Les rétrovirus se divisent également en virus simples ou complexes. Les rétrovirus simples sont caractérisés par la présence d'au moins une région codante en plus de celles codant pour les protéines communes Gag, Pol et Env. Ils n'encodent pour aucune protéine qui affecte directement et spécifiquement la synthèse d'ARN viral ou son épissage. La plupart des rétrovirus simples fabriquent seulement un ARNm mono-épissé codant pour l'enveloppe et ils ne fabriquent jamais d'ARNm multi-épissés. Le VIH-1 appartient aux rétrovirus complexes puisqu'il possède plusieurs ARNm multi-épissés et code pour les protéines Tat et Rev qui affectent respectivement la transcription virale et l'épissage des ARNm.

2.2 Le génome viral

Le VIH-1 possède un génome de 9.7-kb et sa séquence nucléotidique, contrairement aux rétrovirus typiques tels qu'ALV et MuLV qui ne codent que pour *gag*, *pol* et *env*, contient plusieurs cadres de lecture qui se superposent. Le VIH-1 code donc pour 9 gènes viraux soit *gag*, *pol*, *env*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *rev*, *tat* et *nef* (Figure 4). Les gènes *gag*, *pol* et *env* codent pour des polyprotéines. La polyprotéine Gag est clivée par la protéase virale en protéines de la matrice (MA), de la capsid (CA), de la nucléoprotéine (NC) ainsi que p6 tandis que la polyprotéine Pol génère les enzymes virales de la transcriptase inverse, de l'intégrase et de la protéase. Finalement, la polyprotéine de l'enveloppe est clivée par des enzymes cellulaires au niveau du réticulum endoplasmique et permet l'obtention des glycoprotéines d'enveloppe transmembranaire gp41 (TM) et de surface gp120 (SU) qui demeurent associées entre elles par des liaisons non-covalentes.

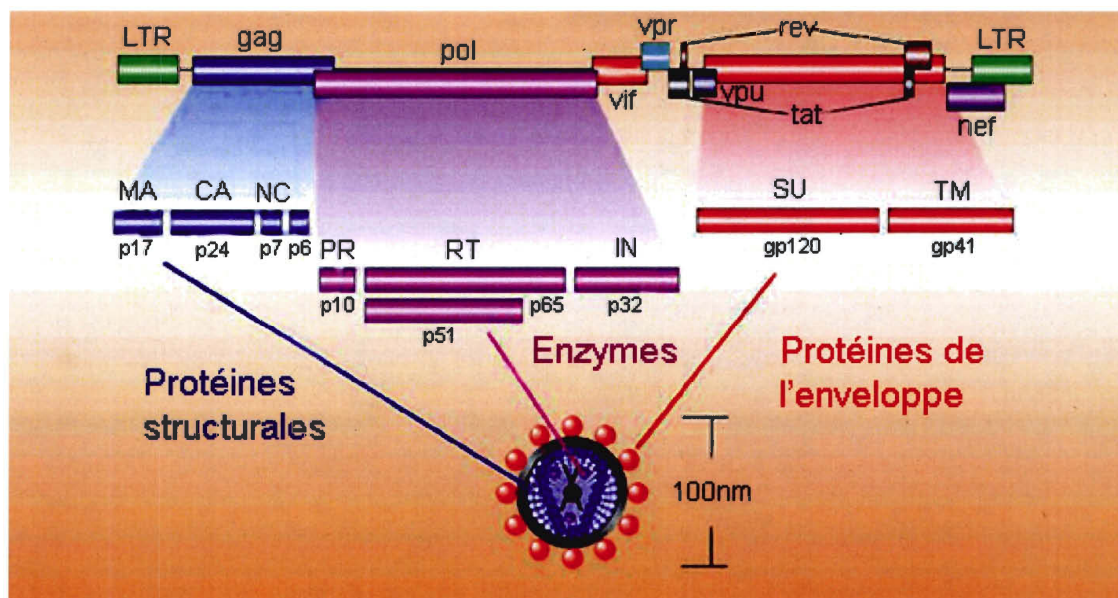


Figure 4 Organisation génomique du VIH-1

Le VIH-1 possède neuf gènes bordés de deux LTR. Ces gènes peuvent être divisés en quatre classes : protéines structurales, protéines de l'enveloppe, enzymes virales et protéines accessoires.

Modifiée de <http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html>

Le génome du VIH-1 est bordé par 2 LTR (*long terminal repeat*) qui sont générés lors du processus de la transcription inverse. Chaque LTR est divisé en trois régions : U3 (*unique 3'*), R (*repeat*) et U5 (*unique 5'*). La région R participe à une des premières étapes de la transcription inverse en formant des ponts intermoléculaires d'ADN-ARN liant ainsi le brin d'ADN nouvellement synthétisé avec le brin d'ARN génomique servant de matrice. La région U5 contribue à l'incorporation du génome viral dans les particules virales naissantes. Finalement, dans le contexte d'un ADN viral intégré, la fonction majeure du LTR est la régulation de la synthèse d'ARNm. Le promoteur et les éléments régulateurs sont localisés dans la région U3 du LTR situé en 5' de l'ADN proviral. La région U3 du LTR 3' contient la fin de la séquence qui code pour la protéine Nef.

2.3 Les protéines virales

2.3.1 Les protéines structurales

Le VIH-1 est un virus enveloppé de forme sphérique possédant un diamètre variant de 110 à 140 nm. La particule virale est constituée d'une bicouche lipidique riche en cholestérol (59) dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines virales de l'enveloppe (Env) et certaines molécules membranaires en provenance de la cellule hôte. Sous cette bicouche lipidique et ancrée à cette dernière se trouve la membrane virale. Elle est composée des protéines de la matrice (MA) qui forment une coquille sphérique. Dans le centre de la particule virale mature, c'est-à-dire après le clivage par la protéase virale, se trouve la capsid (CA) de forme conique. À l'intérieur de cette capsid se trouvent les enzymes virales de la transcriptase inverse et de l'intégrase, ainsi que les protéines de la nucléocapsid (NC) complexées avec le génome d'ARN viral qui est composé de deux molécules d'ARN monocaténares positifs et identiques (Figure 5).

Les protéines structurales virales (MA, CA, NC et le domaine C-terminal p6^{Gag}) proviennent de la polyprotéine précurseur Gag, aussi appelée Pr55^{Gag}. Cette polyprotéine est traduite par les ribosomes libres présents dans le cytoplasme cellulaire à partir d'un ARNm viral non-épissé. Les protéines structurales sont les seules molécules requises pour

la formation de pseudo-particules virales et environ 5000 copies de chacune de ces protéines sont présentes dans chaque particule virale (60). Elles sont responsables de l'encapsidation du génome d'ARN viral ainsi que de l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe et du précurseur Gag-Pol, aussi appelé Pr160^{Gag-Pol}.

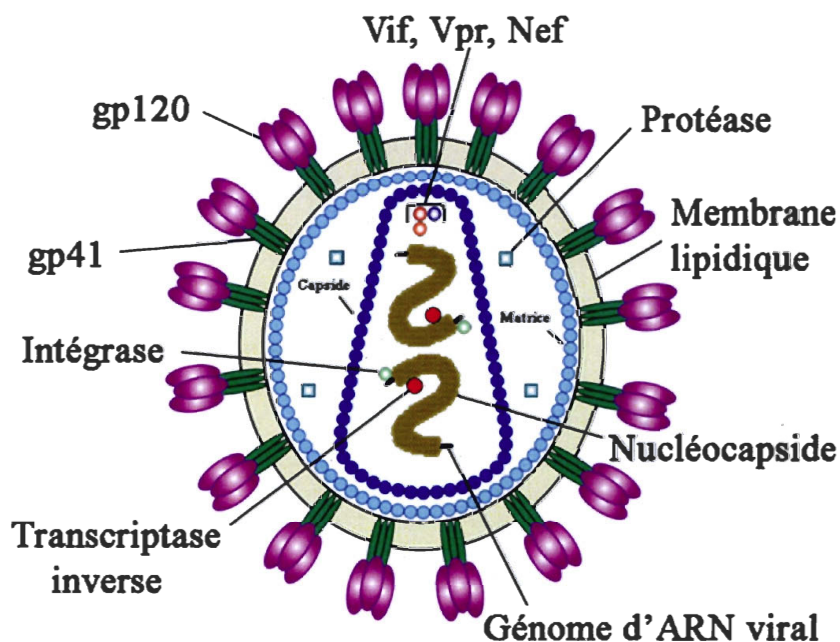


Figure 5 Représentation schématique d'un virus mature du VIH-1

Le VIH-1 comporte deux copies d'ARN simple brin protégés par une nucléocapside et associés aux enzymes virales de la transcriptase inverse et de l'intégrase. Une capsidie entoure cette structure d'ARN qui contient également les protéines accessoires Vif, Vpr et Nef. La matrice protège le tout et est recouverte d'une membrane enrichie en protéines de l'enveloppe.

Modifiée de <http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html>

2.3.2 Les protéines accessoires

Les protéines accessoires sont caractéristiques des rétrovirus complexes. Le génome du VIH-1 encode pour six protéines accessoires soit Vif, Vpr, Vpu, Nef, Rev et Tat. Les protéines accessoires ont des fonctions diversifiées, mais jusqu'à maintenant, aucune

activité enzymatique ne leur a été attribuée. Les protéines Vif, Vpr et Nef sont exprimées par la plupart des isolats du VIH-1, VIH-2 et SIV (61). Contrairement aux autres protéines accessoires, la protéine Vpu est seulement retrouvée dans les isolats du VIH-1 et certaines souches de SIV. Finalement, la protéine Vpx n'est pas retrouvée dans les isolats du VIH-1, mais est commune chez le VIH-2 et le SIV.

2.3.2.1 Vif

Vif, un acronyme pour *virion infectivity factor*, est une protéine exprimée par tous les lentivirus à l'exception du *Equine infectious anemia virus* (62). Celle-ci est une protéine de 23-kDa qui est produite tardivement dans le cycle viral et nécessite la présence de Rev (63). Chaque virion contient environ 1 à 150 copies de Vif et son incorporation dans la particule virale se fait grâce à son association avec l'ARN viral (64). Sa présence n'est pas essentielle pour l'obtention de particules virales infectieuses à partir de cellules permissives (65). Cependant, sa délétion est associée à une baisse d'infectivité lorsque le virus bourgeonne à partir de cellules non-permissives (66). L'hypothèse de la présence d'un facteur inhibiteur dans les cellules non-permissives a été postulée puisqu'il a été découvert que la présence de Vif dans les cellules cibles ne permettait pas de compléter l'absence de Vif dans les particules virales (67). C'est en 2002 que ce facteur inhibiteur, la désaminase cellulaire APOBEC3G, a été découvert (68). L'absence de Vif dans les cellules productrices est associée à une incorporation d'APOBEC3G dans la particule virale. Cette incorporation d'APOBEC3G résulte en une formation anormale du complexe de rétrotranscription (69).

Le contrôle d'APOBEC3G par Vif implique de multiples mécanismes. Premièrement, la liaison d'APOBEC3G à Vif l'exclut des virions en formation. Deuxièmement, la liaison de Vif à l'ARN viral masque la région nécessaire pour l'incorporation d'APOBEC3G dans la particule virale (70). Troisièmement, Vif entraîne la dégradation d'APOBEC3G grâce à sa capacité à lier le complexe d'ubiquitination (71). Finalement, l'interaction entre ces deux protéines pourrait affecter l'activité déaminase d'APOBEC3G. Outre ses fonctions dans l'exclusion du facteur inhibiteur APOBEC3G, Vif pourrait aussi avoir une activité associée

au virion. Il a été proposé que Vif puisse agir comme un inhibiteur de la protéase virale. Cette fonction empêcherait la maturation prématurée de la polyprotéine Gag/Pol (72). De plus, la protéine Vif est incorporée dans la particule virale où elle est associée avec le noyau viral et coprécipite avec la transcriptase inverse et l'intégrase (73). Il est donc possible que cette dernière participe aux étapes précoces du cycle viral.

2.3.2.2 Vpr

Vpr, un acronyme pour *viral protein R*, est une protéine hautement conservée au niveau du VIH, du SIV et des autres lentivirus (74). C'est la protéine virale préférentiellement ciblée par la réponse immune dépendante des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) (75) et elle joue plusieurs rôles au niveau des cellules infectées. Son premier rôle est le transport nucléaire du complexe de préintégration. Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer le rôle de Vpr dans l'import nucléaire. Selon la première hypothèse, Vpr pourrait diriger le complexe de préintégration directement au noyau, sans la nécessité d'un système dépendant de l'importine (76) tandis que selon la seconde hypothèse, Vpr pourrait modifier le système d'importation nucléaire dépendant de l'importine (77, 78). La capacité de Vpr à détruire l'enveloppe nucléaire supporte la première hypothèse (79) tandis que sa capacité à lier l'importine α (77, 78) supporte la seconde hypothèse.

Le second rôle de Vpr est l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2. Cet arrêt est subséquent à une cascade de phosphorylation qui entraîne la phosphorylation et l'inactivation de CDK1, une protéine kinase dépendante des cyclines qui est essentielle pour la transition de la phase G2 vers la phase M du cycle cellulaire (80).

Finalement, la troisième fonction de Vpr est l'induction de l'apoptose (81). Vpr traverse la membrane mitochondriale externe, possiblement via un canal, et induit la dépolarisation de la membrane mitochondriale interne. Cette perturbation de la membrane interne provoque une perforation de la membrane externe et une libération des facteurs apoptotiques (cytochrome c) par un mécanisme encore mal connu. Cette voie d'apoptose induite par Vpr mène à l'activation de la caspase 9 qui résulte en l'activation de la caspase 3 et l'apoptose

cellulaire (82). Vpr induit également l'apoptose en séquestrant le facteur anti-apoptotique de la membrane mitochondriale externe, HAX-1 (83). De plus, la localisation majoritairement nucléaire de Vpr (84) et sa capacité à activer l'apoptose de manière caspase indépendante (85) suggèrent que Vpr pourrait également induire l'apoptose par une voie indépendante des mitochondries.

2.3.2.3 Vpu

Vpu, un acronyme pour *viral protein U*, est une protéine transmembranaire peu immunogène qui n'est pas incorporée dans la particule virale (75, 86, 87). Cette protéine accessoire est seulement retrouvée chez les souches du VIH de type 1, mais il a été démontré que certaines enveloppes des souches du VIH de type 2 pouvaient assumer certaines fonctions de Vpu (88). La protéine Vpu a deux fonctions principales : elle promeut le relâchement efficace des particules virales de la surface cellulaire (89) et elle induit la dégradation de la molécule cellulaire CD4.

Dans un premier temps, la protéine Vpu est essentielle au bourgeonnement du VIH-1 lorsque la cellule n'est pas en état de prolifération active, comme par exemple, lorsque la cellule est quiescente ou en différenciation terminale (macrophages) (90). Cette fonction de Vpu nécessite l'intégrité de la partie transmembranaire de la protéine. Plusieurs mécanismes d'action ont été proposés pour expliquer le meilleur bourgeonnement en présence de Vpu dont un meilleur transport des précurseurs Gag à la membrane plasmique, une augmentation de l'affinité de la matrice pour les lipides de la membrane plasmique (91) et une activité de canal ionique (92). Cette activité de canal ionique pourrait favoriser le bourgeonnement en modifiant le potentiel électrique de la membrane plasmique, ce qui pourrait déstabiliser la membrane et favoriser le bourgeonnement ou activer des facteurs cellulaires impliqués dans les étapes tardives du bourgeonnement. Il a également été suggéré que Vpu pourrait inhiber un facteur de restriction cellulaire, TASK-1 (canal K⁺), qui bloquerait la production virale (93). Finalement, en 2008, il a été démontré que Vpu antagonisait l'effet de CD317 (BST2), une protéine cellulaire inhibant le relâchement des particules virales de la membrane cellulaire (94).

Dans un deuxième temps, Vpu agit de concert avec la gp160 pour réguler négativement l'expression du CD4. Au niveau du réticulum endoplasmique, la gp160 lie la molécule CD4 (95) et bloque ainsi sa maturation et son transport vers la membrane plasmique. La protéine Vpu entraîne une dégradation rapide du CD4 emprisonné dans le réticulum endoplasmique (96) permettant ainsi la libération de la gp160 et son transport vers la membrane plasmique (97). Cette dégradation nécessite une interaction directe entre la molécule CD4 et la protéine virale Vpu, mais également l'interaction entre Vpu et β TrCP (98) qui permet le recrutement de la machinerie de dégradation du protéasome.

2.3.2.4 Nef

Nef, un acronyme pour *negative factor*, est une petite protéine majoritairement localisée dans la région périnucléaire avec une faible présence à la membrane plasmique (99). Son nom découle du fait qu'elle a été originalement caractérisée comme étant un facteur régulant négativement la réplication du VIH-1 (100). Elle est produite de manière précoce dans le cycle viral et pourrait être importante dans l'optimisation de l'expression cellulaire afin de favoriser la réplication virale. Ses quatre principales fonctions sont la régulation négative de l'expression à la surface cellulaire du CD4 et du CMH-1, l'activation cellulaire et l'augmentation de l'infectivité des virus de façon indépendante du CD4. Toutes ces fonctions de Nef ont pour effet d'augmenter la réplication virale.

Dans un premier temps, la modulation négative de l'expression du CD4, qui implique son internalisation et sa dégradation par le système lysosomal (101), rend les cellules infectées résistantes à une superinfection par le VIH-1 qui serait désavantageuse (102). Elle prévient également les effets néfastes de la présence du CD4 à la surface cellulaire comme l'inhibition du bourgeonnement viral et une diminution de l'infectivité des virions dû à une séquestration de l'enveloppe virale (103, 104). Dans un deuxième temps, l'activation cellulaire par Nef rend les cellules plus susceptibles à l'infection par le VIH-1. De plus, l'expression de Nef régule positivement plusieurs gènes qui activent directement ou indirectement le LTR du VIH-1 (105). Les voies de signalisation induites par Nef demeurent encore mal connues, mais il est probable que plusieurs kinases soient impliquées

telles que la PAK (106-108). Dans un troisième temps, la régulation négative de l'expression du CMH-1 en surface permet aux cellules infectées d'échapper à la réponse immunitaire lors d'une réplication virale active (109). Finalement, Nef est capable d'augmenter l'infectivité du VIH-1 dans un système d'infection limité à un cycle. Cette fonction de Nef est distincte de son rôle dans la production de virions compétent via la modulation du CD4. Les mécanismes exacts sont encore inconnus, mais il a été suggéré que Nef pourrait augmenter l'entrée virale (110, 111) et agir directement ou indirectement pour faciliter le passage de la capsid virale à travers l'actine corticale (112).

2.3.2.4 Tat et Rev

Tat, un acronyme pour *trans-activator of transcription*, est la protéine responsable de la transactivation virale. C'est une protéine de 14-kDa qui peut être divisée en cinq domaines. Les domaines 1 à 3 sont essentiels pour son activité de transactivation. Le domaine 4 permet sa liaison à l'ARN viral et sa localisation nucléaire tandis que le domaine 5 contribue à l'infectivité virale et est responsable des autres fonctions de Tat (113). Les mécanismes d'action de Tat sont décrits en de plus amples détails dans la section 2.4.7.

Rev, un acronyme pour *regulator of expression of virion proteins*, est la protéine responsable de l'export des ARNm non-épissés et mono-épissés. C'est une petite protéine de 13-kDa ayant deux domaines fonctionnels. Le domaine N-terminal est riche en arginine et permet la liaison spécifique des ARNm viraux et sa localisation nucléaire (114, 115). De chaque côté se trouvent des séquences requises pour la multimérisation de Rev (116). Le domaine C-terminal est riche en leucine et contient le signal d'export nucléaire (117). Les mécanismes d'action de Rev sont décrits en de plus amples détails dans la section 2.4.8.

2.4 Le cycle viral

Le cycle viral du VIH-1 peut être divisé en dix grandes étapes (Figure 6). Le cycle débute lorsqu'une particule virale s'attache à la surface cellulaire, d'abord via les molécules

d'attachement puis via les glycoprotéines de l'enveloppe. Le virus fusionne alors avec la membrane plasmique, une étape indépendante du pH. S'ensuit les étapes de la transcription inverse, de la décapsidation, du transport au noyau, de l'intégration et de la transcription virale. Les nouveaux virions vont s'assembler au niveau de la membrane plasmique d'où ils vont bourgeonner et subir une dernière étape de maturation par la protéase virale. Les sections 2.4.1 à 2.4.9 décrivent en détails ces étapes du cycle viral.

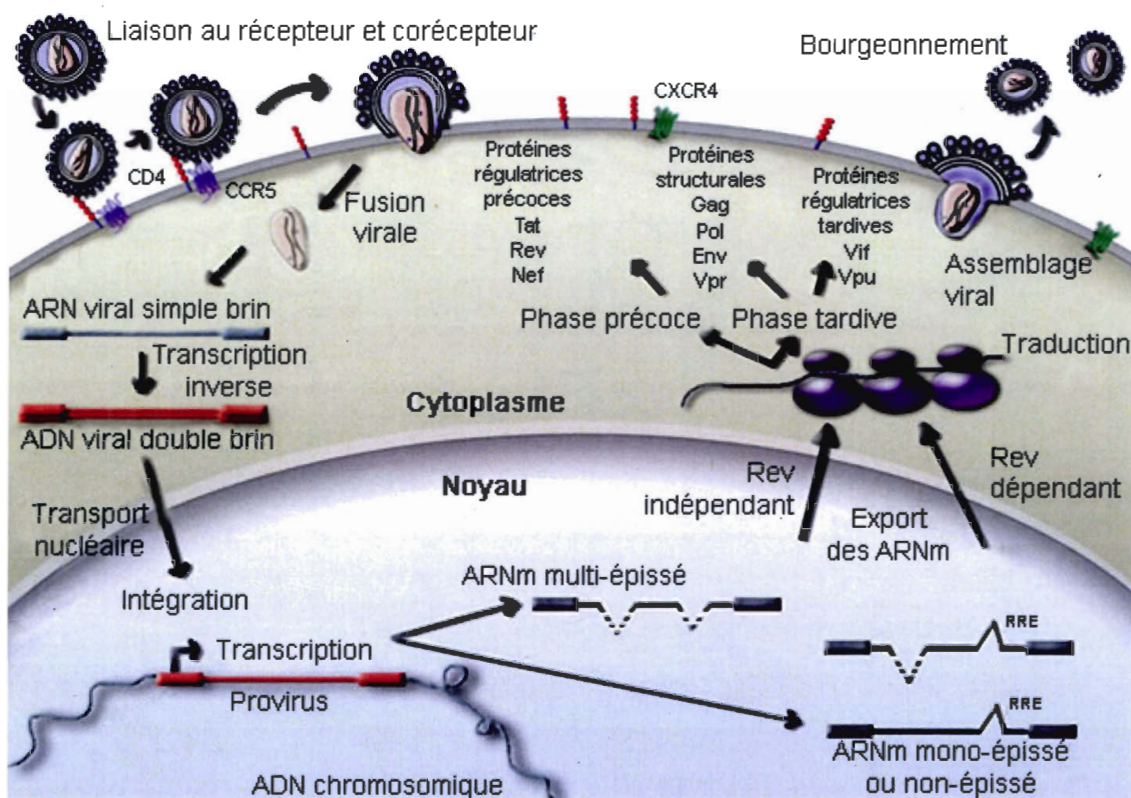


Figure 6 Le cycle de réplication du VIH-1

L'infection par le VIH-1 débute par l'adsorption des virus et leur liaison aux récepteurs et corécepteurs. La fusion virale est un processus indépendant du pH et est suivie de la décapsidation de la particule virale. La transcription inverse survient au niveau de la capsid virale et l'ADN double brin qui en résulte est transporté au niveau du noyau, où l'intégration au niveau de l'ADN chromosomique de l'hôte est catalysée par l'intégrase virale. La transcription virale mène à la production d'ARNm servant à la synthèse des protéines virales. Les particules virales s'assemblent au niveau de la membrane plasmique d'où ils bourgeonnent. Le cycle viral se termine par la maturation de la particule virale suite à la protéolyse par la protéase virale.

Modifiée de <http://picasaweb.google.com/rosaak/AssortedArt#5076585616545398322>

2.4.1 L'attachement

2.4.1.1 Les molécules d'attachement

L'attachement de la particule virale à la surface cellulaire est une étape limitante du cycle viral. En effet, avant l'attachement, la particule virale doit effectuer une recherche tridimensionnelle afin de trouver une cellule cible potentielle. L'interaction initiale entre le virus et la cellule cible est grandement favorisée par la présence de molécules d'attachement tant à la surface du virion qu'à la surface cellulaire. L'interaction initiale peut être non-spécifique (électrostatique) comme dans le cas de l'héparine sulfate ou spécifique comme dans le cas des molécules d'adhésion. Ces facteurs d'attachement ne sont pas nécessaires pour le processus de fusion, mais leur présence peut affecter positivement l'infection en facilitant la liaison au récepteur.

Les molécules d'adhésion présentes à la surface des virions (Tableau 1) sont incorporées lors du processus de bourgeonnement (118) ce qui fait que la cellule productrice joue un rôle important dans le profil des molécules de l'hôte incorporées par le VIH-1. Ces molécules peuvent constituer une grande partie des protéines présentes à la surface du virus et l'enveloppe virale peut ne représenter que 1% des protéines totales (119, 120). Ces molécules associées aux virions vont interagir avec leurs récepteurs sur les cellules cibles et ainsi promouvoir l'attachement viral. L'incorporation de ces molécules dans la membrane virale ne semble pas aléatoire (121) et plusieurs mécanismes d'incorporation sélective ont été proposés. Dans le premier modèle, les molécules hautement associées au cytosquelette seraient exclues du virus. Dans le deuxième modèle, le cytosquelette pourrait, au contraire, jouer un rôle dans l'inclusion des molécules de l'hôte au niveau de la membrane virale. Dans le troisième modèle, les molécules seraient incorporées de manière passive lorsqu'elles sont présentes au niveau du site de bourgeonnement. Finalement dans le dernier modèle, des interactions entre les molécules de l'hôte et les protéines virales régiraient l'incorporation. Il est important de noter que ces différents modèles ne sont pas exclusifs et que différents mécanismes pourraient régir l'incorporation de différentes molécules de l'hôte.

Protéine	Fonction cellulaire
CD2/LFA-2	Adhésion cellulaire, activation des lymphocytes T
CD11a/LFA-1	Liaison ICAM, adhésion cellulaire
CD11b/CR3	Liaison ICAM, adhésion cellulaire
CD18	Liaison ICAM et fibrinogène, adhésion cellulaire
CD31/PECAM	Adhésion cellulaire
CD44	Récepteur de l'acide hyaluronique, adhésion cellulaire
CD54/ICAM-1	Liaison LFA-1, adhésion et signalisation cellulaire
CD58/LFA-3	Adhésion cellulaire, activation lymphocytes T
CD62L/LAM-1	Adhésion cellulaire
ICAM-2	Liaison LFA-1, adhésion et signalisation cellulaire
ICAM-3	Liaison LFA-1, adhésion et signalisation cellulaire

Tableau 1 Les molécules d'adhésion de l'hôte incorporées par le VIH-1
Modifié de Ott (122)

2.4.1.2 Les récepteurs et corécepteurs

Suite à la liaison de la particule virale à la surface cellulaire via les molécules d'attachement, le virus peut limiter sa recherche à une analyse bidimensionnelle. Le récepteur principal du VIH-1 est la molécule CD4 qui sert également de récepteur pour le VIH-2 et le SIV (123). La molécule CD4 est une glycoprotéine membranaire de la superfamille des immunoglobulines qui est associée aux radeaux lipidiques (124). Elle est principalement exprimée à la surface des thymocytes, des lymphocytes T auxiliaires et des cellules de type monocyte/macrophages (125). Ses principales fonctions sont la maturation des lymphocytes T et la stabilisation de l'interaction entre le TCR et le CMH-II (126, 127). La molécule CD4 est composée de quatre domaines extracellulaires désignés D1 à D4 (128, 129), d'une région transmembranaire hydrophobique et d'une queue cytoplasmique

hautement chargée (130). La région CDR2 du domaine D1 est impliquée dans la liaison de la gp120 (131-134).

Le galactosyl céramide (GalCer) peut servir de récepteur au niveau des cellules neuronales et épithéliales (135, 136) qui ne possèdent pas le récepteur principal CD4. C'est un glycolipide composé d'une tête polaire, constituée d'un galactose unique, liée à une céramide. Les céramides sont une famille de lipides issus de la liaison, par son groupement amine, de la spingosine à un acide gras. Le GalCer participe à la formation de microdomaines, les radeaux lipidiques, qui sont importants pour l'entrée du VIH-1. Au niveau du GalCer, la tête polaire, constituée du galactose, semble être l'élément critique pour la liaison de la gp120, mais la partie céramide semble également importante (137). Au niveau du VIH-1, la boucle V3 de la gp120 ou un site proche au niveau conformationnel (138) semble importante pour la liaison du GalCer. Des études plus récentes ont montré que les résidus 650-685 de la gp41 pouvaient également lier le GalCer (139).

La liaison du récepteur CD4 ou GalCer induit un changement de conformation au niveau de la gp120 qui va permettre l'interaction avec le corécepteur, un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Les deux principaux corécepteurs utilisés *in vivo* par le VIH-1 sont le CXCR4 et le CCR5. La spécificité du corécepteur est contrôlée principalement par la séquences d'acide aminé de la boucle V3 de la gp120, mais les régions V1 et V2 sont également importantes (140-143). Plusieurs corécepteurs alternatifs (Tableau 2) peuvent être utilisés par certaines souches du VIH-1 pour l'infection de lignées cellulaire indicatrices, mais leur importance *in vivo* demeure incertaine (144-146).

Corécepteur	Type cellulaire ou tissu
CCR2b	Monocytes/macrophages et lymphocytes T
CCR3	Éosinophiles, microglie et T _H 2
CCR5	Lymphocytes T activées, monocytes/macrophages et cellules dendritiques
CCR8	T _H 2, thymocytes et cerveau
CCR9	Lymphocytes, cerveau et placenta
CXCR4	Lymphocytes, monocytes et cerveau
CX ₃ CR1	Cellules NK, lymphocytes T CD8 et cerveau
GPR1	Macrophages tissulaires et cerveau
GPR15 (BOB)	Lymphocytes T et colon
STRL33 (Bonzo)	Lymphocytes T, monocytes/macrophages et placenta
APJ	Système nerveux central
ChemR23	Macrophages et cellules dendritiques
RDC1	Lymphocytes et cerveau
Récepteur leucotriène B4 (BLTR)	Leucocytes
CMV (US28)	Cellules infectées par le cytomégalovirus (CMV)

Tableau 2 Les corécepteurs du VIH-1 et leurs patrons d'expression

Modifié de Simmons et al. (147)

2.4.2 La fusion

Le VIH-1 est un virus enveloppé qui fusionne avec la membrane cellulaire de façon pH indépendante. C'est la glycoprotéine de l'enveloppe virale, la gp160, qui est responsable de la fusion. À la surface de la particule virale, l'enveloppe virale est sous forme de trimère et

est organisée en pointes oligomériques ancrées dans la membrane virale. La gp160 est composée de deux sous-unités soit la gp120, responsable de la liaison au récepteur/corécepteur, et la gp41, responsable de la fusion. La glycoprotéine de l'enveloppe gp120 contient cinq domaines hypervariables, nommés V1 à V5, séparés par cinq domaines conservés nommés C1 à C5 (148). Elle est organisée en 3 domaines : le domaine interne, le domaine externe et le feuillet de liaison (149). Le domaine interne est formé principalement des régions C1 et C5, est très peu glycosylé (149, 150) et est nécessaire pour la liaison à la gp41(151). Les régions variables, exposées à la surface de la gp120 (152), sont hautement glycosylées et font partie du domaine externe. Finalement, le feuillet de liaison forme un pont entre le domaine interne et externe. Le domaine de liaison à la molécule CD4 est une structure formée à l'interface de ces 3 régions. À l'intérieur de cet interface repose une poche hydrophobique appelée « la cavité Phe43 » (149, 150).

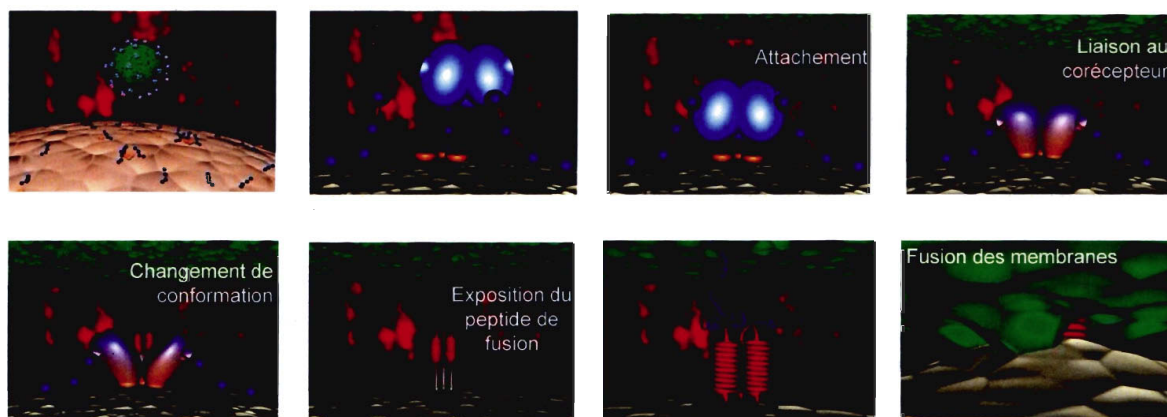


Figure 7 Mécanisme de fusion du VIH-1

La liaison du VIH-1 à son récepteur entraîne un changement de conformation au niveau de la gp120 qui permet l'exposition du site de liaison au corécepteur. La liaison du corécepteur entraîne un deuxième changement de conformation au niveau de la gp41 permettant l'exposition du peptide de fusion, son insertion dans la membrane cellulaire et la fusion des membranes.

Modifiée de www.Roche-HIV.com

La liaison de la gp120 au récepteur cellulaire (CD4 ou GalCer) est la première étape de la fusion virale et implique la liaison de plusieurs récepteurs par une même particule virale permettant ainsi d'augmenter l'avidité et d'offrir une liaison presque irréversible. Cette liaison entraîne un premier changement de conformation au niveau de la gp120 qui expose

alors des régions essentielles, telles que la boucle V3, à la liaison du corécepteur (153). L'interaction entre la gp120 et le corécepteur va entraîner un second changement de conformation, au niveau de la gp41 cette fois-ci, menant à la formation d'un intermédiaire de pré-fusion. La formation de cet intermédiaire permet de rapprocher le peptide de fusion, situé en position N-terminale de la gp41, de la membrane cellulaire cible, suivi de son insertion dans cette dernière. Les domaines N-terminal et C-terminal de la gp41 viennent alors s'associer l'un à l'autre, rapprochant ainsi les deux membranes (154, 155). La déstabilisation locale des membranes causée par l'insertion du peptide de fusion facilite la fusion des membranes cellulaires et virales (156).

2.4.3 La transcription inverse

La transcription inverse est un mécanisme qui est partagé par les rétrovirus, les rétrotransposons et les hepadnavirus. Dans le cas des rétrovirus, elle est catalysée par la transcriptase inverse (RT), une enzyme virale composée de 2 sous-unités, soit la p66 qui possède un domaine polymérase et un domaine RNaseH et la p51 qui possède seulement un domaine polymérase (157). L'initiation de la transcription inverse survient rapidement après le bourgeonnement (158) lorsque l'ARNt (Lys3) cellulaire, qui est sélectivement incorporé dans la particule virale (159), lie sa séquence complémentaire, appelée PBS pour *primer-binding site*, au niveau du génome d'ARN viral. La RT catalyse l'extension à partir de cette structure d'ARN-ARN et un ADNc (-) de la région 5' R est synthétisé. Le domaine RNaseH dégrade alors le brin d'ARN qui est associé à l'ADNc ce qui a pour conséquence le relâchement de l'ADNc suivi de son association avec la région 3' R. On nomme cette étape la réaction de transfert du premier brin. L'ADNc qui a été transféré au niveau de la région 3' R de l'ARN viral sert alors d'amorce pour la complétion de la synthèse de l'ADNc (-). Le domaine RNaseH de la RT dégrade ensuite le génome d'ARN viral. Cette dégradation est cependant incomplète et deux fragments de polypurines sont conservés. Un de ces fragments se situe dans la région U3 (3'-PPT) tandis que le deuxième fragment se situe au centre (cPPT). Ces séquences d'ARN résistant à la RNaseH vont servir d'amorce pour la synthèse du deuxième brin d'ADN (+). La synthèse de l'ADN positif à partir du

cPPT va s'arrêter au niveau de l'ARNt (160) qui va être enlevé par la RNaseH. La dégradation de l'ARNt va entraîner le transfert du second brin d'ADN qui va se lier à l'extrémité 3' du brin d'ADN négatif. L'élongation à partir de ce deuxième brin transféré se poursuit jusqu'à la rencontre du brin contenant le motif cPPT et se continue par un mécanisme de déplacement du brin existant jusqu'à ce que la RT rencontre la séquence de terminaison centrale. Cette séquence se situe à environ 80-100 nucléotides en aval du cPPT. Cette élongation par déplacement va permettre la création d'un ADN simple brin de polarité positive d'environ 100 nucléotides situé au centre de l'ADN viral appelé séquence flap. Cette séquence est caractéristique des lentivirus et est importante pour l'import nucléaire (161, 162).

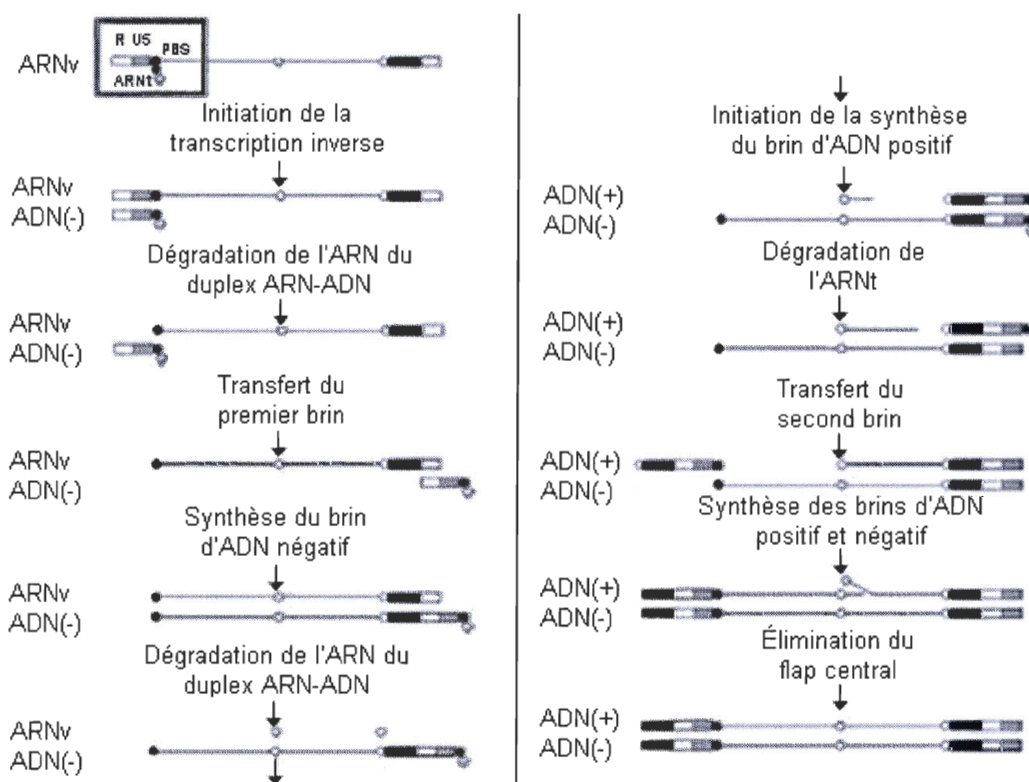


Figure 8 Mécanisme de la transcription inverse du VIH-1

Le processus de la transcription inverse est initié lorsque l'ARNt se lie au niveau de l'ARN viral entraînant l'initiation de la synthèse du brin d'ADN (-). Le transfert de ce nouveau brin d'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' de l'ARN virale permet de poursuivre la synthèse du brin d'ADN (-). Suite à la dégradation de l'ARN viral, la synthèse de l'ADN (+) est initiée. La dégradation de l'ARNt entraîne le transfert du second brin et la complétion de la synthèse des deux brins d'ADN.

Modifiée de Abbink et Berkhout (163)

2.4.4 La décapsidation

La décapsidation est le processus de dissociation de la capsid virale qui a pour objectif de libérer le génome viral. Très peu de données sont connues sur la mécanistique exacte régissant la décapsidation. Dans les dernières années, il a été démontré que cette étape du cycle viral requiert des facteurs cellulaires spécifiques à l'activation et que ce processus n'est pas spontané (164). Cette activité de décapsidation spécifique à l'activation cellulaire serait entre autre associée à une augmentation de la transcription inverse. En plus des facteurs cellulaires, les protéines de la capsid virale semblent jouer un rôle important dans la décapsidation. Chez plusieurs virus, il a été proposé que de la phosphorylation de la capsid permettrait la décapsidation (165). Dans le cas du VIH-1, la substitution des sérines impliquées dans la phosphorylation de la capsid diminue la décapsidation, mais le traitement des capsides par une phosphatase n'a aucun effet (166). Ceci suggère que la capsid du VIH-1 n'a pas besoin d'être phosphorylée pour se dissocier. En plus d'une mécanistique encore mal connue, le lieu de la décapsidation demeure très controversé. Une première hypothèse propose que la décapsidation survient immédiatement après la fusion virale. Une deuxième hypothèse suggère plutôt que la capsid virale demeure intacte jusqu'à son arrivée au niveau de la membrane nucléaire où elle se dissocie. Une étude récente a montré par microscopie électronique que la décapsidation se produit du côté cytoplasmique du pore nucléaire et non immédiatement après la fusion (Figure 9) (167). Cette étude démontre également que la séquence flap, produite lors de la transcription inverse, est importante pour le processus de décapsidation en plus de jouer un rôle dans l'import nucléaire (168).

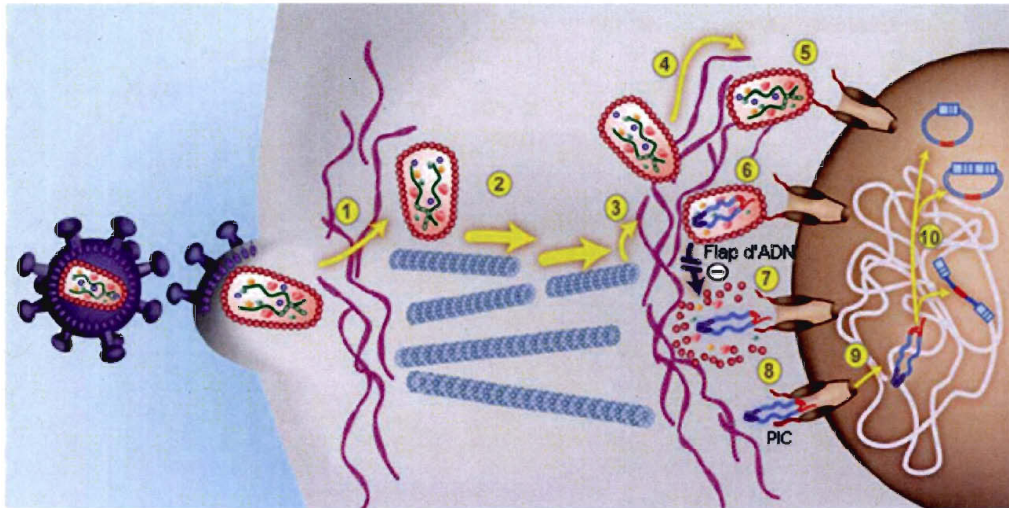


Figure 9 Décapsidation et transport nucléaire du VIH-1

(1) Suite à la fusion virale, le VIH-1 doit traverser le réseau d'actine corticale présent sous la membrane plasmique. (2) Le complexe de transcription inverse est ensuite rapidement transporté au niveau du compartiment nucléaire via le réseau de microtubules où (3) il est transféré aux filaments d'actine à proximité du noyau qui le transporte lentement vers la membrane nucléaire. (5 et 6) La majorité de la transcription inverse aurait lieu dans la capsid intacte au niveau du pore nucléaire. (6) La complétion de la synthèse de l'ADN viral et (7) la formation du flap d'ADN permettraient la décapsidation, (8) la formation du complexe de préintégration (PIC) et sa translocation nucléaire via le pore nucléaire. (9) Le transport intranucléaire du PIC est encore mal connu mais mène à (10) l'intégration dans l'ADN chromosomique.

Modifiée de Arhel et al (167)

2.4.5 Le transport nucléaire

Contrairement aux autres rétrovirus, le VIH-1 est capable de transporter son matériel génétique, sous la forme d'un complexe de préintégration (PIC), dans le noyau cellulaire même en présence d'une membrane nucléaire intacte (169, 170). Cette caractéristique permet au VIH-1 d'infecter des cellules qui sont en différenciation terminale et ne se divisent plus, comme les macrophages et les cellules microgliales. Tout comme pour l'étape de la décapsidation, les mécanismes régissant l'import nucléaire ne sont pas complètement compris. Le PIC contient plusieurs protéines virales et cellulaires ainsi que l'ADN viral double brin. La matrice, la transcriptase inverse, l'intégrase et Vpr sont les protéines virales importantes de ce complexe (171, 172). Certaines études ont proposé un rôle de la matrice et de l'intégrase dans l'import nucléaire (173), mais la présence d'un

signal de localisation nucléaire (NLS) (174, 175) et leur localisation nucléaire en l'absence du PIC (176) demeurent controversés. D'autres études proposent plutôt un rôle de Vpr et les modèles d'import nucléaire via Vpr sont nombreux. Vpr pourrait stabiliser la liaison du PIC au complexe du pore nucléaire, augmenter l'affinité des NLS pour l'importine- α , agir de manière analogue aux importines en liant le complexe du pore nucléaire ou faciliter l'import nucléaire du PIC par un mécanisme encore inconnu. Certaines évidences montrant que Vpr peut causer des herniations dans la membrane nucléaire favorisent la dernière hypothèse (79). Finalement la séquence flap de l'ADNc viral a été démontré comme étant importante pour l'import nucléaire, possiblement via la liaison d'un facteur de transport d'origine cellulaire (Figure 9) (177, 178).

2.4.6 L'intégration

L'intégrase est l'enzyme virale qui catalyse la réaction d'intégration. Elle fait partie de la superfamille des nucléotidyl-transférases (179) et comprend trois domaines, soit le domaine N-terminal, le domaine catalytique et le domaine C-terminal. L'intégrase catalyse deux réactions, soit le clivage et le transfert de l'ADN viral, à différents temps durant l'infection. L'enzyme lie de petites séquences d'ADN, appelées sites d'attachement, localisées à chaque extrémité des LTR (180). La première réaction catalysée par l'intégrase consiste à cliver deux nucléotides aux extrémités 3' de chaque LTR (Figure 10) (181). Cette réaction survient au niveau du cytoplasme dès que la synthèse d'ADN viral est complétée et est une étape importante dans la formation du complexe de préintégration (PIC). Une fois dans le noyau, le PIC doit cibler une séquence d'ADN au niveau de la chromatine. Cette séquence a une spécificité assez limitée (182, 183), quoique significative, et se situe préférentiellement dans des gènes actifs (184). La protéine cellulaire LEDGF/p75 lie l'intégrase et joue un rôle dans le ciblage des gènes actifs (185). L'intégrase utilise les extrémités 3'-OH de l'ADN viral clivé pour couper la séquence cible et joint les extrémités 3' de l'ADN viral aux extrémités 5' de la séquence cible clivée. Un intermédiaire de recombinaison, dont les extrémités 5' de l'ADN viral sont libres, est ainsi créé et ces trous seront réparés ultérieurement par la machinerie de réparation cellulaire.

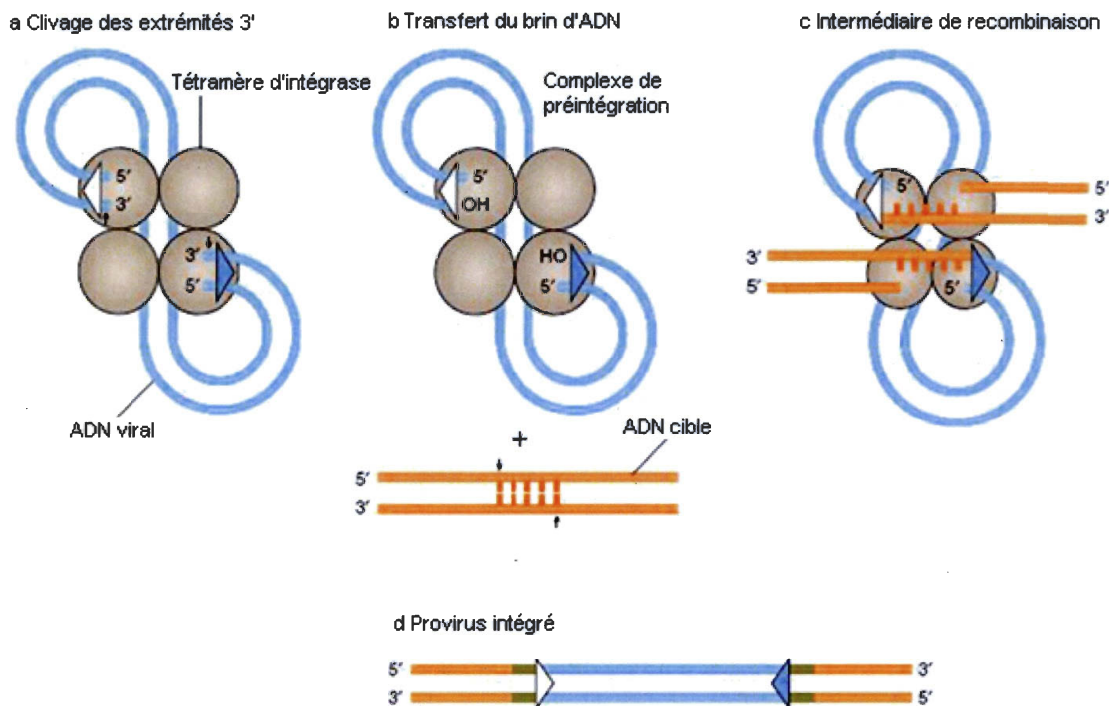


Figure 10 Mécanisme d'intégration de l'ADN proviral du VIH-1

(a) Un tétramère d'intégrase engage les deux extrémités de l'ADN proviral et clive les extrémités 3'. (b) Après l'entrée nucléaire et la localisation d'une séquence d'ADN cible dans la chromatine, l'intégrase utilise les extrémités 3' clivées à partir de l'ADN proviral pour cliver la séquence d'ADN cible qui lie alors les extrémités 3' de l'ADN viral. (c) L'intermédiaire de recombinaison comprend des extrémités 3' liés, mais des extrémités 5' libres. (d) La réparation des trous permet l'obtention d'un provirus intégré.

Modifiée de Vandegraaff et Engelman (186)

2.4.7 La transcription virale

La présence de nucléosomes, une structure qui consiste en un ADN d'environ 146pb entouré autour d'un octamère d'histone, au niveau de l'ADN proviral limite la transcription virale à un niveau basal (187). Le remodelage des nucléosomes par des complexes dépendants de l'acétylation des histones et de l'ATP est nécessaire pour augmenter la transcription. Ces complexes de remodelage des nucléosomes peuvent être activés par des cytokines/chimiokines, divers événements cellulaires ou, dans le cas du VIH-1, peuvent

être recrutés par la protéine virale Tat. Le transactivateur Tat est une protéine de 14-kDa qui peut être divisée en cinq domaines. Les domaines 1 à 3 sont essentiels pour son activité de transactivation, le domaine 4 permet sa liaison à l'ARN et sa localisation nucléaire tandis que le domaine 5 contribue à l'infectivité virale et est responsable des autres fonctions de Tat (113). Cette protéine n'est pas incorporée dans la particule virale et la transactivation basale va permettre la production d'un ARNm multi-épissé qui, lorsque transporté dans le cytoplasme, va permettre la synthèse des protéines virales Tat, Rev et Nef. Les protéines Tat et Rev vont alors retourner au niveau du noyau grâce à leur signal de localisation nucléaire et effectuer leurs fonctions respectives.

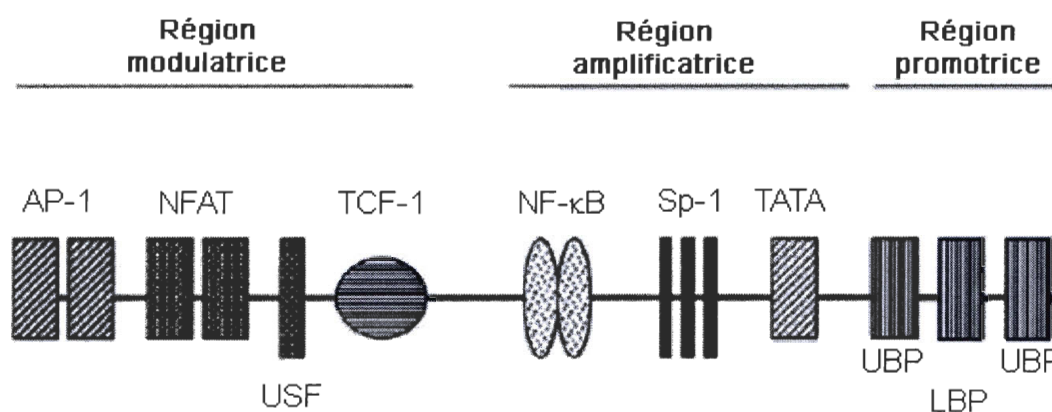


Figure 11 Structure du LTR du VIH-1

Le LTR du VIH-1 est divisé en trois régions : la région modulatrice, la région amplificatrice et la région promotrice. Les sites de liaison des facteurs de transcription de ces différentes régions sont représentés.

Modifiée de Copeland (188)

La transcription virale débute au niveau du LTR 5' de l'ADN proviral. Le LTR du VIH-1 est segmenté en trois régions : la région TAR (*transactivation response element*) (189) qui répond à Tat, la région amplificatrice qui contient la boîte TATA, trois sites de liaison pour Sp-1 et deux sites de liaison pour NF-κB (190) et la région modulatrice (Figure 11). Suite à sa synthèse, la protéine Tat va se lier à la région TAR et s'associer à la cycline T1 (CycT1) qui va recruter la kinase cycline-dépendante 9 (cdk9). La formation de ce facteur d'élongation (P-TEFb) mène à la phosphorylation du domaine C-terminal de la polymérase

à ARN II (RNAPII) et à l'élongation de l'ARN. Plusieurs facteurs de transcription cellulaires sont également impliqués dans la transcription virale dont Sp-1, NFAT, C/EBP, CREB, NF- κ B et AP-1. Pour une activation maximale de la transcription virale, la présence simultanée de Sp-1 et NF- κ B est importante (191).

2.4.8 L'export des ARN

Les gènes du VIH-1 peuvent être séparés en deux classes : ceux qui sont exprimés à partir d'ARNm épissés et ceux qui sont exprimés à partir d'ARNm contenant des introns (Figure 12). L'expression de protéines à partir d'ARNm contenant des introns est très inhabituelle chez les cellules eucaryotes. Normalement, l'épissage doit être complété avant qu'un ARNm puisse être transloqué vers le cytoplasme. Pour contourner ce mécanisme et permettre l'export d'ARNm contenant des introns, le VIH-1 code pour la protéine Rev qui est responsable de l'export des ARN non-épissés et mono-épissés (192). Rev est une petite protéine de 13-kDa ayant deux domaines fonctionnels. Le premier domaine, le domaine N-terminal, est riche en arginine et permet la liaison spécifique des ARNm et sa localisation nucléaire (114, 115). De chaque côté se trouve des séquences requises pour la multimérisation de Rev (116). Le second domaine, le domaine C-terminal, est riche en leucine et contient le signal d'export nucléaire (117). La présence à la fois d'un signal d'export et d'import nucléaire permet à Rev de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (193). Le domaine de liaison à l'ARN, riche en arginine, va lier une structure secondaire de l'ARNm appelée RRE (*Rev responsive element*) (194) qui est localisée au niveau du second intron et est donc présente dans tous les ARNm partiellement ou non-épissés. Puisque la protéine Rev est exprimée à partir d'un ARNm épissé, l'expression des protéines codées par les ARNm non-épissés ou mono-épissés est retardée jusqu'à l'obtention d'un certain niveau d'expression de Rev (195). L'export des ARNm viraux multi-épissés fait intervenir les voies classiques d'export utilisées par les ARNm cellulaires.

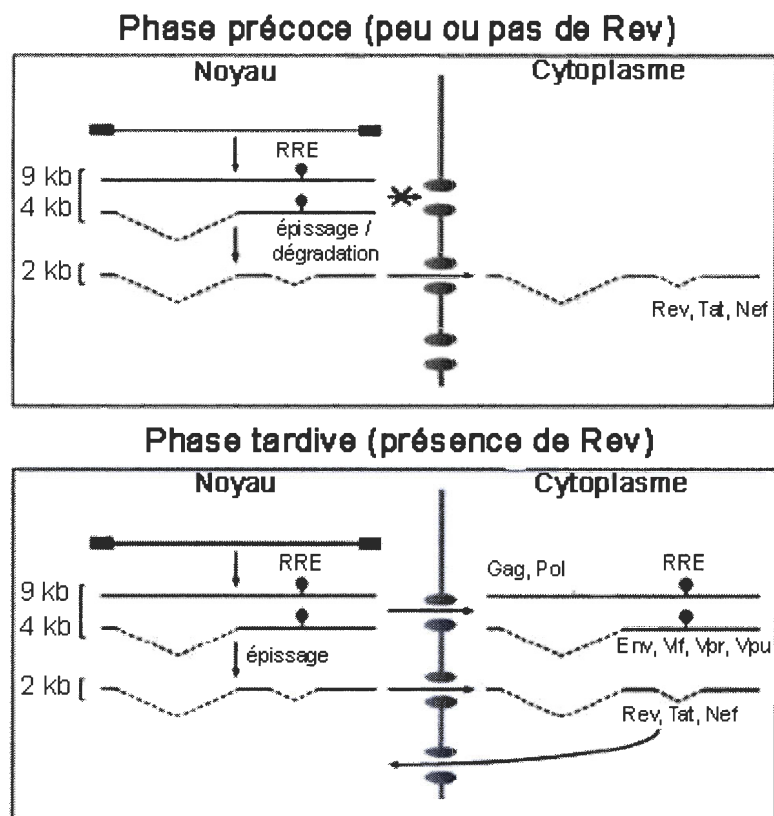


Figure 12 L'expression des ARNm du VIH-1

Les ARNm pleine longueur, mono-épissés et multi-épissés, sont constitutivement exprimés dans le noyau. En l'absence de Rev (panneau du haut), les ARNm pleine longueur et mono-épissés sont exclus du cytoplasme soit via leur dégradation ou leur épissage. Les ARNm multi-épissés sont transportés vers le cytoplasme et permettent l'expression de Rev, Tat et Nef. Lorsque le niveau de Rev dans le noyau est suffisamment élevé (panneau du bas), l'export nucléaire des ARNm de pleine longueur et mono-épissés est possible.

Modifiée de Pollard et Malim (196)

Les transcrits non-épissés ont plusieurs fonctions. Ils sont utilisés comme génome viral pour les futurs virions, servent à la traduction des protéines Gag et Pol et fonctionnent comme ARNm précurseurs pour la production de divers ARNm. L'exportation des ARNm non-épissés et mono-épissés débute par la liaison d'un dimère Rev au niveau de la structure RRE des ARNm (197) et par l'association de l'exportine-1/RanGTP à ce complexe Rev-ARNm (Figure 13). Lorsque le complexe Rev/RRE/exportine-1/RanGTP est assemblé, il migre au niveau du pore nucléaire, s'y lie et est transloqué. Une fois dans le cytoplasme, le complexe se dissocie, ce qui permet à Rev de s'associer avec l'importine- β et d'être

retransloqué dans le noyau (198). Au niveau du noyau, l'interaction entre RanGTP et l'importine- β permet la dissociation du complexe et Rev devient disponible pour un nouveau cycle d'exportation. Le mécanisme de dissociation de Rev de la structure RRE au niveau du cytoplasme demeure inconnu, mais pourrait survenir lors de la dissociation de l'exportine-1, de la traduction ou de l'encapsidation. La présence de plusieurs complexes Rev/exportine-1/RanGTP par ARNm est requise et pourrait faciliter l'interaction avec le complexe du pore nucléaire ou, de façon alternative, pourrait permettre de contrecarrer les interactions qui sont normalement responsables de la rétention nucléaire des ARNm non-épissés ou mono-épissés.

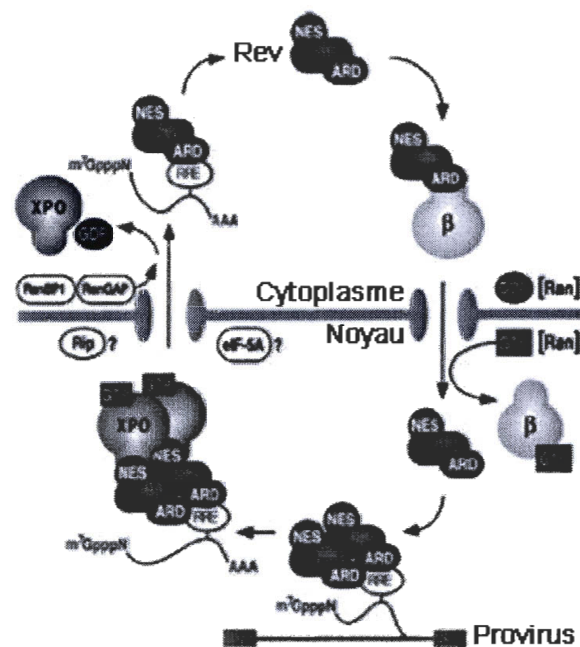


Figure 13 Transport des ARNm dépendant de Rev

La liaison de Rev et de l'importine- β entraîne la translocation nucléaire de Rev. L'interaction de Ran-GTP avec l'importine- β permet la dissociation de Rev qui est suivi de sa dimérisation et de son association avec le domaine RRE des ARNm. Lorsque le complexe ARNm-Rev-exportine-1/RanGTP est assemblé, il est transporté vers le cytoplasme via le pore nucléaire. La dissociation du complexe permet la libération de Rev qui est importé de nouveau dans le noyau.

Modifiée de Pollard et Malim (196)

2.4.9 L'assemblage, le bourgeonnement et la maturation

Les protéines de structures jouent un rôle majeur dans la formation des particules virales et forment diverses interactions protéine-protéine, protéine-ARN et protéine-lipide. Ces interactions sont cruciales pour l'encapsidation du génome viral, le transport des différentes composantes au site d'assemblage et l'acquisition de la bicouche lipidique. Lors de l'assemblage, le domaine MA (matrice) de Pr55^{Gag} est responsable du ciblage et de la liaison de Gag à la membrane plasmique ainsi que de l'incorporation de l'enveloppe virale. Il s'associe spécifiquement avec des domaines de la membrane plasmique riches en cholestérol, appelés radeaux lipidiques (199). Le domaine NC (nucléoprotéine) est responsable de l'encapsidation du génome viral en interagissant avec le signal d'encapsidation psi (ψ) de l'ARN viral. Les enzymes virales, soit la transcriptase inverse (RT), la protéase (PR) et l'intégrase (IN), sont incorporées dans les virions via des interactions avec Gag (Pr55^{Gag} ou Pr160^{Gag-Pol}). Le bourgeonnement est catalysé par des composantes de la machinerie cellulaire de triage endosomale telles que ESCRT-1 (*endosomal sorting complex required for transport*) et la multimérisation de Gag force la membrane à se courber vers l'extérieur. Le relâchement est catalysé par la liaison de la région p6 de Pr55^{Gag} à la protéine cellulaire Tsg101, une composante du complexe ESCRT (200). Le site principal d'assemblage est la membrane plasmique, mais dans certains types cellulaires incluant les macrophages, l'assemblage et le bourgeonnement se produisent au niveau des membranes des endosomes tardifs (201).

Suite au bourgeonnement, les particules virales subissent une dernière modification nommée la maturation. Suite à ce processus, la matrice demeure associée à la membrane virale, la nucléocapside se condense autour du génome viral d'ARN et la capsid se réassemble en une forme conique qui entoure le complexe d'ARN-nucléocapside. Cette maturation résulte d'un clivage des précurseurs protéiques par la protéase virale, une protéine similaire aux protéases cellulaires de type aspartique. La concentration de Gag-Pol à l'intérieur de la particule virale pourrait entraîner l'activation de la protéase virale (202).

2.5 Les mécanismes antiviraux de l'hôte

Certaines étapes du cycle viral sont la cible de protéines cellulaires dites restrictives. Ces protéines permettent de limiter l'infection des cellules par le VIH-1 par divers mécanismes. Les protéines cellulaires restrictives les mieux connues sont APOBEC3G et TRIM5 α et leurs mécanismes d'action sont détaillés dans les sections 2.5.1 et 2.5.2.

2.5.1 APOBEC3G

APOBEC3G (*apoplipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G*) est un membre de la famille des enzymes qui permettent l'édition des ARN/ADN en désaminant la cytosine en uracile (203) et, en l'absence de Vif, cette protéine est incorporée dans les particules virales. Suite à l'infection d'une cellule cible, elle va agir au niveau de la transcription inverse et causer une désamination des bases cytosine en uracile (204). Les deux conséquences majeures de cette désamination sont l'hypermutation des gènes viraux et la dégradation partielle de l'ADNc résultant du recrutement des enzymes de réparation-excision de l'ADN. Les uraciles présents dans l'ADN proviral sont ciblés par l'enzyme UDG (*uracil DNA glycosylase*) qui crée des sites vulnérables aux endonucléases et résulte en la dégradation partielle de l'ADNc. APOBEC3G peut également restreindre les rétrovirus et d'autres virus par des mécanismes indépendants de la désamination (205). De plus, d'autres membres de la famille APOBEC ont la capacité d'inhiber l'infection par le VIH-1 comme APOBEC3B et 3F (206). La fonction de Vif est d'empêcher l'action d'APOBEC3G en liant l'enzyme et en induisant son ubiquitination et sa dégradation protéosomale, empêchant ainsi son incorporation dans la particule virale (207). La protéine virale Vif est également capable d'induire la dégradation d'APOBEC3F, mais la protéine APOBEC3B est insensible à son action. Cette dernière n'est cependant pas exprimée dans les cellules cibles du VIH-1.

2.5.2 TRIM5 α

TRIM5 α (tripartite motif protein 5 α) est un facteur de restriction présent chez le macaque rhésus et le singe vert africain qui restreint l'infection par le VIH-1 (208). Chez l'humain, TRIM5 α inhibe également l'infection du VIH-1 en agissant à deux niveaux. Le premier mécanisme est la séquestration et la dégradation de la capside virale. Plus récemment il a été montré que TRIM5 α pouvait également altérer le transport nucléaire du complexe de préintégration (209).

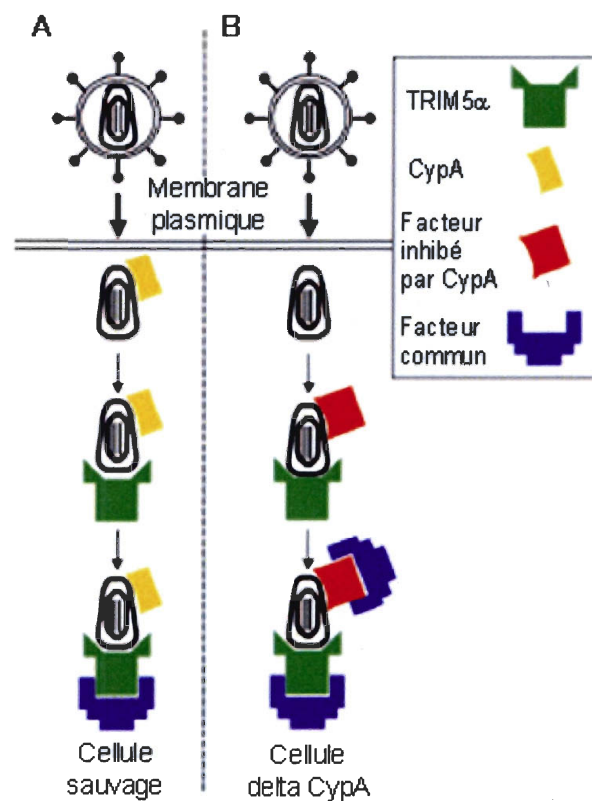


Figure 14 Modèle de restriction du VIH-1 par TRIM5 α et l'effet de CypA

(A) Dans les cellules sauvages, la capside virale est reconnue par TRIM5 α qui la transfère dans un complexe de restriction contenant un facteur inconnu mais nécessaire (bleu). (B) Lorsque CypA est absent, un deuxième facteur inconnu (rouge) est capable de reconnaître la capside virale et de la transférer vers le complexe de restriction contenant le facteur de restriction commun inconnu (bleu).

Modifiée de Luban (210)

Durant l'assemblage viral, la capsid du VIH-1 lie la cyclophiline A (CypA) (211), une protéine cellulaire servant au repliement des protéines, qui est alors hautement incorporée dans les virions (212). Cette association de la capsid avec CypA augmente l'infection virale suggérant que CypA inhibe un facteur de restriction cellulaire. Il a été initialement proposé que ce facteur de restriction cellulaire était TRIM5 α et que CypA agissait en masquant son site de liaison (213). Des études récentes ont montré que l'augmentation de l'infection par CypA est indépendante de TRIM5 α et qu'elle protégerait le VIH-1 d'un autre facteur cellulaire antiviral (Figure 14) (214, 215). De plus, un facteur commun, toujours inconnu, serait requis pour l'inhibition du VIH-1 par TRIM5 α et par le facteur de restriction inhibé par CypA (215).

2.6 Les cellules cibles

2.6.1 Le tropisme viral

Il a été observé tôt dans l'épidémie du VIH-1 que la réplication des isolats de patients à différents stades de la maladie est différente (216). Les isolats de la phase de primo-infection ont une réplication lente et donnent de faibles titres viraux contrairement aux isolats des patients en stade avancé de l'infection. Ces isolats diffèrent également dans leur capacité à former des syncytiums et ont d'abord été classés selon ces caractéristiques (217). Les virus n'ayant pas la capacité à former des syncytia (NSI, *non-syncytial inducer*) et ayant une réplication lente ont donc été associés à la primo-infection. Ce n'est qu'à la fin des années 90, lors de la découverte des corécepteurs CCR5 et CXCR4, que ces virus ont été renommés R5 (NSI) et X4 (SI, *syncytial inducer*).

La différence entre l'utilisation du corécepteur CCR5 et CXCR4 réside dans la substitution de deux acides aminés dans la boucle V3 de la glycoprotéine virale de l'enveloppe, la gp120. Les mutations lors de la transcription inverse étant fréquentes et le nombre de virus produits quotidiennement étant élevé, la capacité de générer des virions X4 survient sur une base quotidienne. Ces virus n'apparaissent pourtant que tardivement au cours de l'infection et que chez 50% des individus. Un meilleur contrôle des isolats X4 par le système

immunitaire ou simplement un plus grand nombre de cellules cibles pour les isolats R5 pourraient expliquer la sélection préférentielle des isolats de type R5.

2.6.2 Les lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T CD4+ sont les principales cellules cibles du VIH-1. Rapidement après l'identification du VIH-1, les rapports ont montré que l'infection *in vivo* par le VIH-1 était restreinte à ce type cellulaire (218) et que des anticorps monoclonaux contre la molécule CD4 pouvaient bloquer l'infection (219). Les lymphocytes T CD4+ peuvent être divisés en deux grandes catégories selon l'isoforme du CD45 exprimé et l'état d'activation. Les cellules de type naïves, exprimant l'isoforme CD45RA, n'ont jamais rencontré leurs antigènes (220) et sont à l'état de repos. Les cellules de type mémoires expriment l'isoforme CD45RO et ont déjà rencontré leurs antigènes. Les lymphocytes T CD4+CD45RA sont peu susceptibles à l'infection par le VIH-1 et le bloc de l'infection est dû à leur état de repos. Les lymphocytes T CD4+CD45RO sont plus susceptibles à l'infection par le VIH-1 (221, 222) dû à une plus grande activation du facteur de transcription NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) (223). L'expression différentielle des corécepteurs du VIH-1 entre les cellules naïves et mémoires influence également le tropisme viral. Les cellules naïves expriment préférentiellement le corécepteur CXCR4 tandis que les cellules mémoires expriment préférentiellement le corécepteur CCR5 (224).

2.7.3 Les cellules présentatrices d'antigènes

Les cellules présentatrices d'antigènes, telles que les macrophages et les cellules dendritiques, sont également ciblées par le VIH-1. La susceptibilité des macrophages au VIH-1 est connue depuis le milieu des années 80 (225, 226), mais ce n'est que depuis 10 ans qu'un intérêt plus grand y est apporté. Ces cellules expriment le corécepteur CCR5, en plus du récepteur CD4, et sont d'importants réservoirs viraux. Malgré le fait que le nombre de lymphocytes T CD4+ infectés dépasse de 10 à 100 fois le nombre de macrophages infectés (227), des cultures d'amygdales indiquent que la contribution des macrophages à

la production virale excède leur proportion parmi les cellules infectées (228). Ils sont également une source importante de virus dans les stades avancés de l'infection lorsque les lymphocytes T CD4⁺ sont déplétés (229). La majorité de l'assemblage viral dans les macrophages survient au niveau des membranes des endosomes tardifs, ce qui les rend moins susceptibles aux cellules T cytotoxiques (230). De plus, les macrophages pourraient être impliqués dans la dissémination du virus aux lymphocytes T CD4⁺ (231).

Les cellules dendritiques sont importantes pour la transmission du VIH-1 au niveau des muqueuses, mais également dans la pathogénèse du VIH-1. Elles sont moins susceptibles à l'infection par le VIH-1 que les lymphocytes T CD4⁺, mais elles ont la capacité de capter les particules virales via entre autres les molécules DC-SIGN et DCIR et de les transférer aux lymphocytes T CD4⁺ (232, 233). Ce transfert peut être de type *cis* et résulter du transfert des virions produits suite à l'infection productive des cellules dendritiques ou être de type *trans* et résulter du transfert des virions endocytosés sans infection des cellules dendritiques (50).

2.7.4 Les autres cellules cibles

Plusieurs autres types cellulaires peuvent être infectés par le VIH-1 (Tableau 3) (234). Les cellules épithéliales sont d'un intérêt particulier car elles servent de barrière physique soit entre les divers compartiments/organes ou entre l'environnement non-stérile et l'intérieur du corps humain. Elles jouent également un rôle important dans la transmission du VIH-1 autant au niveau du placenta, des organes génitaux que des intestins et leur susceptibilité à l'infection compromet leur rôle de barrière physique. La pathogénèse gastrointestinale et le rôle des cellules épithéliales intestinales dans la transmission du VIH-1 étant les sujets de cette thèse, ils seront traités en de plus amples détails dans les sections suivantes.

Hématopoïétiques

Lymphocytes T
 Lymphocytes B
 Macrophages
 Cellules NK
 Cellules dendritiques
 Cellules souches
 Épithélium du thymus
 Cellules endothéliales de la moelle osseuse

Peau

Cellules de Langerhans
 Fibroblastes

Cerveau

Cellules endothéliales des capillaires
 Astrocytes
 Microglie
 Oligodendrocytes
 Cellules de neuroblastomes
 Neurones

Intestin

Cellules adrénales fœtales
 Cellules à gobelet
 Cellules colorectales

Autres

Myocarde
 Cellules tubulaires rénales
 Membrane synoviale
 Hépatocytes
 Endothélium hépatique
 Cellules de Kupffer
 Cellules rétinales
 Cellules cervicales
 Trophoblastes

Tableau 3 Les cellules susceptibles à l'infection par le VIH-1
Modifiée de Simmons et al (147)

Chapitre 3 : Le système intestinal

3.1 La structure

L'intestin est le plus grand organe lymphoïde du corps humain et a une superficie de quatre cents mètres carrés (235). Il abrite plus de un milliard de lymphocytes T et est l'organe qui sécrète le plus d'anticorps (236). Une monocouche de cellules épithéliales sépare la lumière intestinale des tissus lymphoïdes associés à l'intestin (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT). Le GALT est composé de quatre compartiments lymphatiques distincts : les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés, la lamina propria, les lymphocytes intraépithéliaux et les ganglions mésentériques (*mesenteric lymph nodes*, MLN) (Figure 15). D'un point de vue fonctionnel, le GALT est divisé en sites inducteurs et effecteurs (Tableau 4). Les sites inducteurs sont les endroits où les antigènes de la muqueuse intestinale sont captés et où la réponse immune est induite. Les sites effecteurs sont les endroits où les cellules immunes se différencient et exercent leurs fonctions (237). Les plaques de Peyer, les ganglions mésentériques et les follicules lymphoïdes isolés sont des sites dit « inducteurs » et gouvernent donc l'initiation de la réponse immune (238). Ils contiennent des follicules de lymphocytes B, des zones de lymphocytes T (majoritairement CD4+), des macrophages et des cellules dendritiques. Les lymphocytes présents dans les sites inducteurs n'ont généralement pas rencontré leurs antigènes et sont donc majoritairement naïfs. L'épithélium recouvrant les sites inducteurs comporte une grande quantité de cellules M et est nommé épithélium associé aux follicules.

Site inducteur / effecteur	Compartiment Structure	Segment de l'intestin		
		Petit intestin		Colon
		Proximal ¹	Distal ²	
Inducteur	Plaques de Peyer	+	+++	-
	Follicules lymphoïdes isolés	+	++	++
	Ganglions mésentériques	-	-	-
Effecteur	Lamina propria	+++	+++	+++
	Lymphocytes intraépithéliaux	+++	+++	+++

Tableau 4 Compartiments anatomiques du GALT

¹ Duodénum, jejunum; ² ileum; +++ très fréquent; ++ fréquent; + aléatoire; - absent

Modifié de Niess (239)

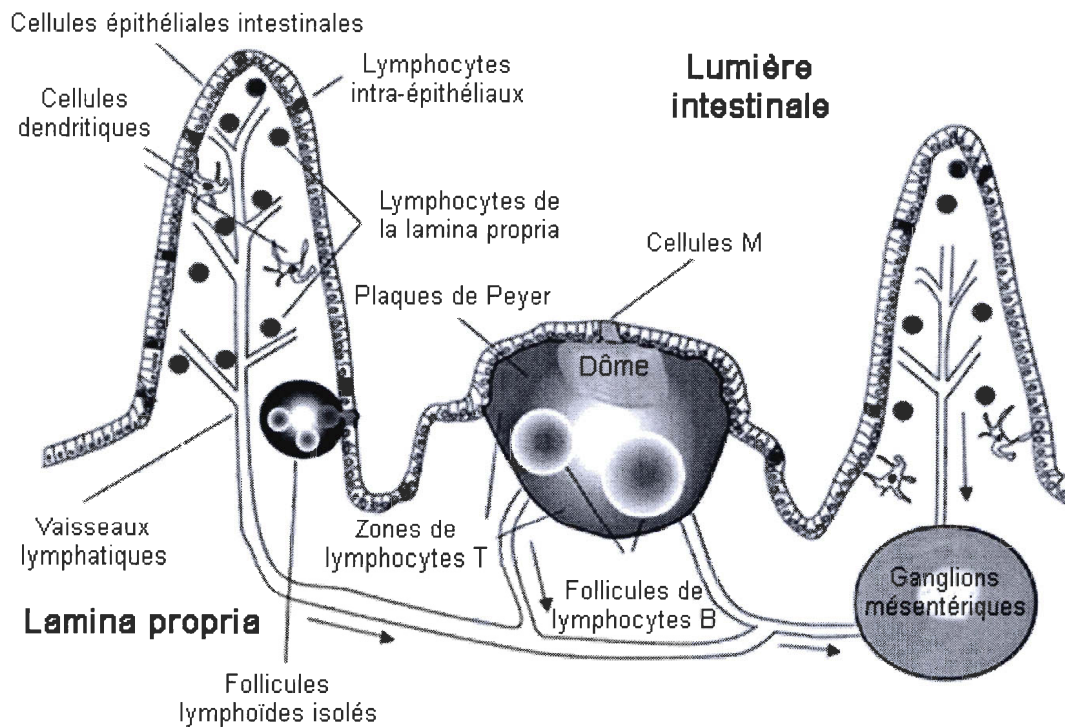


Figure 15 Représentation des tissus lymphoïdes associés à l'intestin

Les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques sont des follicules lymphoïdes intestinaux organisés. Les cellules épithéliales intestinales, les cellules dendritiques et les cellules M sont importantes pour l'échantillonnage des antigènes présents dans la lumière intestinale. La lamina propria et les plaques de Peyer sont drainées vers les ganglions mésentériques.

Modifiée de Spahn et Kucharzik (240)

Les antigènes, en provenance de la lymphe afférente ou entrant directement à partir de l'épithélium, sont présentés aux lymphocytes B et T des ganglions mésentériques et des plaques de Peyer respectivement (241). Une fois activés, les lymphocytes migrent vers la circulation sanguine via la lymphe efférente et retournent spécifiquement à la lamina propria (site effecteur) grâce à l'expression de la molécule de surface $\alpha 4\beta 7$ (242). La lamina propria est la couche de tissu conjonctif présente sous l'épithélium et contient les vaisseaux sanguins et lymphatiques (243). En plus des cellules dendritiques, des macrophages et des lymphocytes B et T activés, la lamina propria contient également des lymphocytes intraépithéliaux. Ces derniers résident sous la membrane basale des cellules épithéliales et entre les cellules épithéliales adjacentes. Ce sont surtout des lymphocytes T

CD8+ mémoires (244, 245). Leurs fonctions sont encore mal connues, mais des évidences suggèrent qu'ils sont importants pour le maintien de l'homéostasie de l'épithélium intestinal (246, 247), la défense innée et la surveillance des tumeurs (248).

3.2 L'immunité innée

Le système intestinal est en contact continu avec les bactéries commensales, les protéines alimentaires et divers microorganismes potentiellement nocifs. Le système immunitaire inné est la première ligne de défense contre les divers microorganismes et il est impliqué dans la régulation de la réponse immune acquise en plus de la reconnaissance des microorganismes étrangers par les récepteurs de type *Toll-like* et les récepteurs NLR.

3.2.1 Le mucus

Le mucus gastro-intestinal est composé de mucines. Il sert de barrière physique et est une des premières lignes de défense contre les pathogènes invasifs. Les mucines sont de larges glycoprotéines sécrétées par les cellules à gobelet. Elles sont résistantes aux protéases et ont une grande capacité à retenir l'eau (hydratation) (249). La principale fonction du mucus est d'empêcher les pathogènes de lier les cellules épithéliales grâce aux sites de liaison présents sur les mucines qui compétitionnent avec ceux de l'épithélium sous-jacent.

3.2.2 Les peptides antimicrobiens

Les cellules de Paneth, localisées au bas des cryptes de Lieberkühn, sécrètent une variété de peptides antimicrobiens dont la principale est la défensine- α (238, 250, 251). Les peptides antimicrobiens sont une composante importante de la défense immunitaire innée et offrent une activité antimicrobienne de large spectre contre les bactéries (Gram positif et négatif), les levures, les champignons et les virus enveloppés (252). Les défensines sont des peptides

des peptides cationiques non-glycosylés contenant six résidus cystéine qui forment trois ponts disulfures intramoléculaires, résultant en une structure de triple feuillet beta (253). Il existe deux sous-familles de défensines, les défensines- α (6 membres) et $-\beta$ (10 membres) (254). Les cellules de Paneth produisent les défensines- α 5 et 6 tandis que les défensines- β 1, 2 et 3 sont produites par toutes les cellules épithéliales intestinales (255). Leur sécrétion est constitutive, mais peut-être induite par des médiateurs pro-inflammatoires (237, 256-258). Les cellules épithéliales intestinales expriment également la cathelicidine (LL-37), un peptide antimicrobien cationique (259). L'expression est constitutive et spécifique aux cellules différenciées du haut des cryptes de Lieberkühn et n'est pas induite en réponse à des médiateurs pro-inflammatoires (260). Le mécanisme d'action des défensines et de la cathelicidine est la liaison électrostatique du peptide cationique à la surface externe des pathogènes, suivi de l'insertion du peptide dans la membrane cytoplasmique résultant en la fuite du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire (261).

3.2.3 Le complément

Le système du complément est une famille de protéines et de récepteurs cellulaires importante pour l'immunité innée (262, 263). Les trois principales voies d'activation du complément sont la voie classique, la voie alternative et la voie lectine (264). Dans la voie classique, la protéine C1q peut lier directement la surface de certains pathogènes ou lier des anticorps complexés avec des antigènes et activer le complément. Dans la voie lectine, la MBL (*mannose binding lectin*) va s'associer aux protéases MASP (*MBL-associated serine protease*) et la liaison de ce complexe à la surface des pathogènes va activer le complément. Finalement dans la voie alternative, l'hydrolyse de la protéine C3 est spontanée et peut survenir à la surface de plusieurs microorganismes en l'absence d'anticorps spécifiques. L'activation de cette voie est cependant contrôlée au niveau cellulaire par la présence de protéines régulatrices du complément, telles que le CD55, qui inhibent l'hydrolyse spontanée de la protéine C3.

Les conséquences physiologiques de l'activation du complément sont l'opsonisation, l'activation des leucocytes et la lyse des cellules cibles. L'opsonisation est caractérisée par

la liaison covalente de certaines protéines du complément (C3b, C4b, iC3b, C4d et C3d) à la surface activatrice (bactérie ou complexe immun) permettant aux cellules phagocytaires de fixer et d'internaliser, via les récepteurs du complément, les particules opsonisées. L'activation des leucocytes découle de la libération de petits fragments (C3a et C5a) du complément lors du clivage protéolytique. Ces derniers vont lier leurs récepteurs sur les leucocytes et entraîner leur activation et migration. Finalement, l'activation du complément va causer la lyse du pathogène ou de la cellule infectée par l'insertion d'un canal hydrophobe (C5 à C9) dans la membrane cellulaire, menant à la mort par choc osmotique.

3.2.4 Les récepteurs Fc

Les récepteurs des immunoglobulines sont largement exprimés sur les cellules du système immunitaire telles que les neutrophiles, les éosinophiles, les mastocytes, les macrophages, les lymphocytes B, les cellules dendritiques et les cellules NK. En liant la portion Fc des anticorps, ils unissent la spécificité de la réponse acquise et l'efficacité de la réponse innée. Il existe 4 classes de récepteur Fc, soit Fc γ R, Fc ϵ R, Fc α R et Fc α / μ R, qui lient respectivement les IgG, IgE, IgA et IgA/M. La liaison des récepteurs Fc entraîne entre autre la phagocytose et la destruction du pathogène, l'activation des cellules NK à détruire les cibles opsonisées d'anticorps et le relâchement de médiateurs inflammatoires par les mastocytes. De plus, ils peuvent activer les cellules dendritiques et les lymphocytes B (265).

3.2.5 Les récepteurs de type *Toll-like*

Les récepteurs de type *Toll-like* (TLR) sont des glycoprotéines membranaires surveillant l'espace extracellulaire pour la présence de motifs microbiens. Le domaine riche en leucine répété du domaine extracellulaire permet la reconnaissance et la liaison des motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP). Les TLRs possèdent également un domaine TIR intracellulaire (*toll/IL-1R/plant resistance*) qui interagit avec et active des protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire.

L'être humain possède 11 TLRs reconnaissant différents motifs microbiens (Tableau 4) (266) et menant ultimement à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et à la sécrétion d'interférons (α et β), de diverses cytokines/chimiokines (255) et de peptides anti-microbiens. Au niveau des cellules épithéliales intestinales, les TLRs 2 et 4 ne sont que faiblement exprimés, tandis que les TLRs 3, 5 et 7 sont fortement exprimés (267, 268). Afin d'éviter la détection des bactéries commensales, mais de permettre la détection d'un pathogène, l'expression des TLRs par les cellules épithéliales intestinales est souvent limitée à des endroits normalement stériles. La membrane basale et les compartiments intracellulaires de toutes les cellules épithéliales intestinales ainsi que la membrane apicale des cellules épithéliales situées dans le bas des cryptes intestinales expriment donc les TLRs (269, 270).

TLR	Ligand
TLR2 + TLR1	Lipoprotéines bactériennes
TLR2 + TLR6	Lipoprotéines bactériennes, acides lipotéicoïques, mannan de la paroi des levures
TLR2 + ?	Protéines à ancre GPI (parasites), porines bactériennes, HMGB1
TLR3	ARNdb
TLR4	Lipopolysaccharides, protéines de choc thermique (HSPs), HMGB1,
TLR5	Flagellines bactériennes
TLR7	ARNsb
TLR8	ARNsb
TLR9	ADN contenant des motifs CpG (bactérien ou viral)
TLR10	?
TLR11	Profilin de <i>Toxoplasma</i>

Tableau 5 Les récepteurs *Toll-like* et leurs ligands

GPI, *Glycosylphosphatidylinositol*; HMGB1, *High mobility group box 1*

Modifiée de www.new-science-press.com/browse/immunity/illustrations/3/

3.2.6 Les protéines Nod

Les protéines Nod sont localisées au niveau cytoplasmique et, tout comme les TLRs, elles reconnaissent des motifs microbiens. Elles font partie de la famille des récepteur de type *NOD-like* et les deux protéines Nod les mieux caractérisées sont Nod1 et Nod2. Nod1 est exprimée par les cellules épithéliales de l'estomac et du colon, les macrophages et les cellules dendritiques. Elle reconnaît une structure appelée meso-DAP qui est principalement présente dans la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif (Figure 16) (271). Nod2 est exprimée par les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Elle reconnaît l'acide muramique dipeptide, une composante du peptidoglycane des bactéries Gram positif et négatif (Figure 16) (272). Tout comme les TLRs, l'activation des protéines Nod induit le facteur de transcription NF- κ B, ce qui a pour conséquence d'induire la production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires et d'activer les cellules dendritiques (273).

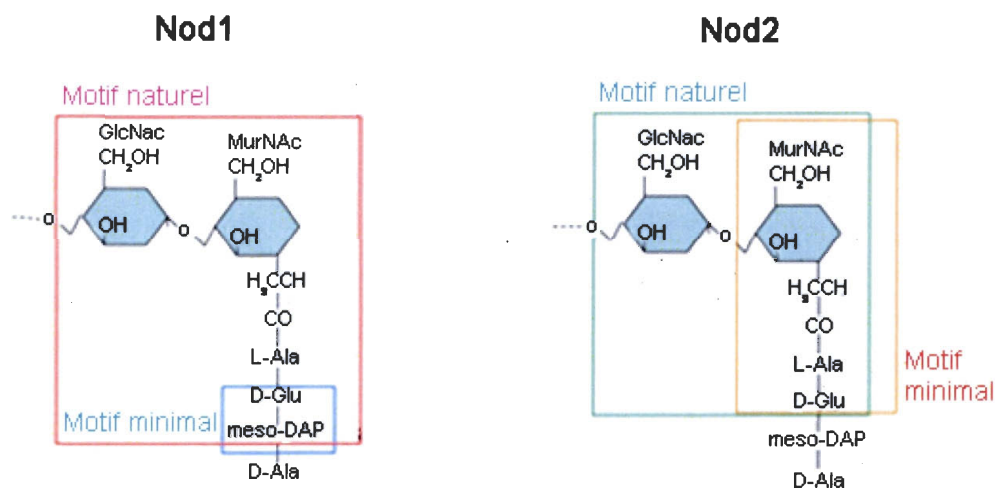


Figure 16 Structures reconnus par les protéines Nod

La structure minimale du peptidoglycane (PGN) reconnu par Nod1 est le dipeptide D-Glu-meso-DAP. La structure minimale du PGN reconnu par Nod2 est le MurNac-L-Ala-D-Glu.

Modifiée de www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR2004/Imis.html

3.3 L'interface entre l'immunité innée et acquise

Les cellules dendritiques sont parmi les premières cellules à reconnaître les pathogènes et elles sont capables d'initier la réponse immunitaire acquise en activant les lymphocytes T naïfs. Elles peuvent être sous forme immature ou mature. Les cellules dendritiques immatures sont spécialisées dans la phagocytose et, suite à la reconnaissance d'un pathogène ou la présence de cytokines pro-inflammatoires, elles subissent un programme de maturation qui augmente l'expression des molécules de costimulation et le transport des CMH-II contenant les peptides antigéniques à la surface cellulaire (274). Les cellules dendritiques matures sont, quant à elles, spécialisées dans la présentation des antigènes et l'activation du système immunitaire acquis. Au niveau intestinal, les cellules dendritiques immatures peuvent étendre leurs dendrites entre les cellules épithéliales intestinales et échantillonner les antigènes présents dans la lumière intestinale (275). De plus, les cellules épithéliales intestinales et les cellules M peuvent favoriser la présentation antigénique en transportant les antigènes à partir de la lumière intestinale vers les cellules dendritiques de la lamina propria (276).

3.3 L'immunité acquise

L'immunité acquise, contrairement à l'immunité innée, est très spécifique. En plus de participer à l'élimination du pathogène, elle participe à la création d'une mémoire immunologique qui permet une réponse immune plus rapide lors d'un nouveau contact avec le même antigène. L'immunité acquise peut être divisée en deux catégories soit l'immunité humorale et l'immunité cellulaire. Ses principaux médiateurs cellulaires sont les lymphocytes B et T. La présentation des antigènes par les cellules dendritiques a pour objectif d'activer les cellules de l'immunité acquise dont fait partie les lymphocytes B et T. Le GALT contient de 50 à 60 % des lymphocytes du corps humain (277) et, étant exposés à la plus grande charge d'antigènes dans le corps humain, la majorité de ces lymphocytes

sont dans un état activé. Au niveau des tissus rectaux, l'expression de la molécule CCR5, un marqueur d'activation des lymphocytes T, est d'environ 70% comparativement à 15% au niveau des amygdales et à moins de 5% au niveau de la circulation sanguine. Les signaux générés par les cellules dendritiques et les interactions cellulaires vont déterminer le type de lymphocytes T qui va être généré, c'est-à-dire T_H1 , T_H2 , T_H17 ou Treg. La différenciation des lymphocytes T par les cellules dendritiques est décrite en de plus amples détails à la section 4.4.

3.3.1 Les lymphocytes B

L'activation des lymphocytes T $CD4^+$ par les cellules dendritiques va permettre l'activation des lymphocytes B. Le type d'anticorps sécrété par les lymphocytes B va être influencé par les cytokines présentes dans le milieu extracellulaire au moment de leur activation. Lorsque les lymphocytes B sont activés dans le contexte d'une réponse immune contre un pathogène, la présence d'IL-4, d'IL-10 et d'IL-13 va favoriser la production d'IgG1 et d'IgE tandis que la présence d'IL-12 et d'IFN- γ va favoriser la production d'IgG2a. Le TGF- β , qui est sécrété suite à la présentation des bactéries commensales par les cellules dendritiques, va plutôt favoriser la production d'IgA (278). Les lymphocytes B ainsi activés au niveau des sites inducteurs du GALT vont migrer vers la lamina propria via les ganglions mésentériques et la circulation sanguine. Ils constituent environ 30 à 40% des cellules mononucléaires de la lamina propria et sécrètent des IgA dans la lumière intestinale, dont 50% sont de type IgA2 (279). Ces immunoglobulines vont lier les pathogènes et prévenir leur attachement aux cellules épithéliales intestinales. Il est estimé qu'environ 3 g d'IgA sont sécrétées dans la lumière intestinale chaque jour (280).

3.3.2 Les lymphocytes T $CD8^+$

Les lymphocytes T $CD8^+$, également appelés lymphocytes T cytotoxiques, protègent l'organisme contre des infections intracellulaires en recherchant et en éliminant les cellules infectées (281, 282). Le récepteur TCR présent à la surface des lymphocytes T $CD8^+$ va

reconnaître un peptide spécifique qui est exposé par les CMH-I des cellules présentatrices d'antigènes (283). L'interaction entre les lymphocytes T CD8⁺ et les cellules dendritiques présentant un antigène peut être divisée en trois phases. La première phase, qui dure environ huit heures, est caractérisée par l'interaction entre les cellules et l'expression des marqueurs d'activation (284). La deuxième phase, qui survient dans les douze heures suivantes, est définie par une migration plus lente des lymphocytes T au niveau des organes lymphoïdes et par un contact prolongé entre les lymphocytes T et les cellules dendritiques. Cette phase pourrait être responsable de la prolifération et de la survie des lymphocytes. La troisième phase, qui survient environ deux jours après l'activation, est caractérisée par une réduction du temps de contact entre les cellules. En plus de cette interaction avec les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD8⁺ ont besoin de d'autres stimuli pour devenir complètement activés, se différencier et proliférer (285, 286). Parmi ces stimuli, on retrouve l'activation et l'expression des molécules de costimulation par les cellules dendritiques ainsi que la présence de lymphocytes T CD4⁺ (287), de facteurs inflammatoires solubles et de facteurs de croissance (283).

Une fois activés, les lymphocytes T CD8⁺ vont proliférer et donner environ 10 000 cellules filles (288, 289). Cette prolifération va être accompagnée de la différenciation en cellules effectrices qui vont quitter les organes lymphoïdes à la recherche de cellules infectées (290). Deux voies sont possibles pour l'élimination des cellules infectées par les lymphocytes T CD8⁺, les deux débutant par l'attachement du lymphocyte T CD8⁺ à la cellule cible via son TCR. La première voie implique le relâchement par les lymphocytes T CD8⁺ de granules contenant des substances cytotoxiques telles que la perforine et les granzymes. La perforine va augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire tandis que les granzymes vont entrer dans la cellule cible via les pores formés et induire l'apoptose. Dans la seconde voie, l'interaction entre les molécules FasL présents sur le lymphocyte T CD8⁺ activé et les molécules Fas présents sur la cellule infectée va activer l'apoptose de la cellule cible (291).

3.4 Les cellules épithéliales intestinales

3.4.1 La structure de l'épithélium

L'épithélium intestinal, qui est constitué d'une monocouche de cellules épithéliales intestinales liées entre elles par des jonctions serrées, est complètement régénéré tous les trois à quatre jours. Sa structure est composée de villis contenant des invaginations appelées cryptes de Lieberkühn (292). Environ une à six cellules souches réside(nt) dans la partie inférieure de chacune de ces cryptes et se différencie(nt) en l'un des trois types cellulaires : endocrines, exocrines ou absorbantes (Figure 17). Les cellules de Paneth sont du type exocrine et sont les seules cellules issues de la division des cellules souches qui migrent vers le bas des cryptes. Elles sécrètent des peptides antimicrobiens et des enzymes digestives et représentent 7.5% des cellules de l'épithélium intestinal (293). Les autres types cellulaires issus de la division des cellules souches migrent vers la lumière intestinale et se différencient en cellules endocrines, à gobelet ou absorbantes. Les cellules endocrines sécrètent des hormones peptidiques et représentent moins de 0.5% des cellules épithéliales intestinales (294). Les cellules à gobelet sont des cellules exocrines qui sécrètent le mucus (295) et représentent 10 à 20% des cellules de l'épithélium intestinal. Finalement, les cellules absorbantes, également appelées entérocytes, représentent environ 80% de l'épithélium intestinal (296). La membrane apicale des cellules absorbantes est composée d'environ 3000 microvillis d'une longueur de $1\mu\text{m}$ et d'un diamètre de $0.1\mu\text{m}$ (297) et est recouverte d'enzymes digestives. La présence de microvillis augmente la surface apicale d'environ 40 fois facilitant ainsi la digestion et l'absorption.

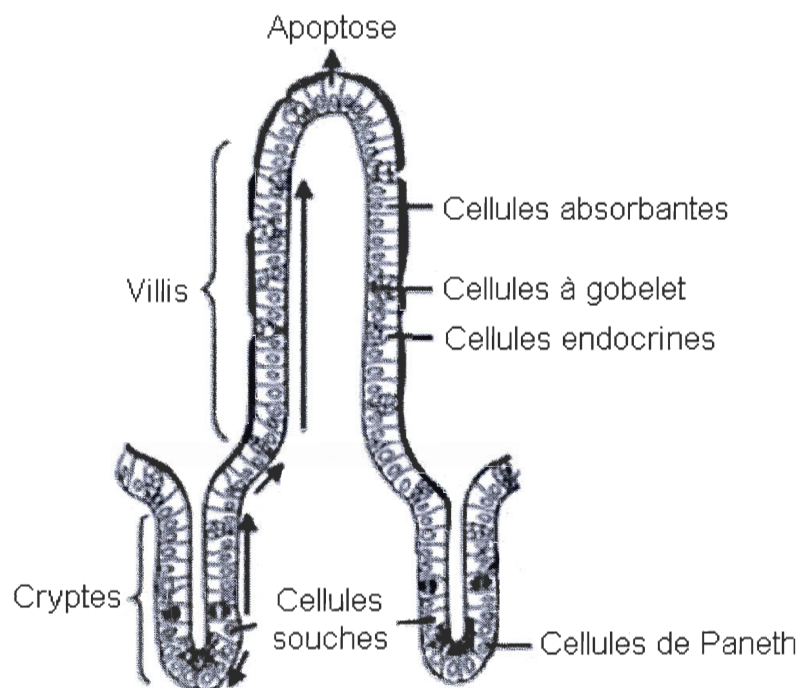


Figure 17 Structure des villis et des cryptes des intestins

Toutes les cellules épithéliales sont issues des cellules souches présentes dans les cryptes. Les cellules migrant vers le bas des cryptes vont se différencier en cellules de Paneth. Les autres cellules vont migrer vers la lumière intestinale et se différencier en cellules endocrines, cellules à gobelet et cellules absorbantes.

Modifiée de Ishizuya-Oka (298)

Les cellules M se situent au niveau de l'épithélium associé aux follicules et représentent 10 à 20% des cellules épithéliales recouvrant ces follicules (299). Elles ont un précurseur commun avec les cellules absorbantes, mais il demeure encore incertain si les cellules M proviennent d'une différenciation de ces cellules ou si ces deux types cellulaires proviennent simplement d'un précurseur commun (300). Il est cependant connu que les cellules lymphocytaires de la lamina propria, les contacts cellules-cellules et des facteurs solubles sont importants pour le développement des cellules M (299). Ces cellules possèdent une poche au niveau de la membrane basale, qui cause l'accolement des membranes basales et apicales, permettant ainsi aux immunocytes (lymphocytes B et T, macrophages et cellules dendritiques) de demeurer près de la lumière intestinale (301).

Leur principale fonction étant le transport trans-épithélial, elles servent donc de porte d'entrée pour plusieurs pathogènes comme *Salmonella* (302), *Yersinia* (303), *Shigella* (304), *Vibrio cholerae* (305), *Escherichia coli* (souches pathogènes) (306) et *Listeria* (307). Plusieurs virus sont également transportés vers le GALT par les cellules M, tels que les réovirus de type 1, le poliovirus et le VIH-1 (308-310). La surface apicale des cellules M est spécialisée pour le transport des antigènes. Elle contient très peu de microvillies, n'est recouverte que d'une mince couche de glycocalyx (311) et ne contient pas d'enzymes hydrolytiques membranaires (312). De plus, les cellules M contiennent très peu de lysosomes ce qui permet le transport des microorganismes au niveau de la lamina propria sans altérer leur propriété antigénique (313). Les mécanismes d'endocytose impliqués dans le transport trans-épithélial sont diversifiés. Les bactéries et les grosses particules entrent par phagocytose (314), les virus et les petites particules adhérentes entrent par endocytose via des vésicules de clathrine (315) et les antigènes non-adhérents entrent par pinocytose. Finalement, les cellules épithéliales intestinales possèdent plusieurs récepteurs qui favorisent le transport des antigènes de la lumière intestinale vers la lamina propria dont les récepteurs Fc néonataux (FcRn) lient les IgG (316), les récepteur FcεR lient les IgE (317) et les récepteurs pIgR lient les IgA et les IgM (318).

3.4.2 Les cellules épithéliales intestinales et la réponse immune

En plus de leurs rôles dans l'absorption et la digestion des aliments, les cellules épithéliales intestinales sont un des senseurs les plus importants des infections intestinales. Lorsqu'elles sont envahies par un microorganisme pathogène, elles sécrètent rapidement une variété de cytokines/chimiokines qui permettent l'initiation de la réponse immune (319, 320). Elles sont également capables de présenter des antigènes (321) et expriment le CMH-I et peuvent exprimer le CMH-II. La présentation antigénique est hautement polarisée et les antigènes sont capturés au niveau apical et présentés au niveau basolatéral (322). Comme les autres cellules présentatrices d'antigènes non-classiques, elles n'expriment pas les molécules de costimulation classiques requises pour l'activation des lymphocytes (CD80 et CD86), mais elles peuvent exprimer des membres de la famille B7 tels B7h et B7-H1 (323). De plus, les

cellules épithéliales intestinales peuvent activer sélectivement les lymphocytes T CD8+ supprimeurs. Ce processus est régulé par la molécule du CMH-1 non-classique CD1d et la gp180 (324, 325). La liaison de la molécule CD1d entraîne la sécrétion d'IL-10 qui inhibe la réponse des lymphocytes T (326).

Chapitre 4 : La flore intestinale

4.1 Les bactéries commensales

Il est estimé que les intestins sont colonisés par cent milliards de bactéries commensales appartenant à approximativement 300 à 500 espèces différentes. Ce nombre représente environ dix fois la quantité de cellules présentes dans le corps humain (269). Ces bactéries sont importantes pour la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales intestinales (327). Elles lient les TLRs présents sur l'épithélium et la cascade de signalisation induite est importante pour le maintien de la fonction de barrière et pour inhiber l'inflammation (328-330). Au niveau digestif, les rôles importants de la flore bactérienne sont le clivage des carbohydrates en acides gras à chaînes courtes (331), le métabolisme de certaines vitamines et la dégradation des acides biliaires (332, 333). Finalement, ces bactéries jouent un rôle important dans l'immunité en compétitionnant avec les bactéries pathogènes pour les nutriments et l'attachement aux cellules de l'hôte (334).

4.2 Les pathogènes entériques

Les microorganismes pathogènes, contrairement aux bactéries commensales, ont la capacité de désorganiser l'épithélium. Ils expriment généralement des facteurs de virulence tels que des molécules d'adhésion, des systèmes d'invasion, des enzymes ou des toxines. Dans les pays développés, où le taux de mortalité infantile est faible, peu de décès sont attribuables aux infections entériques. Cependant, dans les pays en voie de développement, les infections entériques sont toujours une des causes principales de mortalité, particulièrement chez les jeunes enfants (335). Ces derniers peuvent avoir jusqu'à 12 épisodes de diarrhée par année et les infections entériques comptent pour 25 à 34% des décès infantiles. Le nombre de décès mondial annuel est estimé à deux millions, plaçant les infections entériques au troisième rang parmi les maladies causant des fardeaux mondiaux.

Dans les pays en voie de développement, les infections entériques proviennent souvent de la consommation d'eau et de nourriture contaminées par des virus, des bactéries ou des parasites. Les rotavirus et les calicivirus sont les virus les plus souvent associés aux infections entériques. Au niveau bactérien, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* entérotoxique, *Shigella* et *Salmonella* sont les principaux agents responsables de ces diarrhées. Les mécanismes causant les diarrhées sont divers, tels que la malabsorption des fluides, des électrolytes et des nutriments, une augmentation de la sécrétion des fluides et des électrolytes et une augmentation de la perméabilité paracellulaire (336). Depuis le début des années 90, l'organisation mondiale de la santé priorise le développement de vaccins contre les rotavirus, *Shigella*, *Escherichia coli* entérotoxiques, *Vibrio cholerae* et *Salmonella typhi*.

4.2.1 Les parasites entériques

Les parasites affectant l'humain sont nombreux et peuvent être divisés en quatre classes : les nématodes, les cestodes et les trématodes qui sont tous des helminthes ainsi que les protozoaires (337). Les helminthes sont des organismes multicellulaires contrairement aux protozoaires qui ne sont constitués que d'une seule cellule. Les principaux parasites des intestins sont les protozoaires *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* et *Entamoeba histolytica* et les helminthes ankylostomes *Ankylostoma duodenale* et *Necator americanum* (248).

Les infections par les parasites protozoaires sont communes chez les humains (338). Ces infections sont associées avec une mortalité et une morbidité élevées avec plus de 58 millions de cas pédiatriques chaque année au niveau mondial (Organisation mondiale de la santé) (339). *Giardia lamblia* est l'agent causal de la giardiase, une maladie qui affecte mondialement plus de 280 millions d'individus chaque année (340). Elle est asymptomatique dans la majorité des cas, mais provoque parfois l'apparition subite de diarrhées nauséabondes, accompagnées de crampes abdominales, de ballonnements, d'une fatigue et d'une perte de poids (341).

Cryptosporidium parvum est l'agent causal de la cryptosporidiose, une maladie qui cause une diarrhée profuse, des crampes, des douleurs abdominales, une perte de poids, des flatulences et, dans certains cas, des nausées, des vomissements, de la fièvre et des myalgies (Santé Canada). C'est un parasite très répandu dans le monde entier : les taux d'infection varient entre 1 et 4,5 % dans les pays industrialisés et entre 3 et 20 % dans les pays en développement. Chez les sujets atteints du SIDA, ces taux peuvent même atteindre 50 à 60% (3 à 20 % aux États-Unis, 50 à 60 % en Afrique et à Haïti). Les diarrhées causées par *Giardia* et *Cryptosporidium* résultent de l'interaction entre les produits parasitaires et la réponse immunitaire (342-345). Ces deux parasites induisent également l'apoptose des cellules épithéliales intestinales ainsi qu'une désorganisation du cytosquelette et des jonctions serrées (346, 347).

Le protozoaire *Entamoeba histolytica* infecte mondialement 500 millions d'individus chaque année. Il cause l'apparition de symptômes chez 50 millions d'individus et résulte en 100 000 décès (348). Les personnes symptomatiques peuvent présenter une brusque poussée de fièvre, des crampes abdominales sévères et une diarrhée sanglante profuse. L'infection peut se compliquer d'une hémorragie grave, d'une péritonite, d'un amœbome ou d'un abcès hépatique (Santé Canada).

Finalement, l'infection par les ankylostomes *Ankylostoma duodenale* et *Necator americanum* est une des infections parasitaires les plus importantes au niveau mondial, touchant annuellement 740 millions d'individus (349). Malgré que ces parasites ne sont pas associés à une mortalité élevée, ils causent beaucoup de morbidité sous forme d'anémie chronique et de malabsorption des protéines (350).

4.2.2 Les virus entériques

Les virus causant des infections entériques sont nombreux, mais les rotavirus et les calcivirus sont les plus préoccupants au niveau mondial. Les virus peuvent causer des diarrhées par plusieurs mécanismes, comme par exemple, l'infection cytolitique des cellules épithéliales intestinales. De plus, certaines protéines virales ainsi que les diverses

cytokines sécrétées suite à l'infection peuvent entraîner une augmentation des concentrations intracellulaire du calcium et d'AMP cyclique. Ces seconds messagers ont plusieurs effets sur les jonctions serrées, les canaux ioniques, les transporteurs et l'expression de gènes. Tous ces effets vont affecter l'absorption des nutriments et des fluides, la sécrétion de Cl^- et la perméabilité paracellulaire (351).

Au niveau mondial, les rotavirus sont la principale cause des diarrhées virales. Ce sont des virus à ARN non-enveloppés appartenant à la famille des *Reoviridae*. Ils sont responsables de 25 à 55% des diarrhées sévères et causent approximativement 400 000 décès annuellement, surtout chez les enfants de moins de deux ans (352). Contrairement aux autres infections entériques qui se transmettent principalement par l'eau et la nourriture contaminées, les rotavirus se transmettent surtout par des contacts entre humains.

Les calicivirus sont des virus à ARN non-enveloppés faisant partie de la famille des *Caliciviridae*. Dans les pays industrialisés, ils sont responsables de la majorité des cas de gastroentérites. Seulement aux Etats-Unis, on estime annuellement à 250-350 millions le nombre de cas de gastroentérites associées à ce virus causant 4300 décès (353). Leurs modes de transmission sont l'eau et la nourriture contaminées ainsi que les contacts entre individus (354).

4.2.3 Les bactéries entériques

Plusieurs bactéries causent des infections entériques, mais seulement les cinq plus importantes au niveau mondial ne seront abordées, c'est-à-dire *Campylobacter jejuni*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli* entérique.

Chaque année *Campylobacter jejuni* est responsable de 400 millions de cas de diarrhée mondialement et est la deuxième cause de diarrhée chez des voyageurs (355). Elle se retrouve normalement dans l'eau et est une bactérie commensale des intestins de plusieurs animaux dont les oiseaux. Dans les pays industrialisés, les cas d'infections par cette bactérie proviennent surtout de la consommation de poulets contaminés lors de la préparation. *Campylobacter jejuni* possède quatre grandes propriétés la rendant pathogène :

la motilité, l'adhérence, l'invasion et la production de toxines (356). L'infection des cellules épithéliales intestinales est rare et les toxines sont considérées comme étant le principal facteur de la pathogénèse. La production de plusieurs toxines a été rapportée, mais la seule ayant été clonée et caractérisée est la toxine cytolétale distendante (CDT). Cette toxine cause l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S ou G2/M dépendant du type cellulaire (357). Finalement la présence d'une entérotoxine semblable à la toxine du choléra, c'est-à-dire causant une augmentation de l'AMP cyclique, a également été proposée mais demeure controversée (356).

La bactérie *Shigella* est l'agent responsable de la Shigellose. Elle sévit principalement dans les pays en voie de développement et affecte 90 millions d'individus avec plus de 100 000 décès par année. De plus, elle touche environ 500 000 militaires et voyageurs en provenance des pays industrialisés. Les trois principales espèces sont *S. sonnei*, *S. flexneri* et *S. dysenteriae*. Trois toxines sont connues chez *Shigella*, soit l'entérotoxine 1 et 2 (SHET 1 et 2) et la Shiga toxine (358). Cette dernière est la première toxine découverte chez *Shigella* et inhibe la synthèse protéique dans les cellules eucaryotes suite à l'inactivation des ribosomes.

Salmonella enterica typhi cause la fièvre typhoïde chez 16 à 33 millions d'individus causant 500 000 à 600 000 décès chaque année. La bactérie est transmise par l'eau et les aliments contaminés et, tout comme *Campylobacter jejuni*, elle code pour une toxine cytolétale distendante qui cause l'arrêt du cycle cellulaire.

Vibrio cholerae est une bactérie Gram négatif responsable du choléra. Dans les régions les plus démunies, le choléra est souvent endémique et des porteurs asymptomatiques causent l'émergence de nouveaux cas, principalement chez les enfants, les personnes âgées et les voyageurs (359). Sept pandémies ont été recensées dont la 7^{ème} fait encore rage en Asie du sud et au Bangladesh avec plus de 1.8 million de cas et 27 000 décès annuellement (organisation mondiale de la santé, 2006). Avant l'apparition de la thérapie de réhydratation, qui consiste à boire de l'eau non-contaminée contenant des électrolytes, le choléra était associé à un taux de mortalité de plus de 40%. Sa transmission peut se produire par voie fécale-orale et par la consommation d'eau contaminée. La toxine produite par *Vibrio cholerae*, la toxine du choléra, est en grande partie responsable de la

pathogénèse. C'est une protéine multimérique constituée d'une sous-unité centrale active (CTA) entourée de cinq sous-unités B (CTB) (Figure 18). Les sous-unités B sont responsables de l'attachement de la toxine aux cellules tandis que la sous-unité A est responsable de l'effet toxique. Le mécanisme d'action de la toxine du choléra est décrit en de plus amples détails dans la section 4.3.

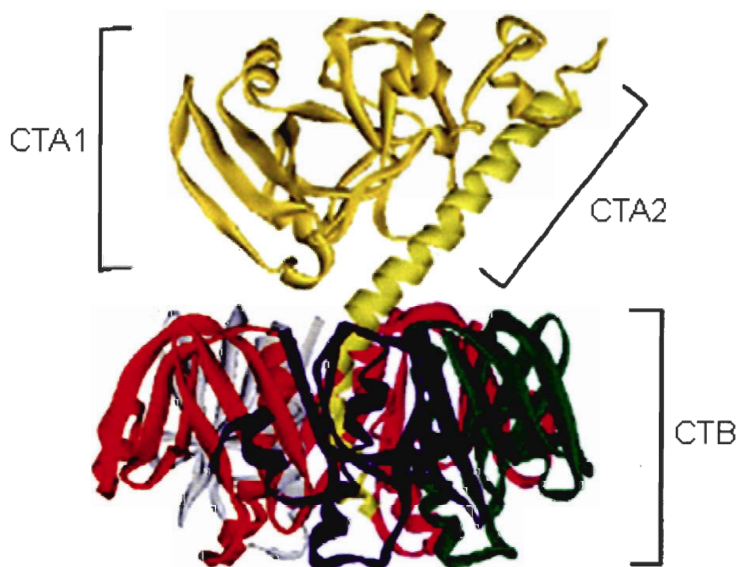


Figure 18 Structure de la toxine du choléra

La sous-unité A (CTA, en jaune) consiste en deux chaînes de polypeptides, CTA1 et CTA2 liées par un seul pont disulfure. La sous-unité CTA1 est enzymatiquement active et possède une activité ADP-ribosyltransférase. La sous-unité CTA2 fait le lien entre la CTA1 et la CTB. La sous-unité B (CTB) comprend cinq chaînes de polypeptides identiques (vert, mauve, gris, rouge et bleu) possédant la capacité de lier le GM1.

Modifiée de Vanden Broeck et al (359)

Les diarrhées causées par *Escherichia coli* demeurent problématiques dans les pays en voie de développement. Tout comme la majorité des pathogènes causant des diarrhées, *E. coli* se transmet par l'ingestion d'eau ou de nourriture contaminées. Plusieurs souches de *E. coli* sont associées à ces diarrhées et diffèrent selon leurs facteurs de virulence (360). Certaines souches, telles que la O157:H7, ont été lysogénisées par un phage codant pour la toxine Shiga de *Shigella dysenteriae* (361). D'autres codent pour les toxines labile (LT) ou stable (ST) à la chaleur comme *Escherichia coli* entérotoxique (ETEC). Cette souche de *E. coli*

est la plus commune et elle responsable de 25% des cas de diarrhée persistante nécessitant une hospitalisation. Elle touche annuellement 280 millions d'individus et cause 400 000 décès surtout chez les enfants de moins de 2 ans (362). Tout comme dans le cas de *Vibrio cholerae*, la pathogénèse est associée aux deux toxines LT et ST. Environ 50% des souches de ETEC sécrètent seulement la toxine ST, 25% sécrètent seulement la toxine LT et 25% sécrètent les deux toxines (355). La toxine ST est un peptide de 18 ou 19 acides aminés qui lie la guanylate cyclase résultant en une augmentation du GMP cyclique (363). Elle augmente également le calcium intracellulaire et entraîne la sécrétion de Cl⁻. La toxine LT est similaire à la toxine du choléra tant au niveau structurel que fonctionnel et sera décrite en de plus amples détails dans la section 4.3.

4.3 La toxine du choléra et l'entérotoxine LT d'*Escherichia coli*

La toxine du choléra et l'entérotoxine d'*Escherichia coli* sont très similaires tant d'un point de vue structurel que fonctionnel. Elles sont composées d'une sous-unité A (CTA), la sous-unité active, et de cinq sous-unités B (CTB). La sous-unité A est composée de deux chaînes polypeptidiques, CTA1 et CTA2, liées entre elles par un pont disulfure. La CTA1 possède une activité ADP-ribosyltransférase tandis que la CTA2 sert de lien entre la CTA1 et la CTB. La sous-unité B est responsable de la liaison au ganglioside GM1 présent à la surface des cellules épithéliales intestinales. Suite à leur liaison au GM1, ces toxines sont internalisées par des mécanismes dépendants des caveosomes et des radeaux lipidiques (364), mais peuvent également être internalisées par des voies dépendantes de la clathrine (365), dépendantes de Arf6 ou indépendantes de Arf6 et de la dynamine (359). Après leur internalisation, elles sont dirigées vers le trans-Golgi, puis vers le réticulum endoplasmique par un mécanisme de transport rétrograde (Figure 19). Au niveau du réticulum endoplasmique, la CTA1 se dissocie du complexe CTA2/CTB. Cette dissociation serait catalysée par la protéine cellulaire PDI qui réduit les ponts disulfures. La CTA1 est alors dépliée et transportée au niveau du cytoplasme.

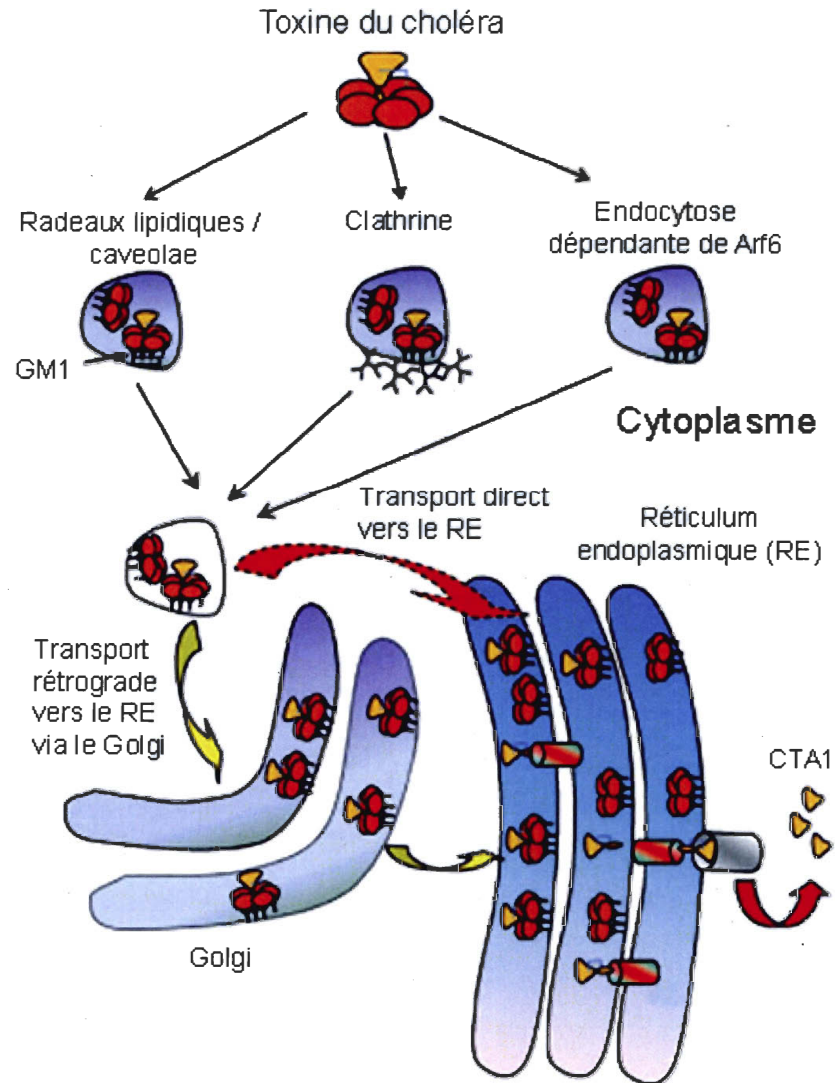


Figure 19 Mécanismes de transport intracellulaire de la toxine du choléra

La toxine du choléra lie son récepteur GM1 et entre dans la cellule par endocytose par différents mécanismes. Elle est transportée vers le Golgi puis le réticulum endoplasmique par des mécanismes de transport rétrograde. Dans le réticulum endoplasmique, elle se dissocie en CTA1 et CTA2/CTB et CTA1 est transloquée vers le cytoplasme.

Modifiée de Sanchez et Holmgren (366)

La CTA1 ADP-ribosyle la protéine Gas, une protéine régulant l'activité de l'adénylate cyclase, qui devient alors constitutivement active. La stimulation continue de l'adénylate cyclase par la protéine Gas ribosylée entraîne une augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire (Figure 20). Finalement la protéine kinase A (PKA) est activée par l'AMP

cyclique et phosphoryle les canaux chloriques entraînant leur ouverture. La sécrétion de Cl^- est accompagnée d'un mouvement osmotique vers la lumière intestinale résultant ainsi en des diarrhées (359).

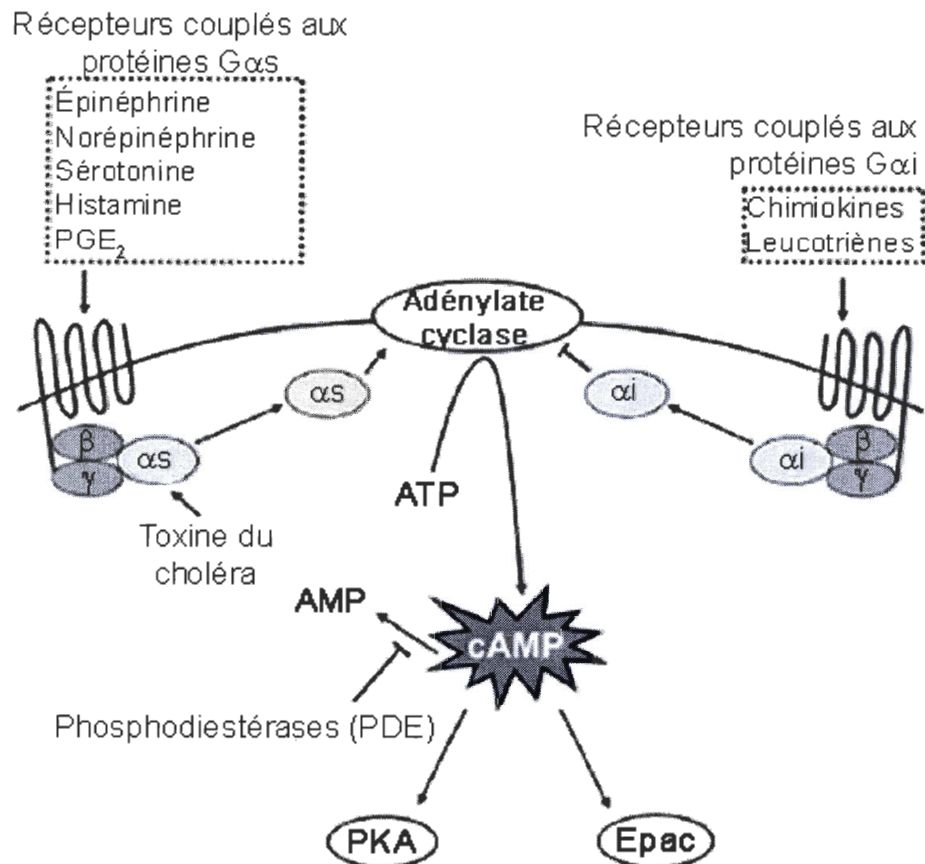


Figure 20 Mécanisme d'activation de l'adénylate cyclase par la toxine du choléra

La liaison d'un agoniste aux récepteurs couplés aux protéines G induit un changement de conformation résultant en la libération de la sous-unité G_{α} du complexe $\beta\gamma$. La liaison de la sous-unité G_{α} à l'adénylate cyclase peut soit stimuler ($G_{\alpha s}$) ou inhiber ($G_{\alpha i}$) la production d'AMPc par l'enzyme. La production d'AMPc peut également être contrôlée par des produits microbiens. La toxine du choléra cause une augmentation de la production d'AMPc par l'ADP-ribosylation de la sous-unité $G_{\alpha s}$ qui active alors constitutivement l'adénylate cyclase. Les phosphodiésterases dégradent l'AMPc et permettent le contrôle des niveaux intracellulaires d'AMPc. L'AMPc signale en interagissant avec les molécules effectrices, la protéine kinase A (PKA) ou les protéines d'échange directement activées par l'AMPc (Epac).

Modifiée de Serezani et al (367)

4.4 La flore intestinale et le système immunitaire

4.4.1 La tolérance versus la réponse immune

Le tractus gastro-intestinal est une porte d'entrée importante pour les pathogènes, mais également le domicile d'une variété de bactéries commensales bénéfiques pour l'hôte. Un des rôles importants du système immunitaire intestinal est donc de défendre l'hôte contre les pathogènes qui lui sont nocifs sans toutefois développer une réponse inflammatoire destructive envers la flore intestinale. Les cellules dendritiques, dont les deux principales fonctions sont de capter/présenter les antigènes et d'activer les lymphocytes (368), sont capitales pour le maintien de cette homéostasie et l'élaboration d'une réponse immune adéquate. La capture des antigènes par les cellules dendritiques peut se faire directement suite à un bri de l'intégrité de la barrière épithéliale ou par l'extension des dendritiques au niveau de la lumière intestinale (275). Elle peut également se faire de manière indirecte par la phagocytose de cellules apoptotiques ou d'exosomes portant à leur surface des antigènes (369, 370) ainsi que par la transcytose d'antigènes de la lumière intestinale vers le GALT par les cellules épithéliales et/ou les cellules M (371). Suite à la capture et à la présentation des antigènes, les cellules dendritiques vont subir un processus de maturation qui peut être induit par des cytokines pro-inflammatoires (ex. IL-1, TNF- α et IFN- α/β) (372), des composés intracellulaires (ex. acide urique) (373), des molécules de costimulation (ex. CD40L) (374-377) ou via l'interaction entre les PAMPs et les TLRs (378). Les cellules dendritiques matures vont alors migrer vers les tissus lymphoïdes organisés (MLN et les zones de cellules T des plaques de Peyer) et activer les lymphocytes T naïfs (379). Malgré qu'elles ne sont présentes qu'en petit nombre dans les tissus, chaque cellule dendritique peut influencer la fonction de 300 à 1000 lymphocytes T (274) et ainsi activer la réponse immune.

Une variété de sous-populations de cellules dendritiques sont présentes dans les différentes structures du GALT telles que les plaques de Peyer, les ganglions mésentériques et la lamina propria (Tableau 6) (239). Ces cellules dendritiques sont séparées en deux types, les cellules myéloïdes et les cellules plasmacytoïdes, ainsi qu'en plusieurs phénotypes selon

l'expression des marqueurs de surface CD11b, CD11c, CD8 et CD4 (Tableau 6) (380). Les cellules dendritiques myéloïdes sont associées à une production élevée d'IL-12 et à la génération d'IFN- γ par les lymphocytes T_H1 (381, 382) tandis que les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont associées à une production d'IFN- α qui mène à la génération d'IFN- γ . Les cellules dendritiques plasmacytoïdes sont également capables de générer une réponse de type T_H2 (381).

Cellule dendritique		Compartiment intestinal				Commentaire
Type	Phénotype	MLN	piLP	cLP	PP	
cDC	CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD11b ⁺ CD11c ⁺	+++	+++	+++	+++	Expriment de CD103 ou CX3cR1 Présentent des Ag intestinaux Impliquées dans la conversion des Treg dépendant de l'acide rétinoïque Permettent la domiciliation des lymphocytes T aux tissus intestinaux via l'induction de l'expression du CCR9 et α 4 β 7
	CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD11b ⁺ CD11c ⁺	+++	-	-	++	Induisent la réponse des lymphocytes T CD4
	CD4 ⁻ CD8 ⁺ CD11b ⁻ CD11c ⁺	++	-	-	++	Induisent la réponse des lymphocytes T CD8
pDC	B220 ⁺ PDCA1 ⁺ CD11c ^{int}	+	+/-	+/-	+	Produisent de l'IFN- α/β

Tableau 6 Cellules dendritiques mucosales et leurs fonctions proposées

cDC : *conventional dendritic cell* ; pDC : *plasmacytoid dendritic cell* ; MLN : *mesenteric lymph nodes*; piLP : Lamina propria du petit intestin ; cLP : Lamina propria du colon ; PP : Plaques de Peyer

Modifié de Niess (239)

La décision entre l'induction de la réponse immune et la tolérance dépend entre autre des sous-populations de cellules dendritiques impliquées, des récepteurs engagés lors de l'activation des cellules dendritiques et des lymphocytes T ainsi que de l'environnement local (379). Les diverses sous-populations de cellules dendritiques expriment différents TLRs ce qui pourrait leur permettre de répondre spécifiquement aux microorganismes (383). De plus, le microenvironnement local va influencer le phénotype, l'état d'activation

et les cytokines sécrétées par les cellules dendritiques ce qui a pour conséquence d'influencer la réponse des lymphocytes T et B suite à leur activation par les cellules dendritiques (Figure 21) (384, 385). Ce microenvironnement est en partie constitué de facteurs solubles sécrétés par les cellules épithéliales intestinales suite à leur interaction avec les bactéries commensales, les pathogènes ou les protéines alimentaires (385).

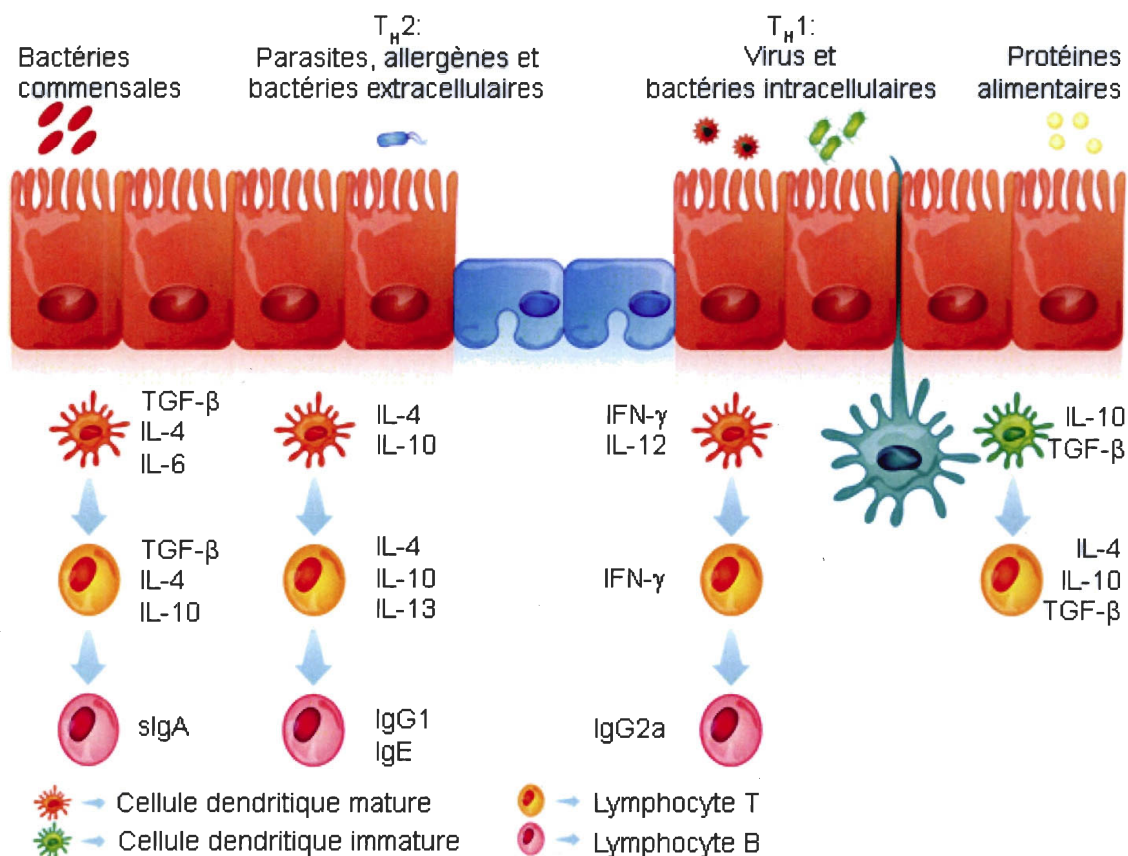


Figure 21 Réponse immune aux bactéries commensales et aux pathogènes

Les cellules dendritiques matures sont responsables de l'apprêtement et de la présentation des bactéries commensales et des pathogènes de type T_H1 et T_H2. Les cellules dendritiques immatures sont responsables de la réponse envers les protéines alimentaires. Les cellules dendritiques vont produire différentes combinaisons de cytokines dépendant de leur état d'activation et de l'antigène rencontré. Ces cytokines vont aider à définir la réponse des lymphocytes T et B. Les réponses aux bactéries commensales et aux protéines alimentaires ont des caractéristiques régulatrices (production IL-10, TGF-β, induction de Treg et l'absence de production d'anticorps systémiques), mais sont distinctes. Au contraire, la réponse aux pathogènes de type T_H1 et T_H2 génère la production d'anticorps systémiques et des profils de cytokines particuliers.

Modifiée de Smith et Negler-Anderson (386)

4.4.2 La tolérance

Chez les individus sains, c'est-à-dire ne souffrant pas d'une maladie inflammatoire de l'intestin ou de la maladie de Crohn, l'organisme ne monte pas de réponse immune contre les protéines alimentaires ou les bactéries commensales présentes dans les intestins (332, 387). Les cellules dendritiques vont toutefois capter ces antigènes et les présenter, mais ceci va induire la tolérance immunologique (388, 389). Dans le cas des protéines alimentaires, puisqu'elles ne sont pas reconnues par les TLRs, elles seront captées et présentées par des cellules dendritiques immatures qui vont alors sécréter de l'IL-10 et du TGF- β (Figure 21) (386). Dans le cas des bactéries commensales, puisqu'elles sont reconnues par les TLRs, elles seront présentées par des cellules dendritiques matures (386) et, en l'absence de signaux inflammatoires en provenance des cellules épithéliales intestinales, les cellules dendritiques vont sécréter des cytokines régulatrices telles que l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10 et le TGF- β (Figure 21) (390). La présence de ces diverses cytokines va influencer le profil de différenciation des lymphocytes T et B suite à leur interaction avec les cellules dendritiques (374).

Dans un premier temps, la présence de cytokines régulatrices (IL-4, IL-6, IL-10 et TGF- β) lors de l'activation des lymphocytes B par les cellules dendritiques (391) va favoriser la sécrétion d'IgA (392-399). Le rôle des IgA est d'empêcher les antigènes, microorganismes et autres protéines étrangères présents au niveau de la lumière intestinale de pénétrer au niveau du GALT (400). Les IgA pourraient également réguler la composition de l'environnement microbien intestinal et limiter l'inflammation locale induite par les PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) (401). Dans un deuxième temps, l'interaction entre les cellules dendritiques et les lymphocytes T naïfs en présence de ces cytokines va induire la génération de lymphocytes T régulateurs, appelés iTreg (402). Ces lymphocytes iTreg vont à leur tour produire des cytokines régulatrices (403). Il existe trois types de iTreg dépendant du type de cytokines sécrétées, soit les Tr1 (*T regulatory 1*) sécrétant de l'IL-10 (404), les cellules T auxiliaires 3 (T_H3) sécrétant du TGF- β (405, 406) et les cellules exprimant une forme membranaire du TGF- β (407, 408). L'IL-10 est une cytokine immunosuppressive qui va diminuer l'expression des cytokines de type T_H1/T_H2

(409, 410) tandis que le TGF- β est une protéine qui va contrôler la prolifération de divers types cellulaires (411). Les lymphocytes iTreg suppriment donc la réponse immune via la sécrétion de cytokines suppressives qui ont pour fonctions d'inhiber la prolifération des lymphocytes T, la production d'anticorps (404, 412) et de contrôler l'activation des cellules épithéliales et des cellules présentatrices d'antigènes par les TLRs. Les iTreg sont différents des Treg naturels qui suppriment la réponse immune via un contact cellule-cellule et ces deux mécanismes de régulation sont présents au niveau intestinal (413, 414).

4.4.3 La réponse immune

Contrairement aux individus sains dont les intestins ne sont colonisés que par des bactéries commensales, plusieurs facteurs vont favoriser le développement d'une réponse immune chez les individus infectés par un pathogène intestinal. Dans un premier temps, les cellules épithéliales vont détecter l'infection et sécréter diverses chimiokines (379) qui vont entraîner le recrutement des cellules dendritiques, des macrophages et des neutrophiles (371, 379, 415). Ces cellules n'ayant pas été en contact avec les cytokines régulatrices, elles vont permettre une meilleure réponse immune que les cellules immunes résidentes du GALT (384). Dans un deuxième temps, les pathogènes, contrairement aux bactéries commensales, sont invasifs et vont être reconnus par les cellules dendritiques des ganglions lymphatiques, en plus de celles présentes dans la lamina propria, favorisant ainsi l'induction d'une réponse immune (384, 416, 417).

Selon le pathogène rencontré, les cellules dendritiques activées vont monter une réponse immune de type T_H1 ou T_H2 (375, 418). La nature de la réponse immune (T_H1 versus T_H2) va dépendre des signaux auxquels les cellules dendritiques ont été exposées lors de leur activation et de leur interaction avec les lymphocytes T (380). Ces signaux incluent les cytokines, chimiokines (ex. CCL20, CCL5, IL-8, CCL2), prostaglandines, PAMPs, molécules de costimulation (ex. CD40L), fragments du complément, immunoglobulines et produits résultant d'un dommage cellulaire (373, 375, 380). Une réponse de type T_H1 (pathogènes intracellulaires) va être favorisée en présence d'IFN- γ et d'IL-12 (419). L'IL-12 induit la réponse de type T_H1 en favorisant la croissance et l'activité des cellules

NK, des lymphocytes T ainsi que le développement des cellules synthétisant l'IFN- γ (420-422). L'IFN- γ favorise quant à lui la réponse de type T_{H1} en entraînant la suppression de l'activité des lymphocytes T CD4⁺ de type T_{H2} (423). Une réponse de type T_{H2} (pathogènes extracellulaires) va plutôt être favorisée par la sécrétion d'IL-4, d'IL-10 et d'IL-13 (403). L'IL-4 et l'IL-13 ont des fonctions similaires et régulent entre autre la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ vers un profil T_{H2}, la commutation isotypique vers les IgE et les IgG1 et inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires (424-431). L'IL-10 va également favoriser une réponse de type T_{H2} en diminuant l'expression des cytokines de type T_{H1} (409, 410) (Figure 21). Malgré que l'IL-4 et l'IL-10 sont sécrétées lors de la réponse T_{H2}, la tolérance immunologique n'est pas induite car l'absence de TGF- β empêche l'induction des iTreg (416).

4.4.4. Le rôle des cellules épithéliales intestinales

Finalement, en plus des cellules dendritiques, les cellules épithéliales intestinales jouent un rôle important dans l'induction de l'immunité innée et acquise. Dans un premier temps, elles peuvent présenter les antigènes aux lymphocytes T. Les antigènes sont captés par pinocytose ou par endocytose via des récepteurs (FcRn, DEC205, GM1, pIgR) et sont présentés grâce aux CMH-I, aux CHM-II et aux molécules de présentation non-classiques (CD1d, MICA, MICB) (432). L'absence de molécules de costimulation à la surface des cellules épithéliales intestinales lors de l'activation des lymphocytes T va mener à l'anergie et donc à la tolérance. L'activation des TLRs peut mener à l'expression de ces molécules de costimulation et à la prolifération des lymphocytes T. Dans un deuxième temps, les cellules épithéliales intestinales peuvent transférer les antigènes aux cellules dendritiques présentes au niveau de la lamina propria (371). Finalement, elles analysent continuellement les microorganismes présents dans la lumière intestinale via le système immunitaire inné (TLR et NOD) et y répondent en sécrétant divers facteurs solubles. Leur réponse aux pathogènes est différente de celle aux bactéries commensales, ce qui permet de diriger la réponse des cellules dendritiques (384). En présence de bactéries commensales, elles sécrètent du TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) qui agit sur les cellules dendritiques en diminuant leur

production d'IL-12 en réponse aux bactéries (384). Par contre, suite à l'activation des TLRs intracellulaires et des NODs par les pathogènes invasifs, les cellules épithéliales sécrètent une variété de cytokines et chimiokines (433, 434). Ces dernières peuvent induire la chimioattraction et/ou l'activation des cellules dendritiques (435), des neutrophiles (319, 436, 437), des monocytes/macrophages (437, 438), des lymphocytes T, des lymphocytes B, des mastocytes et des éosinophiles (433). De plus, certaines substances sécrétées par les cellules épithéliales intestinales suite à une infection ou à la présence de cytokines pro-inflammatoires peuvent induire l'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1 ou VCAM-1) ce qui pourrait entraîner une augmentation de la migration des cellules immunes (439).

Chapitre 5 : Le VIH-1 et le système intestinal

5.1 La pathogénèse

Le système intestinal est une plaque tournante dans la pathogénèse de l'infection par le VIH-1. Il est impliqué dans la transmission homosexuelle ainsi que dans la transmission verticale (voir section 1.3) via l'allaitement, mais également l'ingurgitation de liquide amniotique contaminé *in utero* et de sang ou sécrétions cervicales contaminés *intrapartum* (45). Lors de la primo-infection, les organes lymphoïdes des intestins servent de sites préférentiels pour la réplication du VIH-1 et font face à une déplétion rapide des lymphocytes T CD4+ (voir section 5.3). Finalement, le système intestinal sert de réservoir viral dans tous les stades de l'infection (440).

Plusieurs facteurs peuvent influencer la transmission du VIH-1 via les muqueuses intestinales dont la présence d'une infection opportuniste, d'un traumatisme à l'épithélium intestinal ou d'ulcères. Une fois que le VIH-1 atteint le GALT, soit par transcytose, infection des cellules épithéliales intestinales ou captation par les cellules dendritiques, il va infecter ses cellules cibles. Les macrophages de la lamina propria diffèrent grandement des macrophages présents dans les autres tissus, entre autre par l'absence de l'expression du corécepteur CCR5. Ils ne sont donc pas susceptibles à l'infection par le VIH-1 et ne contribuent pas à la transmission (441). À l'opposé, les lymphocytes présents au niveau du GALT sont préférentiellement ciblés par le VIH-1. Contrairement à ceux de la circulation sanguine et des ganglions, ils sont majoritairement activés (442) et ne requièrent pas de stimulation pour être permissifs à l'infection par le VIH-1 (443). Cette caractéristique les rend beaucoup plus susceptibles à l'infection par le VIH-1 (444) et la fréquence d'infection des lymphocytes T CD4+ est dix fois plus élevée dans le GALT que dans la circulation sanguine (445). Cette réplication virale active entraîne une augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, ce qui permet le recrutement de nouvelles cibles. De plus, les dommages causés à la paroi intestinale, par la réplication active du VIH-1 et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, entraînent la translocation de

produits microbiens et l'augmentation de leur concentration plasmatique (LPS et peptidoglycan) (446).

5.2 Les manifestations cliniques

Le VIH-1 affecte la majorité des structures du système digestif dont la cavité orale, l'œsophage, le foie, la vésicule biliaire, le pancréas et les intestins (447). La majorité des pathologies associées aux intestins se manifestent sous forme de diarrhées et les entéropathies qui affectent les patients atteints du VIH-1 surviennent de la phase aiguë jusqu'au stade SIDA. Ils comprennent la diarrhée, l'inflammation du système intestinal, une perméabilité intestinale accrue et une malabsorption des acides biliaires et de la vitamine B12 (448-450). Mondialement, la diarrhée est une des causes majeures de morbidité et mortalité dues au VIH-1 (451) et dans les pays en voie de développement, les diarrhées persistantes (plus de 7 jours) affectent plus de 95% des patients sidéens. La fréquence des diarrhées est associée au degré d'immunosuppression (452). Plusieurs pathogènes peuvent être responsables de ces diarrhées dont *Cryptosporidium parvum* (parasite), *Enterocytozoon bieneusi* (parasite), cytomegalovirus, *Giardia lamblia* (parasite), *Mycobacterium avium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* (souches pathogènes) et *Clostridium difficile* (49). En plus des diarrhées, le système intestinal est le site viscéral le plus commun des sarcomes de Kaposi, une néoplasie mésoenchymale (453).

L'introduction de la trithérapie a permis de réduire la prévalence de ces infections opportunistes gastro-intestinales (454), mais certains patients VIH+ (15 à 46%) continuent de souffrir de diarrhées sans qu'aucun pathogène ne soit détecté. Une entéropathie associée au VIH-1 est souvent la cause de ces diarrhées (455). Le VIH-1 pourrait induire des diarrhées via l'activation du récepteur GPR15/Bob par la glycoprotéine de l'enveloppe virale gp120. Cette liaison entraîne une signalisation dépendante du calcium qui est associée à une dépolymérisation des microtubules et une augmentation de la perméabilité cellulaire (456). La protéine virale Tat a également un effet virotoxique en inhibant l'absorption du glucose par les entérocytes (457).

5.3 La déplétion des lymphocytes T CD4+

Une des caractéristiques les plus importantes de l'infection par le VIH-1 est la déplétion des lymphocytes T CD4+, un type cellulaire crucial pour la réponse immune. Cette déplétion a plusieurs conséquences sur la réponse immunitaire au VIH-1. Les lymphocytes T CD4+ sont importants pour l'activation et l'expansion des lymphocytes T CD8+ (458, 459). La déplétion des lymphocytes T CD4+ pourrait alors expliquer le faible pourcentage de lymphocytes T CD8+ spécifiques au VIH-1 lors de l'infection (1-2%) comparativement aux autres infections virales (jusqu'à 45% des lymphocytes T CD8+) (460).

La déplétion des lymphocytes T CD4+ survient dès la primo-infection et est beaucoup plus prononcée au niveau du GALT qu'au niveau de la circulation sanguine (461, 462). Au moment de la primo-infection, les lymphocytes T CD4+ activés présents au niveau de la lamina propria sont les principales cibles de cette déplétion. Les lymphocytes T CD4+ naïfs présents au niveau des sites inducteurs sont moins aptes à l'infection et la réplication virale et ne sont pas affectés à ce stade de l'infection (461, 462). Ce n'est qu'à la suite de la déplétion des cellules cibles préférentielles du VIH-1 que ces cellules vont être infectées et déplétées. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer la déplétion des lymphocytes T CD4+ dont la réplication virale lytique, l'apoptose (463) et/ou l'autophagie des cellules non-infectées, la destruction des lymphocytes T CD4+ par les lymphocytes T CD8+ (464) et la diminution de l'expression de la molécule CD4 par la protéine virale Nef (465). Le fait que le pic de la charge virale survient au moment où le compte des lymphocytes T CD4+ est à son plus bas (jour 11 à 14), supporte l'hypothèse de la déplétion par la réplication lytique (466, 467).

La trithérapie HAART diminue la charge virale au niveau du GALT sans toutefois la supprimer complètement et ne restaure que partiellement les niveaux de lymphocytes T CD4+ (468). Cette restauration est lente, mais peut être améliorée si la thérapie est initiée lors de la primo-infection (469). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer la restauration incomplète des lymphocytes T CD4+ au niveau du GALT. Premièrement, une suppression incomplète de la réplication virale lors de la trithérapie. Deuxièmement, un

transport insuffisant des lymphocytes T CD4⁺ de la circulation sanguine vers le GALT. La déplétion très tôt au cours de l'infection des lymphocytes T CD4⁺ exprimant le récepteur pour la domiciliation au niveau des muqueuses ($\alpha 4\beta 7$) supporte cette hypothèse. Troisièmement, les cellules repeuplant le GALT peuvent être déjà infectées ou se faire rapidement infecter par le VIH-1 et être détruites par les lymphocytes T CD8⁺. Quatrièmement, une déplétion des cellules *LTi-like* (*lymphoid tissue inducer*) a récemment été proposée (470). Les cellules LTi sont importantes au niveau embryonnaire pour le développement des plaques de Peyer. Chez les adultes, les cellules *LTi-like* supportent la formation des organes lymphoïdes associées à l'intestins, tels que les follicules de lymphocytes isolés (471), et émettent des signaux (OX40, CD30) nécessaires à la survie des lymphocytes naïfs (470). Puisque les cellules *LTi-like* murines sont CD4⁺CD3⁻ et expriment également le CXCR4 et le CCR5, leur équivalente humaine pourrait être une cible du VIH-1. L'infection et/ou la déplétion de ces cellules lors de la primo-infection pourrait entraîner une perte du signal OX40 et CD30 résultant en une diminution de la prolifération des lymphocytes T naïfs et une diminution des comptes de lymphocytes T CD4⁺. Finalement, une mauvaise biodisponibilité des drogues antirétrovirales au niveau du GALT pourrait expliquer la réplication virale. Les cellules épithéliales intestinales expriment des « protéines de résistance aux drogues » qui ont une certaine spécificité pour les inhibiteurs de protéases et les analogues de nucléotides (472). Ces protéines pourraient réduire la concentration locale des drogues antirétrovirales et permettre une faible réplication du virus et ainsi limiter la restauration des lymphocytes T CD4⁺.

Chapitre 6 : Les objectifs de recherche

6.1 La problématique

Les cellules épithéliales intestinales forment une barrière étanche qui sépare l'environnement stérile des organes lymphoïdes associés à l'intestin (GALT) du contenu non-stérile de la lumière intestinale. Elles sont en contact continu avec les médiateurs de la réponse immune présents au niveau du GALT, mais également avec les bactéries commensales et les pathogènes potentiellement présents au niveau de la lumière intestinale. Ces cellules sont également les premières à venir en contact avec les particules virales du VIH-1 lors de la transmission verticale post-partum et/ou de la transmission sexuelle ano-génitale. Les effets de l'environnement extracellulaire de ces cellules sur leur susceptibilité à l'infection par le VIH-1 demeurent cependant inconnus à ce jour.

6.2 Les objectifs

Les objectifs du projet de recherche étaient donc d'étudier les effets potentiels de diverses molécules présentes dans l'environnement extracellulaire des cellules épithéliales intestinales sur leur susceptibilité à l'infection par le VIH-1. Dans un premier temps, nous avons choisi d'analyser l'effet des diverses cytokines présentes au niveau du GALT. Plus précisément, nous voulions déterminer quelle(s) cytokine(s) était(ent) capable de moduler l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1 et de déterminer l'étape du cycle viral qui était affectée. Dans un deuxième temps, nous avons voulu déterminer si les pathogènes entériques ou des molécules sécrétées par ces pathogènes pouvaient moduler l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1. Dans cette optique, nous avons analysé si la présence de la toxine du choléra, une toxine sécrétée par la bactérie *Vibrio cholerae*, pouvait moduler l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1, et si oui par quel mécanisme.

Section 2 :

Articles scientifiques

Chapitre 7 : Effets des cytokines sur l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1

7.1 Résumé

Les cellules épithéliales intestinales sont en contact continu avec les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT). Les infections gastrointestinales causées par divers virus, bactéries et parasites et/ou la présence d'une maladie inflammatoire intestinale peuvent moduler le réseau de cytokines du GALT. L'effet de ces différentes cytokines sur la susceptibilité des cellules épithéliales intestinales à l'infection par le VIH-1 demeure cependant inconnu. Dans cette étude, nous montrons que l'IL-1 α , l'IL-1 β et le TNF- α induisent la transactivation du VIH-1 dans la lignée cellulaire colorectale HT-29. Nous montrons également que l'IL-4, et plus faiblement l'IL-13, inhibent la réplication du VIH-1 sans affecter sa transactivation. De plus, l'IL-4 inhibe, proportionnellement à la dose, l'infection des cellules HT-29 par des particules du VIH-1 pseudotypées avec les enveloppes des virus AMLV, HTLV-1 et VSV. La diminution de l'infection par l'IL-4 pourrait partiellement être due à une diminution de l'expression du galactosyl céramide et du CXCR4, les récepteurs reconnus par le VIH-1 sur les cellules épithéliales intestinales. Pour les virus pseudotypés VSV-G, un essai de fusion a montré que cette étape n'est pas affectée par l'IL-4, suggérant ainsi qu'une étape post-fusion est affectée. Une diminution de la complétion de la transcription inverse indique que l'IL-4 pourrait affecter cette étape, ou n'importe quelle étape antérieure. En résumé, notre étude suggère pour la première fois que l'IL-4 affecte une étape précoce post-fusion du cycle viral du VIH-1.

7.2 Contributions

Le design expérimental et la rédaction du manuscrit ont été effectués par Sonia Gauthier. Mme Sylvie Méthot, Dr Michel Ouellet, Dr Corinne Barat et Dr Michel J. Tremblay ont révisé le manuscrit.

7.3 Premier article scientifique

Interleukin-4 inhibits an early phase in the HIV-1 life cycle in the human colorectal cell line HT-29¹

Sonia Gauthier* and Michel J. Tremblay*²

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

Running title: IL-4 inhibits HIV-1 infection of HT-29 cells

Keyword: AIDS, viral, cytokines

Abstract

Intestinal epithelial cells are continuously in contact with the gut-associated lymphoid tissues (GALT). Gastrointestinal infection by viruses, bacteria and parasites or the presence of an inflammatory bowel disease may influence the GALT cytokine network. However, the effect of the different cytokines on susceptibility of human intestinal epithelial cells to HIV-1 infection remains to be defined. In this study, we show that IL-1 α , IL-1 β and TNF- α induce transactivation of HIV-1 in the human colorectal epithelial HT-29 cell line. We also demonstrate that IL-4, and to a lesser extent IL-13, inhibit infection with reporter HIV-1 viruses pseudotyped with NDK-Env without affecting integrated proviral DNA. Furthermore, IL-4 also inhibits, in a dose-dependent manner, infection of HT-29 cells with HIV-1-based AMLV-Env, HTLV-I-Env and VSV-G pseudotypes. The IL-4-directed diminution of virus infection may be partly due to a decrease expression of CXCR4 and galactosyl ceramide, the recognized HIV-1 receptors in human intestinal epithelial cells. For VSV-G-pseudotyped viruses, a fusion assay showed that this event is not affected by IL-4, thus suggesting that a post-fusion step is affected. A reduction in the completion of DNA retrotranscription indicates that IL-4 may affect this step, or any prior event. Overall, our data indicate that IL-4 is negatively affecting an early post-fusion step in the HIV-1 replication cycle in HT-29 cells.

Introduction

Mother-to-child transmission of HIV-1 is the primary source of paediatric infections worldwide. Vertical transmission involving the gastrointestinal tract, notably the gut-associated lymphoid tissue (GALT), can occur *in utero*, through swallowing of infected amniotic fluid; *intrapartum*, following contact with secretions and infected blood cells; and *postpartum*, through breast feeding (1). One third to one-half of vertical transmission cases in breast-fed infants can be attributed to breast milk (2). Both infected cells and free viruses have been documented to contribute to this transmission process (3) and the risk of HIV-1 propagation increases with their concentration in breast milk (4, 5). Avoiding breastfeeding is however not always desirable, since it allows passive immunity against many pathogens (6). In developing countries, the rate of vertical transmission of HIV-1 through breast feeding may actually be lower than the rate of mortality occurring with formula milk, notably through utilization of contaminated water for its preparation (7). In addition to being involved in mother-to-child transmission, the GALT plays also a role in transmission events resulting from anal-genital contacts (8). In comparison to intestinal ones, rectal epithelial cells express more HIV-1 receptors and are more easily traumatized, leading to a high risk of HIV-1 transmission. The receptive partner in anal intercourse is at higher risk of HIV-1 infection due to more frequent traumas to the epithelium, exposition to larger quantities of infectious liquid and retention of this infectious liquid within the body after intercourse (9). The inserting partner is also at risk of HIV-1 transmission but to a lesser extent. All these infection modes highlight the necessity of a better understanding of the factors influencing infection via intestinal epithelial cells.

In the intestine, epithelial cells, M cells and dendritic cells represent potential portals of entry for HIV-1. Among them, epithelial cells constitute the most abundant cell type lining the mucosa and are the first physical barrier that HIV-1 must pass through to gain access to the GALT. Traumas to the epithelium occurring during sexual intercourse may allow direct infection of CD4⁺ T lymphocytes present in the GALT without prior infection of intestinal

epithelial cells. However, such traumas are not frequent during breastfeeding and, in this case, HIV-1 may gain access to the GALT through the infection of epithelial cells. Although *in vivo* infection of those cells does not seem to be frequent (10), it may take more importance during intestinal transmission of HIV-1 in the absence of traumas. It is noteworthy that epithelial cells from intestine, colon and rectum do not express the main HIV-1 receptor, CD4. Instead, HIV-1 uses the glycolipid galactosyl ceramide (GalCer) as the main surface receptor on those cells (11). As for coreceptors, intestinal epithelial cells express, *in vivo*, the chemokine receptor CCR5 but not CXCR4. However, rectal and colonic epithelium may express CXCR4 in addition to CCR5 (12, 13).

The intestinal tract is persistently in contact with commensal bacteria and different antigens. Those bacteria and antigens will influence secretion of cytokines by dendritic cells present in the GALT. In a steady-state condition, when only commensal bacteria and food proteins are present in the intestine, dendritic cells produce regulatory cytokines such as IL-4, IL-6, IL-10 and TGF- β (14). The interaction between dendritic cells and naïve T lymphocytes in the presence of those regulatory cytokines favour the generation of intestinal regulatory T lymphocytes (iTreg) (15). IL-10 and TGF- β are also secreted by iTregs but their main functions are to inhibit T lymphocytes proliferation and antibody production, and to control Toll-like receptors (TLR)-mediated activation of antigen-presenting and epithelial cells (16, 17). In the presence of a pathogen, dendritic cells will produce IL-4 and IL-10 in the case of a T_H2 immune response and IL-1, IL-12, TNF- α and IFN- γ in the case of a T_H1 immune response (18). The nature of the immune response depends on the signals present during dendritic cells activation and interaction with T lymphocytes. Those signals include cytokines, chemokines, pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), costimulation molecules, complement fragments, antibodies and products resulting from cell damage (19).

Epithelial cells also play an important role in the activation of the innate and adaptive immune system. They constantly scan microorganisms present in the intestinal lumen

through their TLR and nucleotide-binding oligomerisation domain protein (NOD1 and 2). Their response to pathogens is different from their response to commensal bacteria, and they help dendritic cells to direct the immune response. In the presence of commensal bacteria, epithelial cells secrete thymic stromal lymphopoietin (TSLP) that act on dendritic cells by decreasing their IL-12 production (20). In contrast, following invasion by a pathogen and intracellular activation of TLR and NOD, epithelial cells produce a variety of chemokines, cytokines and β -defensins (21-23). Those signals generated by epithelial cells result in chemo-attraction and/or activation of dendritic cells, neutrophils, monocytes/macrophages, T and B lymphocytes, mast cells and eosinophils (21).

Given that intestinal epithelial cells may act as key elements in the process of HIV-1 transmission and considering that this cell type is exposed to a large variety of soluble factors, it is of prime importance to define whether virus replication can be affected by cytokines normally present within the GALT. We provide evidence here that the proinflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β and TNF- α enhance virus gene expression, whereas IL-4 and IL-13 reduce HIV-1 infection in the human colorectal cell line HT-29.

Materials and Methods

Reagents. Recombinant human IL-1 α , IL-1- β , IL-6, IL-10, IL-13 and TNF- α were purchased from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA). Recombinant human IL-4 was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) and bafilomycin A1 from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). The following reagent was obtained through the AIDS reagent and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: Zidovudine.

Cells. The human colorectal epithelial cell line HT-29 (ATCC HTB-38; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) was grown in DMEM/F12 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen Life Technologies; Burlington, Canada) and antibiotics. Human embryonic kidney 293T cells were grown in DMEM (Invitrogen Life Technologies) supplemented with 10% FBS and antibiotics.

Plasmids. The pNL4-3Luc+Env-Vpr⁺ expression vector encodes the complete HIV-1 genome, in which the envelope gene has been inactivated, and the luciferase gene inserted in the region coding for Nef. The pcDNA-1-AMLV-Env vector expresses the amphotropic murine leukemia virus (MLV) envelope (Env) gene under the control of the MLV long terminal repeat (LTR). Both vectors were kindly provided by Dr. N.R. Landau (NYU School of Medicine, NY, USA). The pSV-HTLV-I-Env vector harbours the HTLV-I gp46 cDNA under the control of the SV40 promoter (kindly supplied by Dr. R. Sutton, Baylor College of Medicine, Houston, USA). The pJD19 vector expresses the wild type HIV-1 NDK Env under the control of the NDK LTR (obtained from Dr. U. Hazan, Institut Cochin de Génétique Moléculaire, Paris, France). The pHCMV-G vector expresses the Env glycoprotein G (VSV-G) of the broad host-range vesicular stomatitis virus, under the control of the human cytomegalovirus promoter (obtained from Dr. J.C. Burns, University of California, San Diego, USA). The pNL4.3 Δ Env vector encodes a complete HIV-1 genome comprising a -1 frameshift in the Env precursor (kindly provided by Dr. D.E. Ott,

National Cancer Institute, Frederick, USA). The Pr55^{Gag}/RLuc vector encodes the full-length HxB2 Gag polyprotein in frame with the *Renilla reniformis* luciferase gene (kindly supplied by Dr. A.J. Mouland, Lady Davis Institute for Medical Research, Montreal, Canada).

Virus production. Pseudotyped HIV-1 viruses were prepared as previously described (24). Briefly, 293T cells (2×10^6 cells) were seeded in 75-cm² flask and cotransfected the next day with the AMLV-, HTLV-I- or NDK-Env expression vector (20 μ g) and the Env-deficient HIV-1 backbone plasmid pNL4-3Luc+Env-Vpr+ (10 μ g) by the calcium-phosphate method. For VSV-G pseudotyped viruses, pHCMV-G (2 μ g) was cotransfected with pNL4-3Luc+Env-Vpr+ (28 μ g). For the fusion assay, VSV-G pseudotyped viruses containing Pr55^{Gag}/RLuc were produced by cotransfecting pNL4-3 Δ Env (20 μ g), Pr55^{Gag}/RLuc (10 μ g) and pHCMV-G (2 μ g). Virus was harvested 40 h after cotransfection, filtered through a 0.22 μ m-pore-membrane and stored at -80°C until used. Virus content was measured using an in-house sensitive double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) specific for the viral p24 protein (25).

Infection assay. HT-29 cells (2×10^5) were in some cases first treated with a cytokine (10 ng/ml of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, or TNF- α ; or 0.001 to 100 U/ml of IL-4) for 24 h and washed. The cells were then infected for 24 h with a standardized amount of NL4-3Luc+Env-Vpr+ viruses pseudotyped with NDK-Env or VSV-G (20 ng of p24). After the infection, the cells were washed, and then either left untreated or treated with one of the cytokines for 24 h and lysed in 100 μ l of lysis buffer (125 mM Tris-Base, 10 mM DTT, 5% Triton X-100 and 50% glycerol). Luciferase activity was measured using an MLX microtiter luminometer (Dynex Technologie; Chantilly, VA, USA) and is expressed as relative luciferase units (RLU).

Flow cytometry analysis. HT-29 cells (1×10^6) were either left untreated or treated with IL-4 (100 U/ml) for 24 h. Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS), incubated with Versene and detached from the culture plate by scraping with a rubber policeman. Non-specific sites were blocked by incubating cells with 1% bovine serum albumin (MP Biomedicals; Solon, OH, USA), 10% human serum and 20% goat serum (Jackson ImmunoResearch; West Grove, PA, USA) in PBS. Cells were then incubated for 30 min at room temperature with fluorescein isothiocyanate (FITC)- or phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibodies against CD54 (BD Pharmingen), CXCR4 (BD Pharmingen) or isotype-matched irrelevant control antibodies (BD Pharmingen). For CD40 (clone G28.5), MHC-I (clone W6/32), CD55-biotin (Ancell; Bayport, MN, USA), CD81 (clone 5A6, Sigma-Aldrich; Oakville, Canada) and galactosylceramide (GalCer) (Millipore; Billerica, MA, USA), cells were incubated for 30 min at room temperature with the specific or isotype-matched control antibody, washed twice with PBS and incubated for 30 min at room temperature with fluorescein isothiocyanate (FITC)- or phycoerythrin (PE)-conjugated secondary antibody. For CD55-biotin, streptavidin-PE (BD Pharmingen) was used as a secondary antibody. Cells were then washed twice with PBS, fixed with 2% paraformaldehyde for 30 min at room temperature and then analyzed by flow cytometry (Epics ELITE ESP; Coulter Electronics, Burlington, Canada).

Virus entry test. HT-29 cells (2×10^5) were either left untreated or treated with IL-4 (100 U/ml) for 24 h and washed. Cells were then incubated with AMLV-Env, HTLV-1-Env, NDK-Env, or VSV-G pseudotyped NL4-3Luc+Env-Vpr+ viruses for 4 h (20 ng of p24). Cells were trypsinized, washed 4 times with PBS and resuspended in 100 μ l of lysis buffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20 and 0.5% Triton X-100). Virus entry was monitored using the p24 test.

Virus fusion assay. Fusion events were assessed using a previously described method (26). Briefly, HT-29 cells (1×10^6) were either left untreated, treated with IL-4 (100 U/ml) for 24 h and washed, or treated with bafilomycin A1 (100 nM) for 30 min. Next, cells were

incubated with VSV-G pseudotyped viruses containing Pr55^{Gag}/RLuc (100 ng of p24) for 4 h. In the case of bafilomycin A1, the drug was left during the fusion assay. Cells were then detached by a trypsin treatment, washed twice with PBS and resuspended in 100 μ l luciferase assay buffer. *Renilla* luciferase activity was measured in live cells using a MLX microtiter luminometer (Dynex Technologie; Chantilly, USA) and is expressed as relative luciferase units (RLU).

Retrotranscription assay. HT-29 cells (1×10^6) were either left untreated, treated with IL-4 (100 U/ml) for 24 h and washed, or treated for 30 min with zidovudine (AZT) (10 μ M). Cells were then infected with VSV-G pseudotyped NL4-3Luc+Env-Vpr+ viruses for 24 h. In the case of AZT-treated cells, the drug was left during the infection. Total cellular DNA was isolated using the DNeasy Tissue Kit as recommended by the manufacturer (QIAGEN; Mississauga, Canada). Retrotranscription was measured by real-time PCR using M667 and M661 primers corresponding respectively to nucleotide positions 496-516 (LTR) and 695-672 (Gag) in HIV-1 sequence as described previously (27).

Statistical analysis. Statistical analyses were carried out according to the methods outlined in Zar (1984) (28). Means were compared using either the Student's test or single factor ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison when more than two means were compared. Because values vary between different experiments, a repeated measures ANOVA test had to be used. P values of less than 0.05 were deemed statistically significant, whereas p values lower than 0.01 were considered highly significant. Computations were carried out using GraphPad PRISM version 3.03 statistical software.

Results

Cytokines modulate HIV-1 infection of HT-29 cells. In close contact with intestinal epithelial cells, the GALT cytokine network may influence the cell response to pathogens. In this study, we analysed the effects of different T_H1/T_H2 (IL-4, IL-6, IL-10 and IL-13) and proinflammatory cytokines (IL-1 α , IL-1 β and TNF- α) on the susceptibility of HT-29 colorectal epithelial cells to HIV-1 infection. More precisely, we were interested in monitoring the possible modulatory effect of cytokines on pre- and post-integration events. To this end, we used a virus containing the firefly luciferase reporter gene inserted into its genome. As luciferase is only produced following productive infection, using them to assess the infection level presents the advantage of not including the virus input background in the measure, which is normally the case when assessing the major viral core protein p24. First, for measuring the effect of the cytokines on viral replication, HT-29 cells were treated for 24 h with one of the different cytokines tested and next infected with reporter viruses pseudotyped with NDK-Env. Moreover, to analyse the effect on virus gene expression, the cells were infected with the same viruses, but stimulated with a cytokine only 24 h later. Initial experiments were conducted with NDK-Env pseudotypes because this X4-tropic viral strain is known to efficiently infect HT-29 cells (29). As illustrated in Fig. 1A, virus replication was reduced by 60 and 35% upon a pre-treatment with IL-4 and IL-13, respectively. Addition of these two cytokines after infection has however no effect on virus gene expression (Fig. 1B), therefore suggesting that the IL-4- and IL-13-mediated inhibitory effect only occurs at a pre-integration step. By contrast, the proinflammatory cytokines IL-1 α , IL-1 β and TNF- α increase HIV-1 expression by 8-, 7- and 25-fold, respectively. To eliminate the possibility that a difference in cell proliferation is responsible for the observed phenomenon, we performed a cell proliferation assay. No statistical difference was seen in cell proliferation between cells treated with the studied cytokines and untreated control HT-29 cells (data not shown).

IL-4-dependent inhibition of HIV-1 infection is seen with different pseudotypes. Since IL-4 and IL-13 share the same receptor on HT-29 cells and have similar biological effect (30) and given that IL-4 demonstrates a higher capacity to inhibit HIV-1 infection, our subsequent studies were aimed at gaining information on the mechanism by which IL-4 can reduce HIV-1 infection in HT-29 cells. To determine whether IL-4 can act on a post-entry step, HT-29 cells were treated for 24 h with IL-4 and infected with recombinant luciferase-encoding virions pseudotyped with AMLV-Env, HTLV-I-Env and VSV-G. As depicted in Fig. 2, the process of infection with the tested pseudotypes was inhibited by approximately 60% by a pre-incubation treatment of HT-29 cells with IL-4 for 24 h. Maintaining an IL-4 treatment during virus infection did not lead to a more potent repression of HIV-1 infection (data not shown) and addition of IL-4 at 24 h post-infection did not affect expression of integrated proviral DNA confirming our results obtained with NDK-Env pseudotypes. Given that the four studied Env glycoproteins are interacting with different cell surface receptors, it can be proposed that IL-4 is modulating a post-binding step.

As cytokines can display opposite effects depending on the final concentration used (31, 32), similar experiments were performed with increasing concentrations of IL-4 ranging from 0.01 to 100 U/ml. Infection of HT-29 cells with AMLV-Env, HTLV-I-Env, NDK-Env and VSV-G pseudotyped reporter viruses is inhibited in a dose-dependent fashion where virus replication is reduced by a concentration as low as 0.1 U/ml and reaches its maximal inhibitory activity at approximately 10 U/ml (Fig. 3).

IL-4 modulates expression of GalCer, CXCR4, MHC class I, CD55 and CD81 on HT-29 cells. It has been reported that CD4 and CCR5 are not expressed on HT-29 cells and GalCer and CXCR4 are the crucial receptors for infection of those cells by NDK virus (11, 29). Of high relevance to the present work, it has been demonstrated that IL-4 can modulate CXCR4 expression on different cell types (33-35). To determine if IL-4 treatment of HT-29 cells can affect different cell surface receptors including CXCR4, these cells were treated

for 24 h with IL-4 and then analyzed by flow cytometry. As shown in Fig. 4, IL-4 treatment results in a 36% diminution in the percentage of GalCer-positive cells. A similar 36% reduction in the number of CXCR4-expressing cells was seen in similarly treated cells. To determine if IL-4 could downregulate GalCer and CXCR4 by a direct endocytosis mechanism, as previously described for CXCR4 in monocytes (36), flow cytometry was performed 8 h after stimulation with IL-4. This shorter treatment did not result in a diminution of GalCer and CXCR4 expression (data not shown). This suggests that IL-4 interfere with the synthesis of new GalCer and CXCR4 molecules. Finally, to exclude the possibility that IL-4 is inducing a broad inhibition of protein synthesis, we measured surface expression of different cell surface markers. The mean fluorescence intensity is decreased by 39% for MHC class I (MHC-I) ($p < 0.01$) and by 32% for CD81 ($p < 0.05$). On the other hand, the mean fluorescence intensity of CD55 is increased by 2 fold ($p < 0.05$) while surface expression of CD54 remained unaffected. Altogether these results suggest that the IL-4-mediated diminution of GalCer and CXCR4 expression is not a consequence of a general inhibition in protein synthesis.

Virus entry and fusion processes are not negatively affected by IL-4 in HT-29 cells.

Having established that IL-4 downregulates surface expression of GalCer and CXCR4 on the colorectal cell line HT-29, we next performed a virus entry test. Cells were treated with IL-4 for 24 h followed by a 4 h incubation with NDK-Env pseudotyped viruses. After a trypsin treatment and three extensive washes to eliminate uninternalized virus, the intracellular p24 content was measured. As demonstrated in Fig. 5A, an IL-4 treatment unexpectedly increases entry of NDK-Env pseudotyped virus. In order to define the effect of IL-4 on post-entry events, we next tried to find a pseudotyped virus for which entry was not affected by an IL-4 treatment. We tested the three other pseudotypes (AMLV-Env, HTLV-I-Env and VSV-G) because they utilize an entry pathway (at least for VSV-G) and surface receptors different than HIV-1. Indeed, fusion of AMLV-Env and HTLV-I-Env pseudotypes normally occurs at the cell surface and is pH-independent while VSV is entering cells by endocytosis and its fusion occurs in the endosomes and is pH-dependent. Unfortunately, entry of AMLV-Env and HTLV-I-Env pseudotyped virus was too weak to

test the efficacy of IL-4 (data not shown). Entry of VSV-G pseudotyped virus is diminished by 27% in the presence of IL-4 compared to untreated cells (Fig. 5B). Thus, it was not possible to use a pseudotyped virus that is not affected by IL-4.

Viral entry does not necessarily correlate with viral fusion especially in epithelial cells where a high level of endocytosis occurs. In classical HIV-1 entry experiments, vesicular (thought to lead to virus degradation) and cytoplasmic viruses (responsible for productive infection) are measured as a whole. To specifically estimate viral delivery into the cytoplasm, we modified a fusion assay described by Saeed and colleagues (26). We used the Pr55^{Gag}/RLuc chimera (37) instead of the Nef-Luc vector as published previously (26) because Gag proteins are incorporated at a high level in mature virions (approximately 5,000 molecules per single virus). The basic principle of this method is that after viral fusion, the *Renilla* luciferase that is fused with Gag will have access to its substrate present in the cell cytoplasm. However, the viruses trapped into the endosomal pathway will not have access to it because, in contrast to cell membrane, the outer membranes of viruses are not permeable to *Renilla* luciferin buffer. Our modified fusion assay was used to determine the effect of IL-4 on viral fusion. Unfortunately, the assay was not sensitive enough to determine if IL-4 affects viral fusion of NDK-Env pseudotyped viruses. However, in contrast to viral entry, data illustrated in Fig. 5C demonstrate that IL-4 has no effect on fusion of VSV-G pseudotyped virus containing Gag-RLuc. The fusion assay was validated with bafilomycin A1, a vacuolar ATPase inhibitor that inhibits VSV-G fusion by disrupting endosomal acidification. Because their fusion is not affected by IL-4, VSV-G pseudotyped viruses were chosen as a good model to analyse the effect of IL-4 on post-fusion events in the HIV-1 life cycle.

IL-4 inhibits an early post-fusion step of the viral cycle. We showed that IL-4 reduces infection of HT-29 cells with NDK-Env, AMLV-Env, HTLV-I-Env and VSV-G pseudotypes at similar levels. Therefore, it is unlikely that the IL-4-dependent effect is due to a downregulation of the respective viral receptor used by the pseudotyped viruses tested.

Also, the fact that fusion of VSV-G pseudotypes is unaffected by IL-4 further supports that IL-4 is not affecting a proximal event in HIV-1 replication. All those results suggest that a post-fusion step in HIV-1 replication is most likely affected by IL-4. In order to assess a possible modulation of viral retrotranscription by IL-4, HT-29 cells were treated for 24 h with the cytokine and then infected with VSV-G pseudotypes for 24 h. Total DNA was extracted and PCR was conducted using specific primer pairs designed to detect full-length reverse-transcribed viral DNA. In some samples, the antiretroviral compound AZT was used as a control to block retrotranscription. Results depicted in Fig. 6 demonstrate that IL-4 induces a statistically significant decrease of 56% in full-length reverse-transcribed DNA levels, which corresponds to the degree of inhibition of virus infection seen in Figs. 2 and 3.

Discussion

Human intestinal epithelial cells are considered as the first physical barrier that HIV-1 encounters during intestinal transmission. These cells express many cytokine receptors (22) and their response to viral invasion may be influenced by the cytokine network prevailing in the GALT. In this study, we analysed the effect of different cytokines on the susceptibility of HT-29 cells to HIV-1 infection. Our results indicate that infection of the colorectal cell line HT-29 by HIV-1 is influenced by many cytokines. The proinflammatory cytokines IL-1 (α and β) and TNF- α increase virus gene expression by 6- and 22-fold, respectively. Previous results demonstrate that IL-1 α and IL-1 β differ in their extracellular form, IL-1 α is a cell-associated cytokine whereas IL-1 β is secreted, but they bind to the same receptor and both lead to nuclear translocation of NF- κ B. The observation that they exert similar effects on HIV-1 gene expression is thus not surprising. The TNF- α -mediated signal transduction pathway also leads to activation of NF- κ B (38). Many studies have shown that, once activated, the transcription factor NF- κ B will bind to enhancer sequences located within the HIV-1 LTR and drive viral expression (39-42). Therefore, it is not surprising that IL-1 (α and β) and TNF- α act as strong inducers of HIV-1 expression.

It must be noted that the active physiological concentrations of cytokines are difficult to define since they often act locally. Therefore, blood or tissue concentrations are not necessarily good indicators and it has been proposed that local concentrations might be much higher than expected (43). The final concentrations of cytokines used in this study were determined based on the *in vitro* experimental studies published in the literature.

Our results reveal for the first time that IL-4 and IL-13 both have an inhibitory effect on HIV-1 infection of HT-29 cells. IL-4 is an important type 1 cytokine that directs the immune system toward a T_H2 response. It is produced by CD4⁺ T_H2 and γ/δ T lymphocytes, basophils and mast cells. It induces an immunoglobulin class switch to IgE

and IgG4 (44) and expression of T_H2 cytokines, such as IL-5, IL-6, IL-10 and IL-13 by CD4⁺ T lymphocytes. IL-4 can bind to 2 different receptors depending on the cell type. The type 1 receptor complex is composed of IL-4R α and γ c. It is located on immune cells and can only be formed following IL-4 binding. The type 2 receptor complex, which is composed of IL-4R α and IL-13R α 1, is present on non-hematopoietic cells and can be formed following IL-4 and IL-13 binding (45). IL-13 only shares 25% amino acid sequence homology with IL-4, but since they act through a common receptor (IL-4R α /IL-13R α 1), both cytokines induce roughly similar responses. The human colorectal cell line HT-29 expresses both IL-4R α and IL-13R α 1 but not the γ c chain (30). In this cell line, IL-4 interaction with its receptor results in the dimerization of IL-4R α and IL-13R α 1 chain and activation of Jak1, Jak2 et Tyk2 (30). Tyrosine phosphorylation of receptors by a member of the Jak kinases family allows STAT6 binding through its phosphotyrosine-binding domain. STAT6 is then phosphorylated by Jak, released from the receptor and dimerized. The dimeric form can then translocate into the nucleus, where it modulates gene expression. The common signal transduction pathway induced by IL-4 and IL-13 in HT-29 cells explains the similar effect of those cytokines on HIV-1 replication (Fig. 1).

Data from published studies indicate that extracellular IL-4 can regulate HIV-1 infection positively or negatively, depending on the cell type. For example, this cytokine enhances HIV-1 replication in CD4⁺ T cells (46-49), tonsils (50) and monocytes (51, 52), whereas an inhibition is observed in monocyte-derived macrophages (MDMs) (52, 53). Most studies have investigated the ability of IL-4 to modulate virus replication and there is very limited information on the putative IL-4-mediated effect on transcription factors that can affect HIV-1 transcriptional activity. One study has shown an increased activation of AP-1 in PBMCs after stimulation with IL-4 (49) and another one has demonstrated NF- κ B translocation (52). Our results show that, in HT-29 cells, viral transcription is not affected by IL-4, since treatment of infected cells after proviral integration does not induce any change in virus-encoded luciferase activity (Fig. 1B). Those results suggest that IL-4 is exerting its inhibitory effect at an early step of the virus life cycle.

The binding of HIV-1 to its receptor and coreceptor is the first step in the process of cellular infection. Many studies have analysed the effect of IL-4 on HIV-1 receptor and coreceptor expression and, as for viral replication, results differ depending of the cell type used. Indeed, it was reported that IL-4 treatment increases expression of the main HIV-1 receptor, CD4, on microglia (54) but diminishes it on monocytes and MDMs (54, 55). Similarly, expression of the coreceptor CXCR4 is increased on CD4⁺ T cells (34, 56-62) and Langerhans cells (33) but decreased on monocytes (35, 36). Finally, IL-4 decreases CCR5 expression on CD4⁺ T lymphocytes (62), monocytes and MDMs (54, 55). However, data on receptor and coreceptors expression on HIV-1-susceptible non-hematopoietic cells are lacking. Our results show that, in the colorectal epithelial cell line HT-29, IL-4 downregulates GalCer and CXCR4 expression by 40%. Different mechanisms have been proposed to explain the IL-4-mediated downregulation of CXCR4, such as a decreased mRNA expression, protein degradation, or endocytosis due to binding of SDF-1 (the natural ligand of CXCR4) (35, 36). Taking into consideration that SDF-1 mRNA is constitutively expressed by epithelial cells of the intestine (63), it can be postulated that a downregulation of CXCR4 in HT-29 cells might involve increased synthesis of SDF-1 by IL-4 followed by a rapid endocytosis of CXCR4. Concerning GalCer, a glycolipid found in the lipid rafts and composed of a galactose linked to a ceramide, its synthesis occurs in the endoplasmic reticulum and involves multiple enzymatic reactions (64). IL-4 inhibition of GalCer expression may involve a decreased synthesis or activity of any of those enzymes. It is important to mention that IL-4 has already been shown to inhibit ceramide synthesis following TNF- α and IFN- γ treatment (65).

Receptor and coreceptor modulation may not be the only mechanism by which IL-4 affects the susceptibility of HT-29 cells to HIV-1 infection. Many crucial steps occur after viral fusion and before transcription such as decapsidation, reverse transcription, nuclear import and integration. To analyse the effect of IL-4 on these mechanisms, we had to bypass its possible effect on viral fusion via GalCer and CXCR4 downregulation. To this end, we made use of pseudotyped viruses, the major advantage of which is that attachment and fusion are the only steps that will differ from those of wild-type HIV-1 particles. Our

results show that an HIV-1-based VSV-G-pseudotyped virus is a good model to analyse potential post-fusion effects of IL-4 since its fusion is not affected by IL-4 (Fig. 5). Interestingly, IL-4 inhibits VSV-G-pseudotyped virus infection by 55% when added before infection (Fig. 2), thus suggesting that an early step of HIV-1 replication is affected. We also show here that, in the HT-29 cell line, IL-4 inhibits the completion of cDNA synthesis of VSV-G-pseudotyped viruses by 55% (Fig. 6). To our knowledge, it is the first time that an inhibition of cDNA synthesis following IL-4 treatment is reported. Previous studies, which were conducted in monocytes and showing an inhibition of HIV-1 replication by IL-4, have not detected any changes in viral DNA synthesis (35, 52). Interestingly, IL-13 has been demonstrated to diminish retrotranscription completion in macrophages (53). The proposed mechanism was an increased virus endocytosis leading to degradation and an inhibition at a pre-fusion step. However, those mechanisms could not completely explain the inhibition that we see here because we have demonstrated that some of the effects occur at a post-fusion step (Fig. 4). One possible inhibitory mechanism of IL-4 is an increased expression and/or activation of an inhibitory protein, such as APOBEC3G, TRIM5 α and/or an unknown inhibitory factor (66-68). APOBEC3G deaminates cytosine bases to uracil during the retrotranscription, a modification that is subject to reparation by the DNA excision/repair enzymes. Reparation of the cDNA by the cellular machinery leaves an abasic site vulnerable to endonucleases leading to cDNA degradation and a decreased infection (69). Cellular APOBEC3G is present in two forms, the active low molecular weight and the inactive high molecular weight (70) and recent studies have shown that it can be expressed in epithelial cells (71, 72). Alternatively, TRIM5 α and the unknown inhibitory factor bind to the viral capsid leading to its degradation by the proteosomal machinery and, again, decrease virus infection (68, 73-75). Modulation of the expression or activation of such factors by IL-4 may affect reverse transcription and/or capsid degradation and explain the IL-4-dependent inhibition of HIV-1 infection in HT-29 cells. Additional studies are needed to elucidate the precise mechanism(s) by which IL-4 can repress an early post-fusion step in HIV-1 life cycle.

In conclusion, our findings provide new insights into the effect of the GALT cytokine environment on susceptibility of intestinal epithelial cell to HIV-1 infection. An inflammation state due to response to other viruses or intracellular bacteria may increase viral production from intestinal epithelial cells through transactivation of integrated proviral DNA. The released virus can then infect surrounding CD4⁺ T cells present in the GALT just under the intestinal epithelial cells and favour systemic dissemination of HIV-1. Those results thus pinpoint the importance to treat various enteric infections in persons highly at risk of contracting HIV-1. Alternatively, a steady state may decrease intestinal epithelial cell susceptibility to HIV-1 infection through an IL-4-mediated decrease in viral cDNA synthesis. The hyporesponsiveness normally occurring in the GALT may be protective following intestinal contact with HIV-1 and diminish the risk of primary infection.

The biological significance of the present work is high considering that intestinal epithelial cells are in direct contact with the GALT. Importantly, the GALT has been recently demonstrated to act as a major viral reservoir as well as an important host-pathogen interface in HIV-1 infection.

Acknowledgements

We thank Ms. Sylvie Méthot for editorial assistance and Drs. Corinne Barat, Michel Ouellet and Robert Lodge for helpful discussions. This work was performed by SG in partial fulfillment of a Ph.D. Degree in the Microbiology-Immunology Program at Laval University. None of the authors has potential conflicts of interest concerning the submitted material.

Footnotes

¹ SG is the recipient of a CIHR Doctoral Research Award from the HIV/AIDS Research Program and MJT is the recipient of the Canada Research Chair in Human Immuno Retrovirology (Tier 1 level).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. Michel J. Tremblay, Laboratoire d'Immuno-Rétrovirologie Humaine, Centre de Recherche en Infectiologie, RC709, 2705 Boulevard Laurier, Québec (QC), Canada, G1V 4G2; Phone: (418) 654-2705. Fax: (418) 654-2212; Electronic address: michel.j.tremblay@crchul.ulaval.ca

³ Abbreviations used in this paper: GalCer, galactosyl ceramide

References

1. Newell, M. L. 1998. Mechanisms and timing of mother-to-child transmission of HIV-1. *Aids* 12:831-837.
2. Lehman, D. A., and C. Farquhar. 2007. Biological mechanisms of vertical human immunodeficiency virus (HIV-1) transmission. *Rev Med Virol* 17:381-403.
3. Koulinska, I. N., E. Villamor, B. Chaplin, G. Msamanga, W. Fawzi, B. Renjifo, and M. Essex. 2006. Transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 through breast-feeding. *J Acquir Immune Defic Syndr* 41:93-99.
4. Rousseau, C. M., R. W. Nduati, B. A. Richardson, G. C. John-Stewart, D. A. Mbori-Ngacha, J. K. Kreiss, and J. Overbaugh. 2004. Association of levels of HIV-1-infected breast milk cells and risk of mother-to-child transmission. *J Infect Dis* 190:1880-1888.
5. Rousseau, C. M., R. W. Nduati, B. A. Richardson, M. S. Steele, G. C. John-Stewart, D. A. Mbori-Ngacha, J. K. Kreiss, and J. Overbaugh. 2003. Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1 RNA in breast milk and of its relationship to infant infection and maternal disease. *J Infect Dis* 187:741-747.
6. Van de Perre, P. 1999. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 through breast-feeding: how can it be prevented? *J Infect Dis* 179 Suppl 3:S405-407.
7. John-Stewart, G., D. Mbori-Ngacha, R. Ekpini, E. N. Janoff, J. Nkengasong, J. S. Read, P. Van de Perre, and M. L. Newell. 2004. Breast-feeding and Transmission of HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* 35:196-202.
8. Janoff, E. N., and P. D. Smith. 2001. Emerging concepts in gastrointestinal aspects of HIV-1 pathogenesis and management. *Gastroenterology* 120:607-621.
9. Kingsley, L. A., R. Detels, R. Kaslow, B. F. Polk, C. R. Rinaldo, Jr., J. Chmiel, K. Detre, S. F. Kelsey, N. Odaka, D. Ostrow, and et al. 1987. Risk factors for

- seroconversion to human immunodeficiency virus among male homosexuals. Results from the Multicenter AIDS Cohort Study. *Lancet* 1:345-349.
10. Milman, G., and O. Sharma. 1994. Mechanisms of HIV/SIV mucosal transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10:1305-1312.
 11. 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* 90:2700-2704.
 12. Jordan, N. J., G. Kolios, S. E. Abbot, M. A. Sinai, D. A. Thompson, K. Petraki, and J. Westwick. 1999. Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. *J Clin Invest* 104:1061-1069.
 13. Dwinell, M. B., L. Eckmann, J. D. Leopard, N. M. Varki, and M. F. Kagnoff. 1999. Chemokine receptor expression by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 117:359-367.
 14. Sato, A., M. Hashiguchi, E. Toda, A. Iwasaki, S. Hachimura, and S. Kaminogawa. 2003. CD11b⁺ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *J Immunol* 171:3684-3690.
 15. Tsuji, N. M. 2006. Antigen-specific CD4(+) regulatory T cells in the intestine. *Inflamm Allergy Drug Targets* 5:191-201.
 16. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
 17. Battaglia, M., S. Gregori, R. Bacchetta, and M. G. Roncarolo. 2006. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin Immunol* 18:120-127.

18. Smith, D. W., and C. Nagler-Anderson. 2005. Preventing intolerance: the induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa. *J Immunol* 174:3851-3857.
19. Johansson, C., and B. L. Kelsall. 2005. Phenotype and function of intestinal dendritic cells. *Semin Immunol* 17:284-294.
20. Coombes, J. L., and F. Powrie. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 8:435-446.
21. Kagnoff, M. F. 2006. Microbial-epithelial cell crosstalk during inflammation: the host response. *Ann N Y Acad Sci* 1072:313-320.
22. Maaser, C., and M. F. Kagnoff. 2002. Role of the intestinal epithelium in orchestrating innate and adaptive mucosal immunity. *Z Gastroenterol* 40:525-529.
23. Vora, P., A. Youdim, L. S. Thomas, M. Fukata, S. Y. Tesfay, K. Lukasek, K. S. Michelsen, A. Wada, T. Hirayama, M. Arditi, and M. T. Abreu. 2004. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 173:5398-5405.
24. Cantin, R., J. F. Fortin, G. Lamontagne, and M. Tremblay. 1997. The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity. *J Virol* 71:1922-1930.
25. Bounou, S., J. E. Leclerc, and M. J. Tremblay. 2002. Presence of host ICAM-1 in laboratory and clinical strains of human immunodeficiency virus type 1 increases virus infectivity and CD4(+)-T-cell depletion in human lymphoid tissue, a major site of replication in vivo. *J Virol* 76:1004-1014.
26. Saeed, M. F., A. A. Kolokoltsov, and R. A. Davey. 2006. Novel, rapid assay for measuring entry of diverse enveloped viruses, including HIV and rabies. *J Virol Methods* 135:143-150.

27. Zack, J. A., S. J. Arrigo, S. R. Weitsman, A. S. Go, A. Haislip, and I. S. Chen. 1990. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 61:213-222.
28. Zar, J. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Englewoods Cliffs, NJ.
29. Delezay, O., N. Koch, N. Yahi, D. Hammache, C. Tourres, C. Tamalet, and J. Fantini. 1997. Co-expression of CXCR4/fusin and galactosylceramide in the human intestinal epithelial cell line HT-29. *Aids* 11:1311-1318.
30. Murata, T., N. I. Obiri, W. Debinski, and R. K. Puri. 1997. Structure of IL-13 receptor: analysis of subunit composition in cancer and immune cells. *Biochem Biophys Res Commun* 238:90-94.
31. Kreydiyyeh, S. I., S. Markossian, and R. F. Hodeify. 2006. PGE2 exerts dose-dependent opposite effects on net water and chloride absorption from the rat colon. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 79:43-52.
32. Palermo, M., F. Alves-Rosa, C. Rubel, G. C. Fernandez, G. Fernandez-Alonso, F. Alberto, M. Rivas, and M. Isturiz. 2000. Pretreatment of mice with lipopolysaccharide (LPS) or IL-1beta exerts dose-dependent opposite effects on Shiga toxin-2 lethality. *Clin Exp Immunol* 119:77-83.
33. Zoetewij, J. P., H. Golding, H. Mostowski, and A. Blauvelt. 1998. Cytokines regulate expression and function of the HIV coreceptor CXCR4 on human mature dendritic cells. *J Immunol* 161:3219-3223.
34. Jourdan, P., C. Abbal, N. Noraz, T. Hori, T. Uchiyama, J. P. Vendrell, J. Bousquet, N. Taylor, J. Pene, and H. Yssel. 1998. IL-4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 on human T cells. *J Immunol* 160:4153-4157.
35. Creery, D., W. Weiss, G. Graziani-Bowering, R. Kumar, Z. Aziz, J. B. Angel, and A. Kumar. 2006. Differential regulation of CXCR4 and CCR5 expression by interleukin (IL)-4 and IL-13 is associated with inhibition of chemotaxis and human

- immunodeficiency Virus (HIV) type 1 replication but not HIV entry into human monocytes. *Viral Immunol* 19:409-423.
36. Wang, J., E. Guan, G. Roderiquez, V. Calvert, R. Alvarez, and M. A. Norcross. 2001. Role of tyrosine phosphorylation in ligand-independent sequestration of CXCR4 in human primary monocytes-macrophages. *J Biol Chem* 276:49236-49243.
 37. Chatel-Chaix, L., J. F. Clement, C. Martel, V. Beriault, A. Gatignol, L. DesGroseillers, and A. J. Mouland. 2004. Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol* 24:2637-2648.
 38. Schutze, S., T. Machleidt, and M. Kronke. 1992. Mechanisms of tumor necrosis factor action. *Semin Oncol* 19:16-24.
 39. Schmid, R. M., N. D. Perkins, C. S. Duckett, P. C. Andrews, and G. J. Nabel. 1991. Cloning of an NF-kappa B subunit which stimulates HIV transcription in synergy with p65. *Nature* 352:733-736.
 40. Zhao, C., B. Papadopoulou, and M. J. Tremblay. 2004. *Leishmania infantum* promotes replication of HIV type 1 in human lymphoid tissue cultured ex vivo by inducing secretion of the proinflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1 alpha. *J Immunol* 172:3086-3093.
 41. Kretzschmar, M., M. Meisterernst, C. Scheidereit, G. Li, and R. G. Roeder. 1992. Transcriptional regulation of the HIV-1 promoter by NF-kappa B in vitro. *Genes Dev* 6:761-774.
 42. Griffin, G. E., K. Leung, T. M. Folks, S. Kunkel, and G. J. Nabel. 1989. Activation of HIV gene expression during monocyte differentiation by induction of NF-kappa B. *Nature* 339:70-73.
 43. Kaplan, D. 1996. Autocrine secretion and the physiological concentration of cytokines. *Immunol Today* 17:303-304.

44. Worm, M., and B. M. Henz. 1997. Molecular regulation of human IgE synthesis. *J Mol Med* 75:440-447.
45. Nelms, K., A. D. Keegan, J. Zamorano, J. J. Ryan, and W. E. Paul. 1999. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17:701-738.
46. Horikoshi, H., M. Kinomoto, T. Kurosu, S. Komoto, M. Shiraga, T. Otake, T. Mukai, and K. Ikuta. 2002. Resting CD4(+) T cells with CD38(+)CD62L(+) produce interleukin-4 which contributes to enhanced replication of T-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 293:94-102.
47. Wang, J., A. Harada, S. Matsushita, S. Matsumi, Y. Zhang, T. Shioda, Y. Nagai, and K. Matsushima. 1998. IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. *J Leukoc Biol* 64:642-649.
48. Weissman, D., J. Daucher, T. Barker, J. Adelsberger, M. Baseler, and A. S. Fauci. 1996. Cytokine regulation of HIV replication induced by dendritic cell-CD4-positive T cell interactions. *AIDS Res Hum Retroviruses* 12:759-767.
49. Li, Y. G., Y. Iwabu, J. Warachit, M. Kinomoto, M. S. Ibrahim, S. Tsuji, T. Mukai, M. Kameoka, K. Tokunaga, T. Sata, and K. Ikuta. 2005. Interleukin-4 up-regulates T-tropic human immunodeficiency virus type 1 transcription in primary CD4+ CD38+ T-lymphocyte subset. *Microbiol Immunol* 49:155-165.
50. Moutsopoulos, N. M., N. Vazquez, T. Greenwell-Wild, I. Ecevit, J. Horn, J. Orenstein, and S. M. Wahl. 2006. Regulation of the tonsil cytokine milieu favors HIV susceptibility. *J Leukoc Biol* 80:1145-1155.
51. Mikovits, J. A., A. M. Meyers, J. R. Ortaldo, A. Minty, D. Caput, P. Ferrara, and F. W. Ruscetti. 1994. IL-4 and IL-13 have overlapping but distinct effects on HIV production in monocytes. *J Leukoc Biol* 56:340-346.

52. Naif, H. M., S. Li, M. Ho-Shon, J. M. Mathijs, P. Williamson, and A. L. Cunningham. 1997. The state of maturation of monocytes into macrophages determines the effects of IL-4 and IL-13 on HIV replication. *J Immunol* 158:501-511.
53. Montaner, L. J., R. T. Bailer, and S. Gordon. 1997. IL-13 acts on macrophages to block the completion of reverse transcription, inhibit virus production, and reduce virus infectivity. *J Leukoc Biol* 62:126-132.
54. Wang, J., K. Crawford, M. Yuan, H. Wang, P. R. Gorry, and D. Gabuzda. 2002. Regulation of CC chemokine receptor 5 and CD4 expression and human immunodeficiency virus type 1 replication in human macrophages and microglia by T helper type 2 cytokines. *J Infect Dis* 185:885-897.
55. Porcheray, F., B. Samah, C. Leone, N. Dereuddre-Bosquet, and G. Gras. 2006. Macrophage activation and human immunodeficiency virus infection: HIV replication directs macrophages towards a pro-inflammatory phenotype while previous activation modulates macrophage susceptibility to infection and viral production. *Virology* 349:112-120.
56. Okuma, K., R. Tanaka, T. Ogura, M. Ito, S. Kumakura, M. Yanaka, M. Nishizawa, W. Sugiura, N. Yamamoto, and Y. Tanaka. 2008. Interleukin-4-transgenic hu-PBL-SCID mice: a model for the screening of antiviral drugs and immunotherapeutic agents against X4 HIV-1 viruses. *J Infect Dis* 197:134-141.
57. Princen, K., S. Hatse, K. Vermeire, G. J. Bridger, R. T. Skerlj, E. De Clercq, and D. Schols. 2003. The antiviral activity of the CXCR4 antagonist AMD3100 is independent of the cytokine-induced CXCR4/HIV coreceptor expression level. *AIDS Res Hum Retroviruses* 19:1135-1139.
58. Jourdan, P., J. P. Vendrell, M. F. Huguet, M. Segondy, J. Bousquet, J. Pene, and H. Yssel. 2000. Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4⁺ CCR7⁺ human memory T cells. *J Immunol* 165:716-724.

59. Jinquan, T., S. Quan, H. H. Jacobi, H. O. Madsen, C. Glue, P. S. Skov, H. J. Malling, and L. K. Poulsen. 2000. CXC chemokine receptor 4 expression and stromal cell-derived factor-1 α -induced chemotaxis in CD4⁺ T lymphocytes are regulated by interleukin-4 and interleukin-10. *Immunology* 99:402-410.
60. Suzuki, Y., Y. Koyanagi, Y. Tanaka, T. Murakami, N. Misawa, N. Maeda, T. Kimura, H. Shida, J. A. Hoxie, W. A. O'Brien, and N. Yamamoto. 1999. Determinant in human immunodeficiency virus type 1 for efficient replication under cytokine-induced CD4(+) T-helper 1 (Th1)- and Th2-type conditions. *J Virol* 73:316-324.
61. Galli, G., F. Annunziato, C. Mavilia, P. Romagnani, L. Cosmi, R. Manetti, C. Pupilli, E. Maggi, and S. Romagnani. 1998. Enhanced HIV expression during Th2-oriented responses explained by the opposite regulatory effect of IL-4 and IFN- γ of fusin/CXCR4. *Eur J Immunol* 28:3280-3290.
62. Valentin, A., W. Lu, M. Rosati, R. Schneider, J. Albert, A. Karlsson, and G. N. Pavlakis. 1998. Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8886-8891.
63. Agace, W. W., A. Amara, A. I. Roberts, J. L. Pablos, S. Thelen, M. Uguccioni, X. Y. Li, J. Marsal, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, E. C. Ebert, B. Moser, and C. M. Parker. 2000. Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. *Curr Biol* 10:325-328.
64. Sprong, H., S. Degroote, T. Nilsson, M. Kawakita, N. Ishida, P. van der Sluijs, and G. van Meer. 2003. Association of the Golgi UDP-galactose transporter with UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase allows UDP-galactose import in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 14:3482-3493.
65. Hatano, Y., H. Terashi, S. Arakawa, and K. Katagiri. 2005. Interleukin-4 suppresses the enhancement of ceramide synthesis and cutaneous permeability barrier functions

- induced by tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in human epidermis. *J Invest Dermatol* 124:786-792.
66. Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin, and D. Trono. 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424:99-103.
 67. Stremlau, M., C. M. Owens, M. J. Perron, M. Kiessling, P. Autissier, and J. Sodroski. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427:848-853.
 68. Luban, J. 2007. Cyclophilin A, TRIM5, and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 81:1054-1061.
 69. Perez, O., and T. J. Hope. 2006. Cellular restriction factors affecting the early stages of HIV replication. *Curr HIV/AIDS Rep* 3:20-25.
 70. Chiu, Y. L., V. B. Soros, J. F. Kreisberg, K. Stopak, W. Yonemoto, and W. C. Greene. 2005. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature* 435:108-114.
 71. Hill, M. S., A. Ruiz, L. M. Gomez, J. M. Miller, N. E. Berman, and E. B. Stephens. 2007. APOBEC3G expression is restricted to epithelial cells of the proximal convoluted tubules and is not expressed in the glomeruli of macaques. *J Histochem Cytochem* 55:63-70.
 72. Komohara, Y., S. Suekane, M. Noguchi, K. Matsuoka, A. Yamada, and K. Itoh. 2007. Expression of APOBEC3G in kidney cells. *Tissue Antigens* 69:95-98.
 73. Yap, M. W., S. Nisole, C. Lynch, and J. P. Stoye. 2004. Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10786-10791.

74. Shi, J., and C. Aiken. 2006. Saturation of TRIM5 alpha-mediated restriction of HIV-1 infection depends on the stability of the incoming viral capsid. *Virology* 350:493-500.
75. Sakuma, R., J. A. Noser, S. Ohmine, and Y. Ikeda. 2007. Rhesus monkey TRIM5alpha restricts HIV-1 production through rapid degradation of viral Gag polyproteins. *Nat Med* 13:631-635.

Figures legends

Figure 1. Infection of HT-29 colorectal epithelial cells by NDK-Env pseudotypes is modulated by some cytokines. (A) HT-29 cells (2×10^5) were either left untreated or treated with one of the indicated cytokines for 24 h and then washed. Cells were next infected with luciferase-encoding NL4-3-based viruses pseudotyped with NDK-Env for 24 h and washed. (B) HT-29 cells were infected first and the cytokine added afterwards. Virus infection was estimated by measuring virus-encoded luciferase activity at 48 h post-infection in both cases. The results shown represent the means \pm standard deviations calculated from three independent experiments with quadruplicate samples and are expressed as the percentage of luciferase activity in samples treated with the listed cytokines with respect to the virus-infected samples that were left untreated (considered as 100) (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.0001$).

Figure 2. IL-4 inhibits infection of HT-29 cells with AMLV-Env, HTLV-I-Env and VSV-G pseudotyped HIV-1 particles. HT-29 cells (2×10^5) were either left untreated or treated with IL-4 for 24 h and then washed (pre-infection condition). Next, cells were inoculated with AMLV-Env (A), HTLV-I-Env (B) or VSV-G (C) pseudotyped NL4-3-based viruses for 24 h and washed. For the post-infection condition, IL-4 was added at 24 h following virus infection. Virus infection was estimated by measuring virus-encoded luciferase activity at 48 h post-infection. The results shown represent the means \pm standard deviations calculated from three independent experiments with quadruplicate samples and are expressed as the percentage of luciferase activity in samples treated with IL-4 with respect to the virus-infected samples that were left untreated (considered as 100) (**, $p < 0.01$).

Figure 3. IL-4 mediates a dose-dependent decrease in HIV-1 infection when using four different HIV-1-based pseudotypes. HT-29 cells (2×10^5) were either left untreated, or treated with increasing concentrations of IL-4 (ranging from 0.01 to 100 U/ml) for 24 h and washed. Cells were then infected with luciferase-encoding NL4-3-based viruses pseudotyped with AMLV-Env (A), HTLV-I-Env (B), NDK-Env (C) and VSV-G (D) for 24 h and washed. Virus infection was estimated by measuring virus-encoded luciferase activity at 48 h post-infection. The results shown represent the means \pm standard deviations calculated from three independent experiments with quadruplicate samples and are expressed as the percentage of luciferase activity in samples treated with IL-4 with respect to the virus-infected samples that were left untreated (considered as 100) (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.0001$).

Figure 4. IL-4 modulates expression of GalCer, CXCR4, MHC-I, CD81 and CD55 but not CD54 in HT-29 cells. Cells were either left untreated or treated with IL-4 for 24 h. Cells were then detached with versene, washed and surface expression of the indicated surface molecules was analysed by flow cytometry with specific antibodies. The isotype-matched control antibody is depicted in white, and the specific antibody in grey. The results shown are representative of three independent experiments.

Figure 5. IL-4 modulates entry of NDK-env and VSV-G pseudotyped viruses but does not affect fusion of VSV-G pseudotyped viruses in HT-29 cells. HT-29 cells (2×10^5) were either left untreated or treated with IL-4 for 24 h. Cells were then incubated with reporter viruses pseudotyped with NDK-Env (A) or VSV-G (B) for 4 h, treated with trypsin to remove uninternalized viruses, washed extensively and resuspended in lysis buffer. The viral contents found intracellularly were assessed using a p24 test. (C) HT-29 cells (1×10^6) were either left untreated, treated with IL-4 for 24 h and washed, or treated with bafilomycin A1 (100 nM) for 30 min. Next, cells were inoculated with Pr55^{Gag}/RLuc containing NL4.3 Δ Env viruses pseudotyped with VSV-G for 4 h, treated with trypsin to remove uninternalized viruses, washed and resuspended in a luciferin buffer. The results

shown represent the means \pm standard deviations calculated from three independent experiments with quadruplicate samples and are expressed as the percentage of either p24 or *Renilla* luciferase activity in treated samples with respect to the virus-infected samples that were left untreated (considered as 100) (*, $p < 0.05$).

Figure 6. IL-4 inhibits an early post-fusion step in the virus life cycle. HT-29 cells (1×10^6) were either left untreated, treated with IL-4 for 24 h and washed, or treated with AZT ($10 \mu\text{M}$) for 30 min. Cells were next infected with NL4-3-based viruses pseudotyped with VSV-G for 24 h and washed. Total genomic DNA was extracted and subjected to PCR analysis. The results shown represent the means \pm standard deviations calculated from three independent experiments with quadruplicate samples and are expressed as the percentage of reverse-transcribed viral DNA in treated samples with respect to the virus-infected samples that were left untreated (considered as 100) (*, $p < 0.05$).

Figure 1

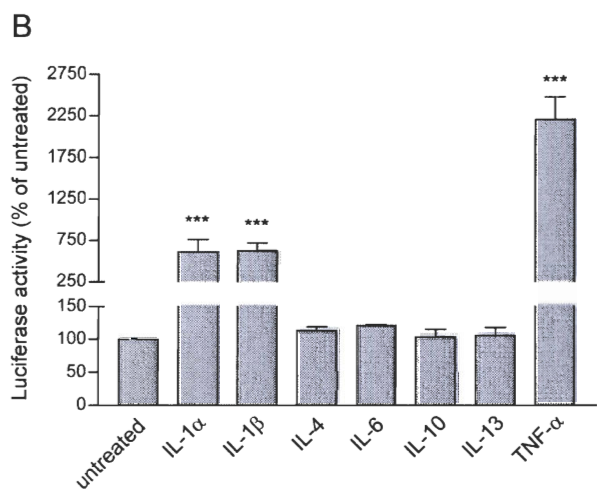
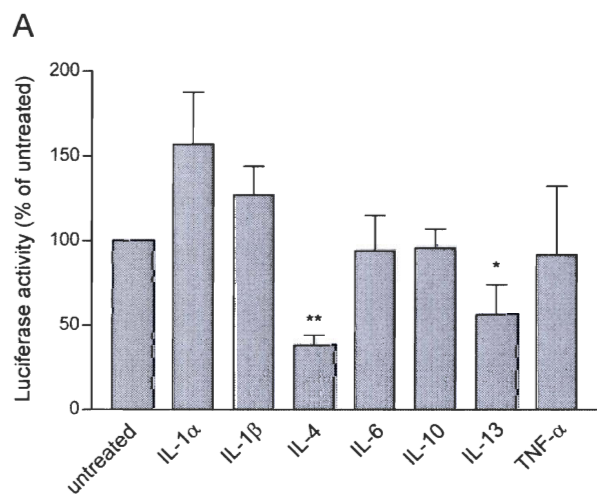


Figure 2

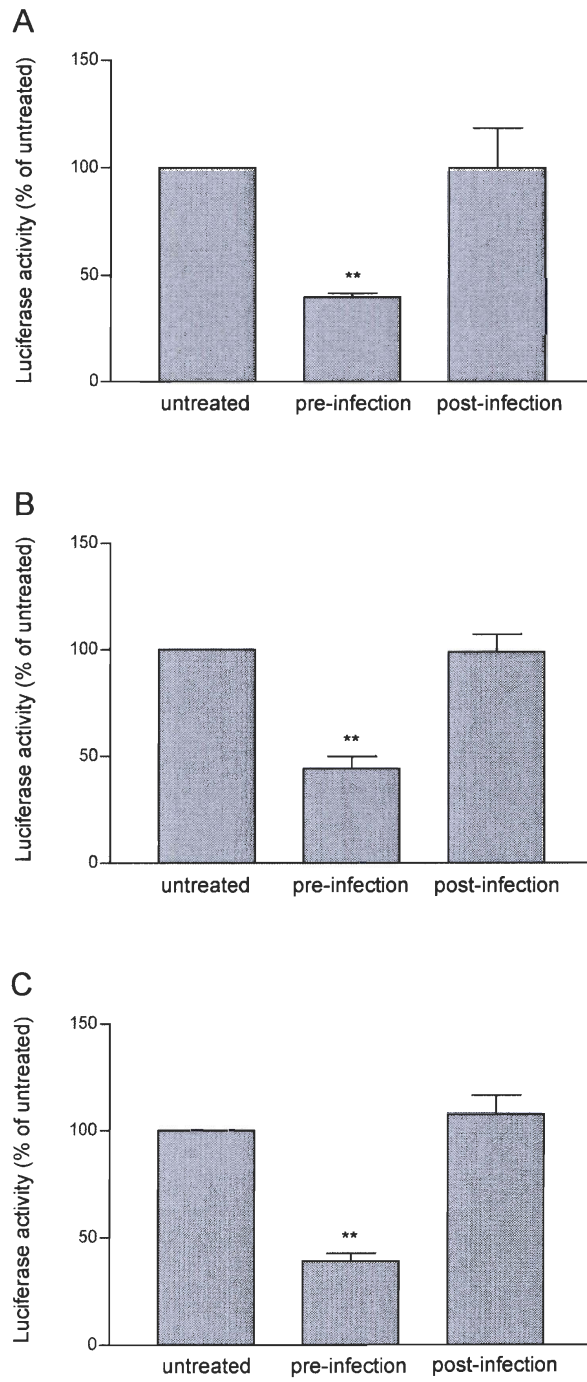


Figure 3

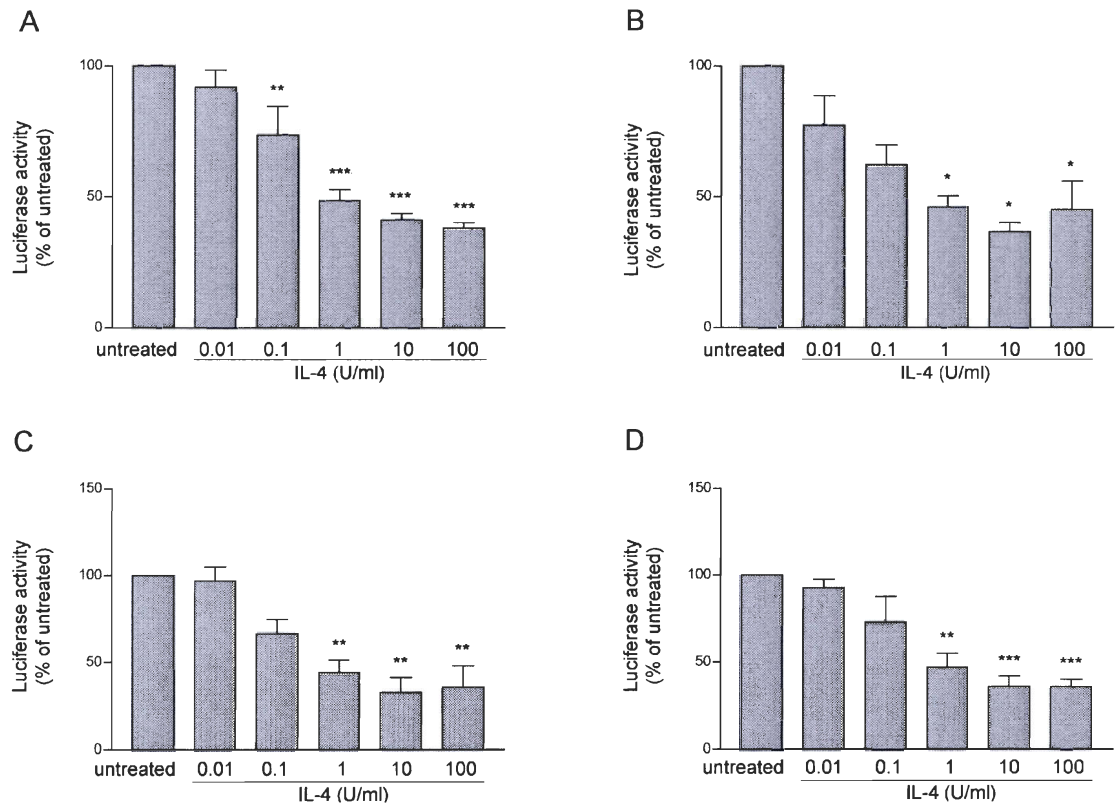


Figure 4

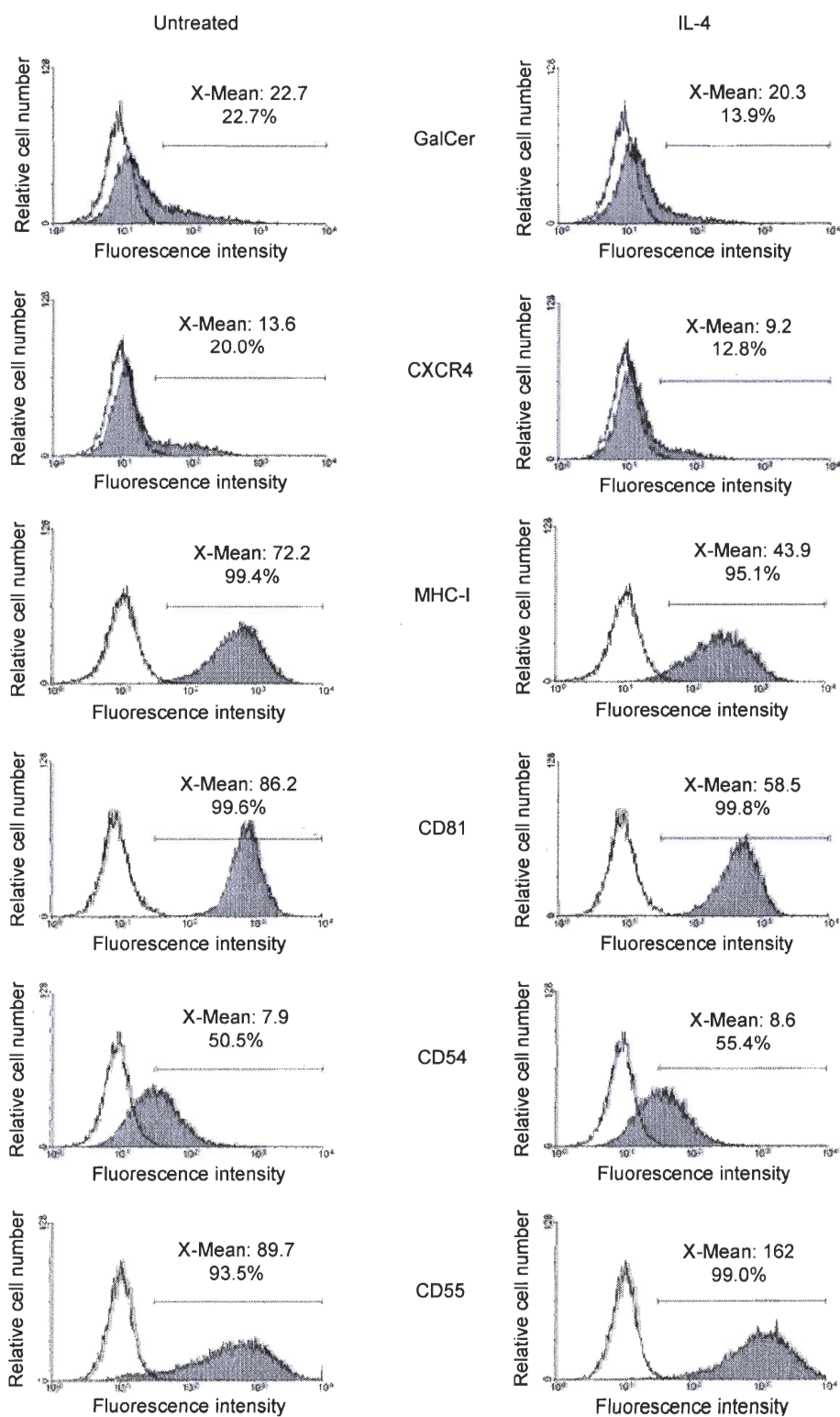


Figure 5

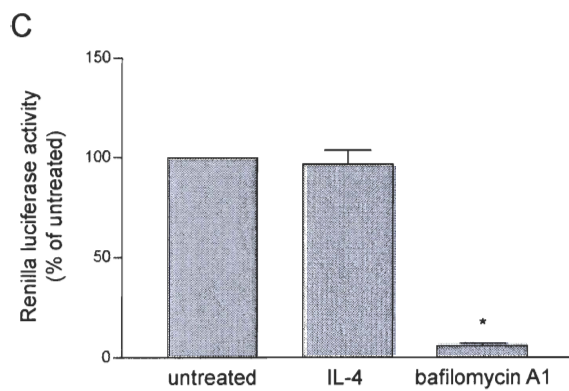
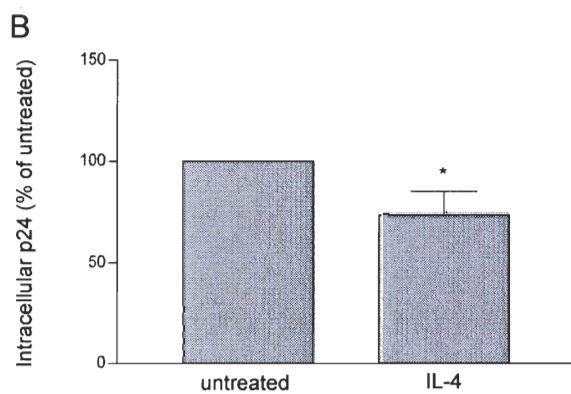
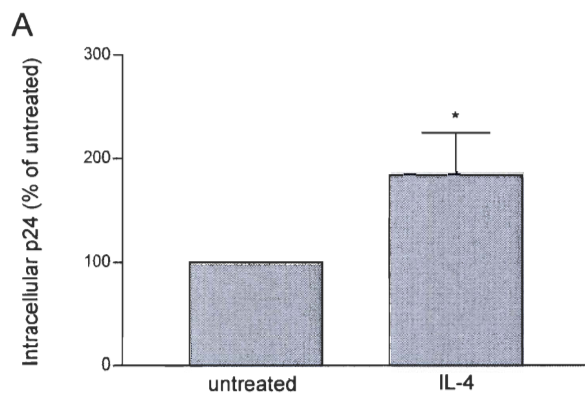
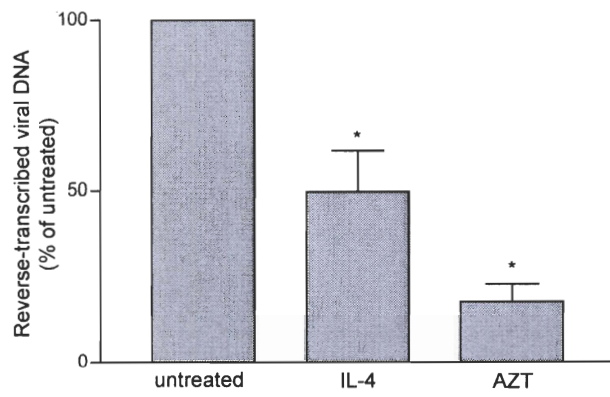


Figure 6

Chapitre 8 : Effets de la toxine du choléra sur l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1

8.1 Résumé

L'alimentation mixte, c'est-à-dire l'allaitement combiné à l'ingestion de nourriture solide, est une pratique courante dans les pays en voie de développement qui augmente le risque de transmission verticale du VIH-1. Ce type de pratique augmente également les risques d'infection par des pathogènes présents dans l'eau tels que la bactérie *Vibrio cholerae*, un pathogène causant des diarrhées qui affecte surtout les enfants de moins de 18 mois. Malgré que le VIH-1 et la bactérie *Vibrio cholerae* affectent les jeunes enfants et peuvent infecter les cellules épithéliales intestinales, aucune information n'est disponible sur les interactions possibles entre ces deux pathogènes. Dans cette étude, nous montrons que des concentrations de la toxine du choléra aussi faibles que 100 pg/ml inhibent de 50% l'infection des cellules épithéliales intestinales HT-29 par le VIH-1. Nous montrons également que la toxine du choléra augmente l'expression du récepteur CXCR4 sans toutefois affecter l'entrée ou la transactivation virale. Finalement, nous montrons que l'inhibition du VIH-1 par la toxine du choléra ne dépend pas de l'activation de la protéine kinase A (PKA).

8.2 Contributions

Le design expérimental et la rédaction du manuscrit ont été effectués par Sonia Gauthier. Mme Sylvie Méthot, Dr Michel Ouellet, Dr Corinne Barat et Dr Michel J. Tremblay ont révisé le manuscrit.

8.3 Deuxième article scientifique

**Cholera toxin mediates a PKA-independent reduction
of HIV-1 replication in human colorectal epithelial HT-29 cells**

Sonia Gauthier and Michel J. Tremblay

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

Running title: Cholera toxin represses HIV-1 replication in HT-29 cells

Abstract word count: 100

Text word count: 2024

Number of figures: 2

Footnote page

(1) The two authors have no conflict of interest.

(2) SG holds a Doctoral Research Award from the Canadian Institutes of Health Research HIV/AIDS Research Program while MJT is the recipient of the Canada Research Chair in Human Immuno Retrovirology (Tier 1 level).

(3) Correspondence should be addressed to:

Dr. Michel J. Tremblay

Laboratoire d'Immuno-Rétrovirologie Humaine

Centre de Recherche en Infectiologie, RC709

Centre Hospitalier de l'Université Laval

2705 boul. Laurier, Québec (QC), Canada, G1V 4G2

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

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

Abstract

Mixed feeding, combining breast milk and nonhuman milk and/or solid food, is a common practice in developing countries that increases the risk of vertical HIV-1 transmission. It also enhances the risk of infection by microorganisms present in water such as *Vibrio cholerae*, a diarrhoea-causing pathogen that frequently infects children below 18 months of age. Although both HIV-1 and *Vibrio cholerae* affect young children and target intestinal epithelial cells, no information is currently available on possible interactions between these two pathogens. We demonstrate here that cholera toxin induces a PKA-independent diminution of HIV-1 replication in human colonic epithelial HT-29 cells.

Introduction

Pediatric HIV-1 infection is a major health issue in developing countries. In the absence of antiretroviral therapy, HIV-1 vertical transmission rate is estimated to be between 30-45% in breastfed children and 15-30% in formula-fed ones [1]. Perinatally acquired HIV-1 infection progresses more rapidly toward AIDS than an infection acquired by adults. In fact, most HIV-1-infected children die before their third birthday if treatment is not available [2]. Although formula feeding carries no risk of HIV-1 transmission in developing countries, it augments sharply the mortality risk due to increased infection by pathogens present in water [3]. Breastfeeding account for 40% of all new HIV-1 infections in children [4]. Many factors influence the risk of HIV-1 transmission through breast milk such as the maternal viral load and CD4 count. Mixed feeding (i.e. breastfeeding and nonhuman milk and/or solid food) can also promote postnatal virus transmission because HIV-1 and intestinal pathogens are present at the same time. The role played by intestinal pathogens in the higher risk of HIV-1 vertical transmission that is seen during mixed feeding is still undefined.

HIV-1 vertical transmission through breastfeeding involves the intestinal system, where many bacteria, both commensal and pathogenic, can be present. *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) is a pathogenic bacterium mainly found in developing countries where HIV-1 transmission via breast milk is frequent. Cholera affects 1.8 million people yearly and causes more than 27 000 deaths [5]. Transmission to humans occurs through ingestion of contaminated food or water. *V. cholerae* produces an enterotoxin, the cholera toxin (CTx), which acts on intestinal epithelial cells and causes diarrhoea. CTx is a multimeric protein composed of an active subunit A (CTA) surrounded by five subunits B (CTB) [6]. CTB is responsible for attachment to the cell membrane, whereas CTA is responsible for the toxicity. Upon binding of CTB to the cell surface ganglioside GM1, CTx is internalised and traffics to the trans-Golgi network followed by retrograde transport to the endoplasmic reticulum. CTA is then transported to the cytoplasm and ADP-ribosylate Gas, a protein

regulating adenylate cyclase function [6]. This modification constitutively activates *Gas*, which will continually activate adenylate cyclase and cause an increase in cyclic AMP (cAMP), an important cellular second messenger [7].

Although both HIV-1 and *V. cholerae* can be found simultaneously in the digestive tract, data on their putative interactions are very scarce. A few reports have been published on the effects of cAMP on HIV-1 infection, mostly conducted in CD4⁺ T lymphocytes. These studies revealed that cAMP increases CXCR4 expression resulting in an increased susceptibility to infection with X4-using viruses [8, 9]. We thus investigated if the presence of CTx modulates HIV-1 infection of intestinal epithelial cells, the first physical barrier encountered by HIV-1 during intestinal transmission.

Materials and Methods

Cells and plasmids. The human colorectal epithelial cell line HT-29 and the human embryonic kidney cell line 293T were grown respectively in DMEM/F12 and DMEM containing foetal bovine serum and antibiotics (Invitrogen Life Technologies; Burlington, Canada). The pNL4-3Luc+Env-Vpr+ vector encodes the HIV-1 genome, in which the envelope gene has been inactivated, and the luciferase gene inserted in the region coding for Nef. The pJD19 vector expresses the wild type HIV-1 NDK envelope (Env). Single-cycle reporter viruses pseudotyped with NDK-Env (hereinafter referred to as NDK pseudotypes) were prepared by calcium phosphate transfection of 293T cells as described previously [10]. The pLTRX-Luc vector contains the HIV-1 LTR from the HIV-1 LAI strain positioned upstream of the luciferase reporter gene. The pCEP4-Tat vector contains the HIV-1 SF2 tat gene from pSP72-tat ligated to pCEP4.

Virus entry and infection studies. For virus entry, HT-29 cells (2×10^5) were either left untreated or treated with CTx (100 pg/ml) for 24 h. Cells were then incubated with NDK pseudotypes (40 ng of p24) for 4 h, treated with trypsin and washed to remove uninternalized viruses, and the cell-associated p24 content was measured by ELISA. To determine the effect of CTx on HIV-1 replication, HT-29 cells (2×10^5) were first treated with CTx (from 10 fg/ml to 10 ng/ml) for 24 h and washed. In some experiments, cells were also treated for 24 h with H89 (10 μ M) (Calbiochem; Gibbstown, USA). The cells were then infected for 24 h with NDK pseudotypes (40 ng of p24), washed and stimulated or not with TNF- α (10 ng/ml) (Peprotech; Rocky Hill, USA). Luciferase activity was measured at 48 h post-infection. In some cases, HT-29 cells were infected first for 24 h, treated with CTx at 3 days post-infection and luciferase activity measured at 96 h post-infection. To define the effect of CTx on virus transcription, HT-29 cells were first transfected by lipofectamine with the pLTRX-Luc and pCEP4-TAT vectors (ratio 2:1). Next, cells (2×10^5) were either left untreated or treated with CTx (100 pg/ml) for 24, 48 or 72 h and lysed before assessing luciferase activity.

Flow cytometry and confocal microscopy analyses. For flow cytometry studies, HT-29 cells (1×10^6) were either left untreated or treated with CTx (100 pg/ml) for 24 h, fixed and stained with an anti-CXCR4 phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibody (BD Pharmingen; Mississauga, Canada). For confocal microscopy, HT-29 cells (1×10^5) were left untreated or treated with CTx (100 pg/ml) or cytochalasin D (1 μ M) (Calbiochem; Gibbstown, USA) for 24 h and incubated for 1 h with transferrin-tetramethylrhodamine (50 μ g/ml) (Molecular Probes). Cells were then fixed and stained with phalloidin-488 (Molecular Probes, Invitrogen).

Statistical analyses. Means were compared using ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison.

Results

HIV-1 and *V. cholerae* are two human pathogens that can be found concomitantly in the intestinal tract. First, to measure the effect of CTx on the early steps of HIV-1 life cycle, human colorectal HT-29 cells were treated with varying concentrations of CTx for 24 h, and then infected with NDK pseudotypes. It should be noted that the NDK strain is commonly used to infect HT-29 cells. As illustrated in Fig. 1A, CTx represses HIV-1 infection in a dose-dependent manner reaching a 60% reduction at 10 ng/ml. Next, to assess the effect of CTx on viral expression, HT-29 cells were infected first with HIV-1 and then stimulated 3 days later with CTx. Results depicted in Fig. 1B indicate that CTx is not affecting HIV-1 gene expression. Those results were confirmed using HT-29 cells transiently cotransfected with HIV-1 LTR-driven luciferase and Tat-encoding vectors (Fig. 1C). In addition to the viral transactivating Tat protein, HIV-1 transcription requires cellular transcription factor such as NF- κ B and Sp1. Our results suggest that a CTx treatment does not affect the TNF- α -mediated activation of integrated viral DNA (Fig. 1D), which is known to be due primarily to NF- κ B. Altogether, our results suggest that HIV-1 inhibition by CTx occurs prior to viral transcription.

CXCR4 and galactosylceramide (GalCer) are crucial receptors for HIV-1 infection of HT-29 cells. CTx is known to increase production of cAMP, and previous studies have shown that cAMP increases CXCR4 expression on peripheral blood lymphocytes. We thus examined if CXCR4 and GalCer expression was affected by CTx. Our results indicate that CTx increases CXCR4 expression (Fig. 1E) while having no effect on GalCer (data not shown). The process of HIV-1 entry remains unaffected by a CTx treatment (Fig. 1F).

We next determined whether actin reorganisation and/or protein kinase A (PKA) activation could contribute to the CTx-dependent effect on HIV-1. Actin reorganisation is important for HIV-1 fusion [11] and CTx has been shown to modify actin polymerisation [12]. To

determine if the observed reduction in HIV-1 infection results from actin reorganisation by CTx, HT-29 cells were treated with CTx or cytochalasin D (an actin filament inhibitor) and the actin cytoskeleton was analyzed by confocal microscopy. Our observations suggest that CTx, in contrast to cytochalasin D, does not disrupt actin organisation (Fig. 2A, upper panels). We also defined whether CTx can modify the functionality of cortical actin filaments by measuring transferrin uptake. We found that untreated and CTx-treated HT-29 cells display a similar transferrin uptake, which is in contrast to cells treated with cytochalasin D, therefore confirming that the actin cytoskeleton is not affected by CTx (Fig. 2A, lower panels). In addition to its role in cytoskeleton remodeling, PKA exerts various biological effects. To determine if PKA activation is necessary for the CTx-mediated repression of HIV-1 infection, HT-29 cells were treated for 24 h with CTx (100 pg/ml) and/or the PKA inhibitor H89 (10 μ M), before being infected with HIV-1. Our results show that inhibition of PKA does not restore virus infection to the level seen in untreated cells (Fig. 2B), thus demonstrating that PKA is not involved in the CTx-dependent effect on HIV-1 infection. The efficacy of the PKA inhibitor H89 was confirmed by its ability to inhibit PKA activation by forskolin (data not shown).

Discussion

The digestive tract plays a pivotal role in HIV-1 transmission through breastfeeding and can be colonised by several bacteria causing diarrhoeas. In this study, we analysed the effect of CTx on the infection of human intestinal epithelial cells by HIV-1. Our results show that CTx increases CXCR4 expression on HT-29 cells. Those results were expected since adenylate cyclase activation by CTx ultimately leads to an increase of intracellular cAMP levels which was shown to increase CXCR4 expression. However, in contrast to the situation seen in CD4⁺ T cells where cAMP leads to an increase in virus replication, our results show that, in HT-29 cells, despite increasing CXCR4 expression, CTx has an inhibitory effect on HIV-1 infection. We postulated that this unexpected reduction in HIV-1 infection could be explained by a decrease in virus gene expression. It had indeed been previously published that cAMP inhibits transcription from the HIV-1 regulatory elements (LTR) in a CD4-expressing T cell line. This is attributable to an increased phosphorylation of CREB, which then competes with NF- κ B for the binding of CBP and p300, two important co-activators connecting the transcription factor to the transcriptional machinery [13]. Our results however do not support this hypothesis since CTx treatment fails to inhibit transcription from the HIV-1 LTR and does not affect transactivation of integrated provirus by NF- κ B.

Many bacteria have evolved a capacity to modify the actin cytoskeleton, a modification frequently mediated by bacterial toxins [14]. This actin remodelling allows bacteria to resist phagocytosis and is important for their survival. *V. cholerae* is not an exception and its toxin, CTx, is able to modify the actin cytoskeleton through PKA activation. Monomeric actin is a cellular target of PKA and its phosphorylation causes a decrease in actin polymerisation. From an HIV-1 point of view, actin remodelling has been suggested to be important to allow fusion between viral and cellular membranes [11]. Thus, actin modification by CTx could alter viral fusion and affect the infection process. However, our results show that actin polymerisation is not affected by CTx, eliminating a possible involvement of actin remodelling in the observed CTx-mediated effect on HIV-1 life cycle.

It has been previously demonstrated that CTx increases intracellular cAMP levels [6]. For many years, the biological effects of cAMP were thought to be mediated exclusively by PKA activation. However, several effects of cAMP have been described to be PKA-independent and a new system, the Exchange proteins directly activated by cAMP (Epac) system, has been recently described [15]. Our results suggest that CTx is reducing HIV-1 replication in HT-29 through a PKA-independent mechanism (Fig. 2B). It can thus be proposed that the CTx-mediated effect occurs via the Epac system or cyclic nucleotide-gated channels. This possibility is supported by the idea that the lowest CTx concentration used in our study is ten thousand times lower than the one normally used to activate PKA. Additional experiments are warranted to explore this issue.

Although numerous pathogens have been shown to promote HIV-1 replication, our study shows that low concentrations of CTx limit virus production in HT-29 cells through a PKA-independent mechanism. CTx is already used in clinical research as a vaccine adjuvant. Our results suggest that CTx may also be useful for controlling intestinal transmission of HIV-1. A better understanding of the mechanism by which CTx inhibits HIV-1 infection of intestinal epithelial cells may lead to new strategies for reducing virus propagation, notably to young children in developing countries.

Acknowledgements

We thank Sylvie Méthot for editorial assistance and Drs. Corinne Barat, Michel Ouellet and Robert Lodge for helpful discussions. This work was performed by SG in partial fulfillment of a Ph.D. Degree in the Microbiology-Immunology Program at Laval University.

We thank N.R. Landau for pNL4-3Luc+Env-Vpr+, U. Hazan for pJD19 and O. Schwartz for pLTRX-Luc. The following reagent was obtained through the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pCEP4-Tat from Lung-Ji Chang.

References

1. Lehman DA, Farquhar C. Biological mechanisms of vertical human immunodeficiency virus (HIV-1) transmission. *Rev Med Virol* 2007;17:381-403
2. Chakraborty R. HIV-1 infection in children: a clinical and immunologic overview. *Curr HIV Res* 2005;3:31-41
3. Coovadia H, Kindra G. Breastfeeding to prevent HIV transmission in infants: balancing pros and cons. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:11-5
4. Kourtis AP, Lee FK, Abrams EJ, Jamieson DJ and Bulterys M. Mother-to-child transmission of HIV-1: timing and implications for prevention. *Lancet Infect Dis* 2006;6:726-32
5. Girard MP, Steele D, Chaignat CL and Kieny MP. A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine* 2006;24:2732-50
6. Vanden Broeck D, Horvath C and De Wolf MJ. *Vibrio cholerae*: cholera toxin. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:1771-5
7. Serezani CH, Ballinger MN, Aronoff DM and Peters-Golden M. Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;39:127-32
8. Cole SW, Jamieson BD and Zack JA. cAMP up-regulates cell surface expression of lymphocyte CXCR4: implications for chemotaxis and HIV-1 infection. *J Immunol* 1999;162:1392-400
9. Cristillo AD, Highbarger HC, Dewar RL, Dimitrov DS, Golding H and Bierer BE. Up-regulation of HIV coreceptor CXCR4 expression in human T lymphocytes is mediated in part by a cAMP-responsive element. *Faseb J* 2002;16:354-64
10. Cantin R, Fortin JF, Lamontagne G and Tremblay M. The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity. *J Virol* 1997;71:1922-30

11. Eitzen G. Actin remodeling to facilitate membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* 2003;1641:175-81
12. Hirshman CA, Zhu D, Pertel T, Panettieri RA and Emala CW. Isoproterenol induces actin depolymerization in human airway smooth muscle cells via activation of an Src kinase and GS. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L924-31
13. Banas B, Eberle J, Banas B, Schlondorff D and Luckow B. Modulation of HIV-1 enhancer activity and virus production by cAMP. *FEBS Lett* 2001;509:207-12
14. Barbieri JT, Riese MJ and Aktories K. Bacterial toxins that modify the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002;18:315-44
15. Cheng X, Ji Z, Tsalkova T and Mei F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;40:651-62

Figure legends

Figure 1. CTx inhibits an early step in the HIV-1 replication cycle in HT-29 cells. (A) HT-29 cells were either left untreated or treated with CTx (10 fg/ml to 10 ng/ml) for 24 h and then washed extensively. Cells were next infected with NDK-Env pseudotypes (40 ng of p24) for 24 h and washed again. Luciferase activity was measured at 48 h post-infection. (B) HT-29 cells were infected first and CTx was added at 3 days post-infection. Luciferase activity was measured 24 h later. (C) HT-29 cells were cotransfected with pLTRX-Luc and pCEP4-Tat and next either left untreated or stimulated with CTx (100 pg/ml). Luciferase activity was measured 24, 48 or 72 h later. (D) HT-29 cells were either left untreated or treated with CTx (100 pg/ml) for 24 h and then washed extensively. Cells were next infected with NDK-Env pseudotypes for 24 h, washed and treated or not with TNF- α (10 ng/ml). Luciferase activity was measured at 48 h post-infection. (E) HT-29 cells were either left untreated (left panel) or treated with CTx (100 pg/ml) for 24 h (right panel). CXCR4 expression was then analysed by flow cytometry. (F) HT-29 cells were either left untreated or treated with CTx (100 pg/ml) for 24 h and then washed extensively. Cells were then incubated with NDK-Env pseudotypes for 4 h, treated with trypsin to remove uninternalized viruses and the intracellular p24 content was measured by ELISA. The results shown in panels A, B, C, D and F represent the means \pm standard deviations calculated from three independent experiments with quadruplicate samples and are expressed as percentages of untreated cells (considered as 100) (*, $p < 0.05$).

Figure 2. HIV-1 inhibition by CTx involves neither actin reorganisation nor PKA activation. (A) HT-29 cells were first either left untreated or treated with CTx (100 pg/ml) or cytochalasin D (1 μ M) for 24 h and next incubated for 1 h with transferrin. Cells were mounted and processed for confocal microscopy. The results shown represent actin staining (i) and transferrin uptake (ii) and are representative of three independent experiments. (B) HT-29 cells were either left untreated or treated for 24 h with CTx (100 pg/ml) and/or H89 (10 μ M) and then washed extensively. Cells were next infected with NDK-Env

pseudotypes for 24 h. Luciferase activity was measured at 48 h post infection. The results shown represent the means \pm standard deviations calculated from three independent experiments with quadruplicate samples and are expressed as percentages of untreated cells (considered as 100) (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; n.s., non-significant).

Figure 1

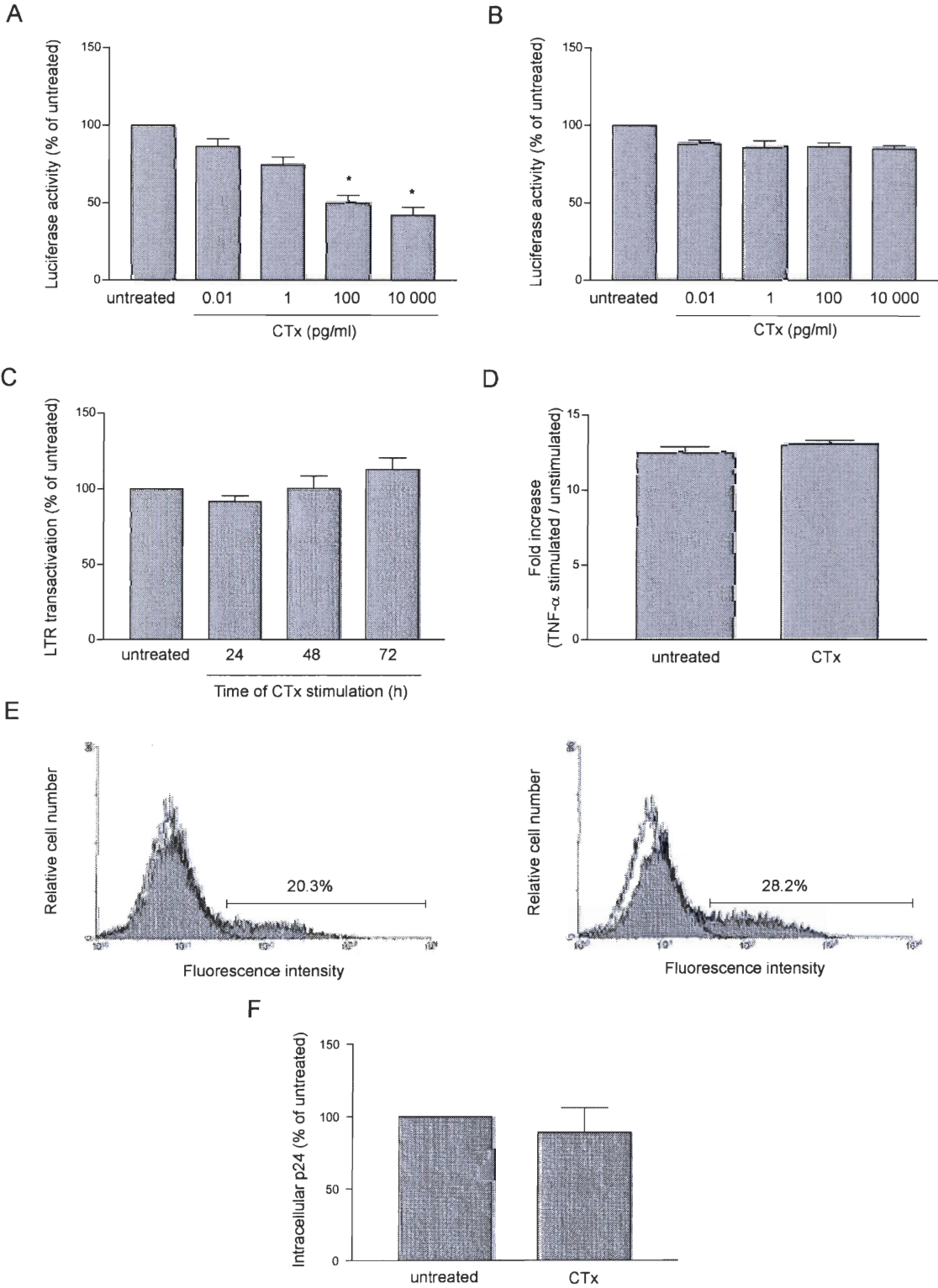
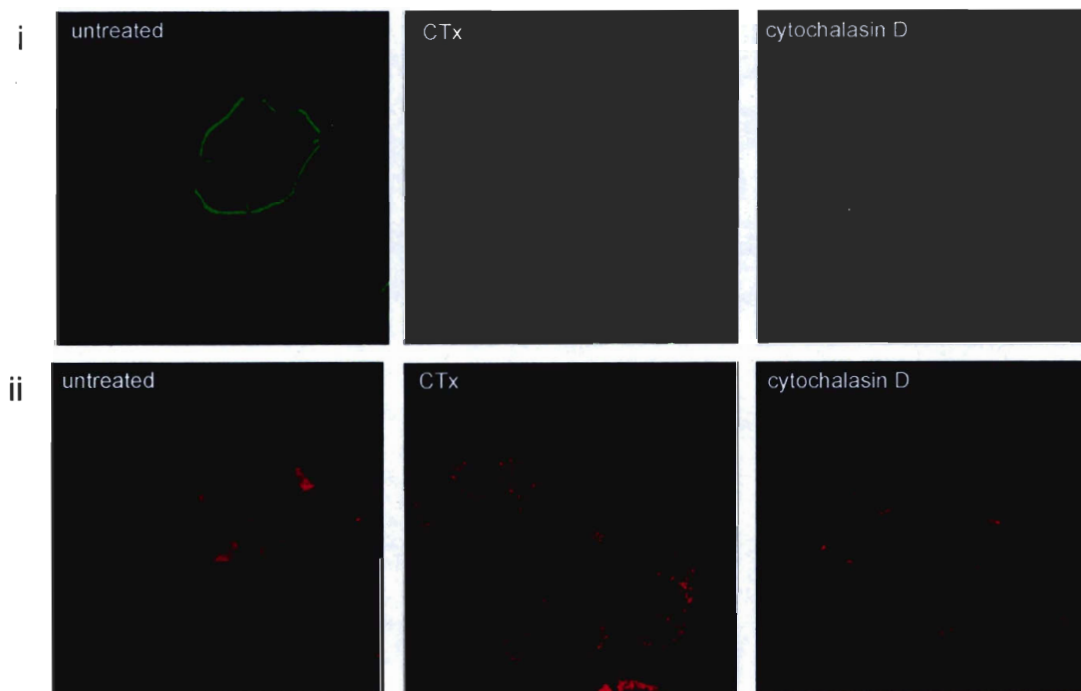
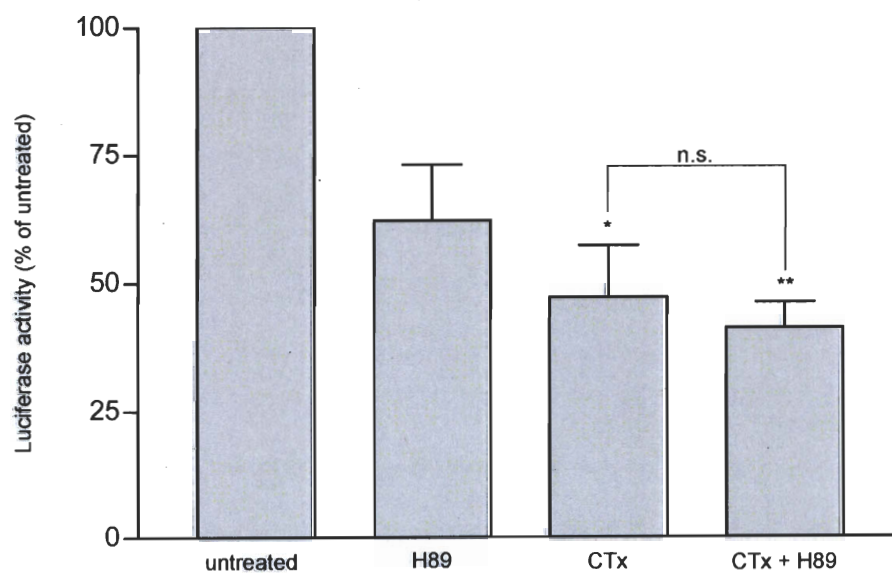


Figure 2

A**B**

Section 3 :
Discussion et
perspectives

Chapitre 9 : Discussion et perspectives

9.1 Les cellules épithéliales et la transmission du VIH-1

La transmission du VIH-1 par la voie sexuelle ou par l'allaitement survient au niveau des muqueuses (30, 473). Ces dernières sont tapissées de cellules épithéliales qui peuvent être sous forme stratifiée, comme c'est le cas au niveau vaginal, ou sous la forme d'une monocouche polarisée tel qu'au niveau des intestins. Une des fonctions principales des cellules épithéliales est de servir de barrière entre l'intérieur du corps humain qui est stérile et le monde extérieur non-stérile (434). Ce sont les premières cellules à entrer en contact avec le VIH-1 lors de la transmission sexuelle et mère-enfant. Au niveau de la transmission sexuelle, ce sont les cellules épithéliales vaginales (30) ainsi que les cellules épithéliales intestinales et colorectales qui sont impliquées (474). Au niveau de la transmission mère-enfant, deux types de cellules épithéliales peuvent être impliquées soit les trophoblastes et les cellules épithéliales intestinales (35). Les traumatismes causés à l'épithélium, comme par exemple lors des relations sexuelles ou du transit intestinal des aliments, facilitent la transmission du VIH-1 en compromettant l'intégrité de la barrière épithéliale (474). De plus, l'infection directe des cellules épithéliales vaginales et intestinales (475-477) ainsi que les trophoblastes (478) peut contribuer à la transmission du VIH-1. Une meilleure compréhension des mécanismes régissant les interactions entre le virus et les cellules épithéliales est donc capitale à l'élaboration de nouvelles stratégies pour lutter contre l'expansion de l'épidémie.

9.2 Le choix du modèle

Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés aux cellules épithéliales intestinales puisqu'elles sont importantes lors de la transmission mère-enfant et sexuelle du VIH-1 (35). Dans les cas de transmission de la mère à l'enfant, ces cellules sont impliquées lors de la transmission *intrapartum* et via l'allaitement (45, 46), qui constituent à eux deux 80% des

cas de transmission verticale. Dans le 20% des cas restant, la transmission implique plutôt des cellules du placenta, les trophoblastes (35). Malgré ces données, la majorité des études sur les mécanismes de la transmission du VIH-1 de la mère à l'enfant ont été effectuées dans des modèles de cellules trophoblastiques.

Dans un premier temps, les traumatismes au niveau de l'épithélium sont souvent mis en avant plan pour expliquer la transmission du VIH-1 au niveau des muqueuses et l'infection directe des cellules épithéliales reste généralement dans l'ombre (474). Chez les nouveau-nés et les enfants strictement alimentés par l'allaitement, les traumatismes au niveau de l'épithélium intestinal sont très limités et ne peuvent pas expliquer le taux élevé de transmission (30 à 45% chez les enfants allaités) (479, 480).

Dans un deuxième temps, les cellules M, des cellules épithéliales intestinales spécialisées dans le transport transcellulaire, ont souvent été invoquées pour expliquer la transmission du VIH-1 à travers un épithélium intact (308, 481). Cependant, ces cellules ne constituent que 10 à 20% de l'épithélium associé aux plaques de Peyer, donc moins de 5 % des cellules totales de l'épithélium (482). D'un point de vue strictement statistique, le VIH-1 a donc plus de chances d'entrer en contact avec une cellule épithéliale que d'être transporté par transcytose au niveau des cellules M. Cependant, puisque la liaison du VIH-1 à son récepteur et corécepteur est une étape limitante du cycle viral, le phénomène de transcytose pourrait être favorisé par rapport à l'infection directe des cellules épithéliales s'il était indépendant de la liaison à ces récepteurs. Or, les études sur la transcytose du VIH-1 au niveau des cellules épithéliales intestinales ont démontré que la liaison au corécepteur est requise (44).

Finalement, certains pourraient remettre en cause l'importance des cellules épithéliales intestinales du fait que l'épithélium est complètement renouvelé tous les trois ou quatre jours (483). Le VIH-1 se réplique préférentiellement dans les cellules métaboliquement actives et, au contraire, la division rapide de ces cellules pourrait favoriser l'infection. De plus, il est important de noter que, dépendant du type cellulaire, la demi-vie des cellules infectées peut être très courte. Ainsi, la demi-vie des lymphocytes T, qui est normalement de 100 jours, est d'environ 24-36 heures lorsqu'ils sont infectés par le VIH-1 (18). La durée de vie limitée des cellules épithéliales intestinales n'est donc pas un facteur limitant et elle

est suffisamment longue pour permettre la production de nouveaux virions. Ces derniers bourgeonnent en partie au niveau de la membrane basale, favorisant ainsi l'infection des lymphocytes T CD4⁺ présents au niveau du GALT (484).

Dans notre étude, nous avons utilisé la lignée cellulaire colorectale humaine HT-29. Il a été démontré précédemment que cette lignée est plus susceptible à l'infection par le VIH-1 que les autres lignées colorectales humaines telles que les T84, les Caco-2, les SK-CO-1, les SW480, les SW1462 et les SW620 (485). De plus, l'utilisation de cellules épithéliales intestinales primaires (entérocytes différenciés) n'a pas été possible puisque ces dernières ont une durée de vie très courte (1 ou 2 journée(s)) lorsque cultivées *in vitro* (486).

9.3 Discussion

9.3.1 Les effets des diverses cytokines

Dans notre premier article, nous avons démontré que les diverses cytokines présentes au niveau des organes lymphoïdes associés à l'intestin modulent l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1. Dans un premier temps, les cytokines pro-inflammatoires IL-1 α et β ainsi que le TNF- α , augmentent l'expression virale via l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Dans un deuxième temps, l'IL-4 et l'IL-13 inhibent la réplication du VIH-1 en affectant aux moins deux étapes précoces du cycle viral. Premièrement, l'IL-4 diminue l'expression du récepteur et du corécepteur du VIH-1, le GalCer et le CXCR4. Deuxièmement, dans un modèle utilisant des particules du VIH-1 pseudotypées avec la glycoprotéine G du VSV, l'IL-4 inhibe la synthèse de l'ADN viral sans affecter la fusion. Ces résultats suggèrent qu'une étape ultérieure au processus de fusion est également affectée par l'IL-4.

L'IL-4 est une cytokine pléiotropique qui, suite à la liaison de son récepteur, induit l'activation de STAT6 et de IRS1/2 (487). Comme décrit au chapitre 7, la liaison de l'IL-4 induit l'activation de Jak1, Jak2 et Tyk2 qui phosphorylent des régions spécifiques du récepteur de l'IL-4. STAT6 lie ensuite le récepteur phosphorylé via ses domaines SH2, permettant ainsi aux kinases activées de phosphoryler ses résidus tyrosines situés en

C-terminal (487). Une fois phosphorylé, STAT6 se dissocie du récepteur et forme un homodimère via l'interaction de ses domaines SH2 avec ses résidus phosphorylés. Le dimère de STAT6 est transloqué au noyau où il lie des motifs d'ADN spécifiques présents dans les promoteurs des gènes cibles. Suite à cette liaison, STAT6 peut activer la machinerie de transcription basale, mais peut également se complexer avec d'autres facteurs de transcription tels que c-Jun, C/EBP α , NF- κ B et SP1 et activer la transcription en coopération avec ces facteurs (488). STAT6 peut également réprimer la transcription dépendante de STAT1 et NF- κ B, probablement en séquestrant des protéines coactivatrices de la transcription (489). Ainsi STAT6 peut réguler positivement et/ou négativement l'expression de divers gènes cellulaires (490).

En plus de l'activation de STAT6, la liaison de l'IL-4 à son récepteur induit l'activation de IRS1/2 (487). Les résidus du récepteur de l'IL-4 qui sont phosphorylés ne sont pas les mêmes pour l'activation de STAT6 que pour l'activation de IRS1/2. La phosphorylation de la tyrosine 497 est importante pour la liaison de IRS1/2 (491) tandis que la phosphorylation des tyrosines 575, 603 et 631 est importante pour la liaison de STAT6 (492). Suite à son interaction avec le récepteur phosphorylé, IRS1/2 devient phosphorylé à son tour. Environ vingt sites de phosphorylation sont présents sur IRS1/2 et ont le potentiel de lier les domaines SH2 d'une variété de protéines cytoplasmiques (493). Parmi les protéines qui interagissent avec IRS1/2 phosphorylé, on retrouve la PI3K et la molécule adaptatrice Grb-2. Ces interactions mènent respectivement à l'activation des voies de signalisation de la PI3K et des Ras/MAPK. L'activation de la PI3K mène à la production de PIP₃ et PIP₂ qui activent de nombreuses kinases dont la PKC et Akt. L'activation de la voie Ras/MAPK mène à l'activation des ERK-1/2 qui transloquent au niveau du noyau et activent l'expression des gènes via la phosphorylation de facteurs de transcription spécifiques (487).

L'inhibition de l'infection par des particules virales du VIH-1 pseudotypés avec l'enveloppe du virus VSV survient à une étape post-fusion et résulte en une diminution de la synthèse de l'ADN viral (chapitre 7). Suite à la fusion virale, les virus sont transportés vers la membrane nucléaire via le réseau d'actine et de microtubules (112, 167, 494). S'ensuivent les étapes de la transcription inverse et de la décapsidation. Le lieu de la décapsidation demeure encore controversé, mais une étude récente a démontré qu'elle

surviendrait au niveau du pore nucléaire (167). Cette étude démontre également que ce processus serait favorisé par la transcription inverse. C'est la génération de la séquence flap, la dernière étape de la transcription inverse, qui permettrait à la capsid virale de se dissocier. Si nous prenons en considération ces résultats, l'inhibition de la synthèse de l'ADN viral par l'IL-4 surviendrait donc avant la décapsidation.

Dans un premier temps, l'IL-4 pourrait entraîner la synthèse de protéines cellulaires inhibant la transcription inverse. APOBEC3G est le seul facteur cellulaire connu étant capable d'inhiber cette étape du cycle virale suite à son incorporation dans les particules virales (68). Dans notre système, nous avons utilisé des virus codant pour la protéine Vif excluant ainsi les effets potentiels d'APOBEC3G résultant de son incorporation (voir section 2.3.2.1). Cependant, des travaux plus récents, mais controversés (495), ont démontré que la présence d'APOBEC3G au niveau des cellules cibles pouvait également restreindre l'infection par le VIH-1 (496). Dans le modèle où la décapsidation survient avant la transcription inverse, APOBEC3G peut facilement avoir accès au complexe de la transcription inverse et causer la désamination des bases cytosine en uracile. Dans le modèle où la transcription inverse survient avant la décapsidation, la capsid virale sépare physiquement la transcriptase inverse de son facteur inhibiteur APOBEC3G. Ce dernier doit donc être en mesure d'accéder à l'intérieur de la capsid virale pour exercer son effet inhibiteur. Ainsi, dans un tel modèle, la présence de la capsid virale pourrait limiter l'action d'APOBEC3G dans les cellules cibles et l'importance de l'induction d'un tel facteur par l'IL-4 serait donc discutable. De plus, une étude récente a démontré que, dans un modèle de cellules neuronales et d'astrocytes, les cytokines pro-inflammatoires IL-1 et TNF- α ainsi que les interférons (α , β et γ) augmentent l'expression d'APOBEC3G tandis que les cytokines IL-4 et IL-6 n'ont aucun effet (497).

Dans un deuxième temps, l'IL-4 pourrait entraîner la dégradation de la capsid virale. TRIM5 α est un facteur cellulaire qui lie la capsid virale causant ainsi sa dégradation par la machinerie du protéasome (208, 209). En plus de TRIM5 α , il est connu qu'au moins deux autres facteurs induisent la dégradation de la capsid virale (210). L'identité exacte de ces facteurs demeure inconnue, mais le premier est un facteur qui est inhibé par CypA et le deuxième est un facteur important pour l'inhibition du VIH-1 par TRIM5 α et par le facteur

inhibé par CypA (voir section 2.5.2 et figure 14 à la page 38) (215). Selon cette théorie, l'IL-4 pourrait réguler positivement l'expression des l'ARNm de ces protéines et ainsi inhiber la synthèse de l'ADN viral en entraînant la dégradation des capsides virales. Des données récentes montrant que l'expression de l'ARNm de TRIM5 α peut être modulée par des médiateurs de la réponse immune, tels que l'IFN- γ , supportent cette hypothèse (498).

Finalement, l'IL-4 pourrait entraîner la dégradation de la capside virale indépendamment de ces facteurs inhibiteurs. En plus de l'activation de STAT6, la liaison de l'IL-4 à son récepteur induit la voie de signalisation de IRS1/2 qui mène à l'activation de plusieurs kinases, dont la PI3K, la PKC et les MAPK (487). Ces dernières vont à leur tour activer une variété de protéines cibles. Plusieurs études ont déjà démontré que la phosphorylation de diverses protéines par les protéines kinases entraîne leur ubiquitination et leur dégradation par le protéasome (499, 500). Ainsi, l'activation de plusieurs kinases par l'IL-4 pourrait entraîner la phosphorylation de la capside virale suivi de sa dégradation. L'effet direct de cette dégradation serait une diminution de la synthèse de l'ADN proviral. Cette hypothèse est supportée par une étude récente qui a démontré que l'inhibition de la kinase associée au récepteur de l'EGF entraînait une diminution de l'ubiquitination de la capside virale du virus associé aux adéno 2 (AAV2) et favorisait ainsi l'infection (501).

9.3.2 Les effets de la toxine du choléra

Dans notre deuxième article, nous avons démontré que la toxine du choléra (CTx) inhibe l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1 (chapitre 8). Dans un premier temps, nous avons analysé les effets potentiels de la CTx sur le cycle viral. Nous avons démontré que l'expression du récepteur GalCer n'est pas modulée, mais que l'expression du corécepteur CXCR4 est augmentée de 40%. Des études antérieures ont démontré que l'AMPc augmente l'infection par le VIH-1 et que cet effet découle d'une augmentation de l'expression du CXCR4 à la surface cellulaire (502, 503). Le mécanisme d'action de la CTx étant l'augmentation de l'AMPc via l'activation constitutive de l'adénylate cyclase (359), il n'est pas surprenant d'obtenir des résultats similaires. Notre augmentation de l'expression du CXCR4 est cependant moins importante que celle observée dans les études

sur lymphocytes T CD4+. Cette différence entre nos résultats et la littérature peut être due à un temps d'incubation plus court avec le stimulus (24 heures) avant que l'expression ne soit analysée. Plusieurs études ont démontré que l'induction de l'expression du CXCR4 est plus importante après 36 à 48 heures d'incubation qu'après 24 heures tant au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique (504, 505). De plus, l'utilisation d'un stimulus différent peut influencer l'induction de l'expression du CXCR4. La majorité des études sur les lymphocytes T CD4+ ont utilisé un analogue de l'AMPc perméable aux membranes cellulaires, le db-cAMP (N6,2'-O-dibutyryl adenosine-3',5'-cyclic monophosphate), à des concentrations pouvant atteindre les 10 mM (502-505). Ce stimulus pourrait induire une plus grande augmentation des concentrations intracellulaires d'AMPc que les cellules stimulées avec 100 pg/ml (1.2 pM) de CTx. Une étude conduite dans la lignée cellulaire Jurkat (lymphocyte T) a montré que l'utilisation de la forskoline (10 µM) entraînait une augmentation de l'AMPc deux fois plus importante que l'utilisation de la CTx (100 ng/ml) (506). La concentration de CTx utilisée dans notre étude étant mille fois inférieure (100 pg/ml), l'induction de l'AMPc intracellulaire pourrait être beaucoup plus faible que lorsque la forskoline ou le db-cAMP sont utilisés. De plus, une étude a montré que différents agents induisant l'AMPc affectaient différemment l'expression du CXCR4 dans les PBMCs. Ainsi la forskoline cause une augmentation de 607% de l'expression du CXCR4 contre seulement 198% et 347% lorsque la prostaglandine E2 et le db-cAMP sont utilisés (502).

L'inhibition de l'infection observée ne peut cependant pas résulter de cette augmentation de l'expression du CXCR4. De plus, l'entrée et les étapes post-intégration demeurent inchangées en présence de la CTx. L'étape du cycle viral affectée par la CTx demeurant inconnue, nous avons investigué dans un deuxième temps le mécanisme d'action de cette dernière. La CTx induit la production d'AMPc, un second messager cellulaire qui régule une multitude de processus biologiques (507). Les effets de l'AMPc sont médiés par ses deux récepteurs ubiquitaires, soit la protéine kinase A (PKA) et le système Epac (367). La présence d'un domaine CBD (*cAMP binding domain*) est la seule similarité structurale entre la PKA et le système Epac et tout dépendant du contexte cellulaire, l'activation de ces deux voies par l'AMPc peut avoir des effets opposés ou synergiques (508).

Nos résultats démontrent que l'activation de la PKA n'est pas nécessaire à l'inhibition de la réplication du VIH-1 par la CTx. En effet, la présence d'un inhibiteur de la PKA, le H89, ne permet pas de restaurer l'infection au niveau des cellules non-traitées. Le système Epac, un acronyme pour *exchange proteins activated directly by cyclic AMP*, est responsable des effets de l'AMPc indépendants de la PKA (509). Il existe deux systèmes Epac (Epac1 et Epac2) qui couplent la production d'AMPc à l'activation de la protéine Rap, une GTPase de la famille Ras. Le domaine CBD du système Epac est lié de manière covalente au domaine catalytique GEF (*guanine exchange factor*) et l'interaction intramoléculaire entre ces deux domaines inhibe stériquement l'accès à l'effecteur Rap (508). La liaison de l'AMPc induit un changement de conformation qui réoriente le domaine CBD par rapport au reste de la molécule et relâche le domaine catalytique GEF de l'inhibition imposée par le domaine CBD. Lorsque le système Epac est activé par l'AMPc, il échange le GDP de la GTPase Rap contre un GTP. La forme activée de Rap (Rap-GTP) influence alors plusieurs processus cellulaires dont l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines, les jonctions cellulaires, la sécrétion/exocytose, la différenciation et la prolifération cellulaire, l'expression génique, l'apoptose et la phagocytose (510-514).

Tout comme pour l'IL-4, l'activation du système Epac par la CTx pourrait entraîner la phosphorylation de la capsid virale suivi de sa dégradation ou la modulation de l'expression de facteurs inhibiteurs (voir chapitre 9.3.1). Contrairement à l'IL-4, la modulation de ces facteurs inhibiteurs ferait intervenir les facteurs de transcriptions NFAT et NF- κ B. En effet, suite à l'activation du système Epac, Rap1 phosphoryle ERK1/2 et MAPK menant à l'activation de NF- κ B, tandis que Rap2 stimule la phospholipase C-epsilon, qui hydrolyse le PIP₂ pour générer du diacylglycérol (DAG) et du IP₃ (509). Le facteur de transcription NFAT est activé suite à la mobilisation du Ca²⁺ par le IP₃.

Certains effets du système Epac sont indépendants de la GTPase Rap et impliquent son interaction avec la GTPase Ras ou avec des protéines associées aux microtubules (509). L'inhibition observée en présence de la CTx pourrait donc découler de l'activation de la GTPase Ras qui, tout comme Rap1, va entraîner l'activation de plusieurs kinases et la régulation génique via les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1. Il est cependant peu probable que l'inhibition découle de l'interaction entre le système Epac et la tubuline

puisque celle-ci promouvoit la polymérisation des microtubules (515), ce qui est favorable au transport intracellulaire du VIH-1 (494).

Enfin, l'inhibition de l'infection du VIH-1 par la CTx pourrait être indépendante de l'activation de l'adénylate cyclase et de la production d'AMPc. Plusieurs études ont en effet démontré que certains effets de la CTx, tels que l'induction de la prolifération cellulaire des pneumocytes de type II, étaient indépendants de l'AMPc (516, 517). La liaison de la CTx à son récepteur GM1 peut induire une cascade de signalisation intracellulaire et il a été démontré qu'elle induisait, entre autre, l'influx de Ca^{2+} à partir de sources extracellulaires (518, 519). Les voies de signalisation induites par la liaison de la CTx au récepteur GM1 sont peu caractérisées et l'influence d'une telle signalisation sur l'infection par le VIH-1 demeure inconnue, mais est une avenue intéressante.

9.4 Les perspectives

9.4.1 L'IL-4

Les perspectives du projet sur l'IL-4 et le VIH-1 seraient l'étude des voies de signalisation et des mécanismes impliqués dans l'effet inhibiteur de l'IL-4. Dans un premier temps, la caractérisation de la voie de signalisation responsable des effets de l'IL-4 serait effectuée. La stratégie employée serait de générer des constructions du récepteur de l'IL-4 mutées au niveau des résidus tyrosines qui sont phosphorylés lors de son activation et nécessaires à la liaison de STAT6 et de IRS1/2. Le résidu tyrosine 497 est nécessaire à l'activation de IRS1/2 tandis que les résidus tyrosines 575, 603 et 631 sont nécessaires à l'activation de STAT6 (491, 492). Cette stratégie nous permettrait de déterminer laquelle des deux voies est nécessaire à l'effet inhibiteur de l'IL-4. Les résultats obtenus pourraient ensuite être confirmés à l'aide d'inhibiteurs spécifiques. Ainsi l'implication de la voie IRS1/2 pourrait être confirmée à l'aide des différents inhibiteurs spécifiques contre la PI3K, la PKC et Akt, les trois kinases activées par IRS1/2 (487). IRS1/2 active également la GTPase Ras qui active à son tour la voie des MAPK. L'utilisation d'un dominant négatif de Ras, c'est-à-dire une protéine Ras constitutivement liée au GDP, permettrait d'analyser

l'implication de cette voie dans l'effet inhibiteur de l'IL-4. Finalement, l'implication de la voie STAT6 pourrait être confirmée par l'utilisation d'une construction codant pour une protéine STAT6 dont le domaine C-terminal est délété. Ce domaine étant nécessaire à la phosphorylation et à la dimérisation de STAT6, sa délétion bloquerait son habileté à activer la transcription (520). Une construction codant pour une protéine STAT6 dont les résidus Arg conservés du domaine SH2 sont mutés, résidus critiques pour la liaison des phosphotyrosines, pourrait également être utilisée afin d'abolir l'activité transcriptionnelle de STAT6. Si l'inhibition de l'infection par l'IL-4 nécessite la régulation de l'expression de certains gènes via STAT6, une analyse par puce à ADN des gènes modulés par l'IL-4 pourrait être effectuée.

Dans un deuxième temps, nous pourrions analyser si l'IL-4 induit l'expression d'APOBEC3G ou de TRIM5 α , deux protéines cellulaires reconnues comme pouvant inhiber l'infection par le VIH-1 (68, 208, 209). Cette stratégie viserait simplement à mesurer leur expression (ARNm et de protéines) en présence ou non d'IL-4. Dans le cas d'APOBEC3G, des études sur l'état d'activation pourraient également être effectuées. En effet, le complexe APOBEC3G peut se trouver sous une forme de haut poids moléculaire, qui est inactive, ou sous une forme de bas poids moléculaire, qui est active (496). Ces différentes formes peuvent être isolées à l'aide d'une centrifugation sur un gradient suivi d'une analyse par hybridation de type Western. Le ratio de la forme activée sur la forme non-activée en présence ou non d'IL-4 nous indiquerait si l'IL-4 est capable d'activer APOBEC3G dans les cellules épithéliales intestinales.

Finalement, nous pourrions analyser si l'inhibition découle de l'ubiquitination de la capsid virale, suite à sa phosphorylation par des kinases activées par l'IL-4, entraînant ainsi sa dégradation. L'utilisation de l'inhibiteur du protéasome MG-132 pourrait nous permettre de répondre à cette question.

9.4.2 La toxine du choléra

La principale perspective du projet de la toxine du choléra (CTx) et du VIH-1 est l'identification du mécanisme inhibiteur. Outre la PKA, la sous-unité A de la CTx active le système Epac (508, 509). L'utilisation d'un analogue de l'AMPc sélectif à l'activation du système Epac, le 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, le 8-pMeOPT-2'-Me-cAMP ou le 8-pHPT-2'-O-Me-cAMP, pourrait nous permettre de déterminer si l'activation de ce système entraîne une inhibition de l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1 (521). L'avantage de ces analogues est leur incapacité à activer la PKA. Si le système Epac s'avère important, nous pourrions déterminer quelle voie de signalisation est importante. Tel que décrit précédemment, certains effets de l'activation du système Epac passent via la GTPase Rap1 ou Rap2 (509). Afin de déterminer l'implication de ces GTPase, nous pourrions utiliser une construction d'un dominant négatif de la GTPase Rap1 ou Rap2. Nous pourrions également utiliser une construction de la protéine Spa1, une GAP (*GTPase activating protein*) qui hydrolyse le GTP présent sur la GTPase Rap la rendant ainsi inactive (Rap-GDP) (522). Le système Epac peut également interagir avec les protéines associées aux microtubules (515). Une analyse de l'intégrité du système de microtubules suite au traitement des cellules avec la CTx pourrait être effectuée grâce à une analyse par microscopie confocale en utilisant des anticorps contre la tubuline. De plus, une analyse par microscopie en temps réel pourrait également être utilisée afin d'analyser la fonctionnalité des microtubules. Finalement la GTPase Ras peut également être activée par le système Epac (509), et tout comme pour le projet sur l'IL-4, nous pourrions utiliser une construction codant pour un dominant négatif de Ras afin d'analyser son implication.

Si, tout comme la PKA, le système Epac ne semble pas impliqué dans l'inhibition de l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1, nous pourrions finalement analyser l'importance de la signalisation induite suite à la liaison de la CTx à son récepteur (GM1). Pour ces études, nous pourrions utiliser la sous-unité B de la CTx au lieu de la toxine complète. Si une inhibition de l'infection est observée avec la sous-unité B, les voies de signalisation pourraient être analysées. Puisque ces voies ne sont pas caractérisées, nous pourrions analyser les patrons de phosphorylation par hybridation de type western en

utilisant un anticorps contre les phosphotyrosines. Les modifications post-traductionnelles, telles la phosphorylation, pourraient également être analysées à l'aide d'un gel en deux dimensions suivi d'une analyse par spectrométrie de masse.

Une deuxième perspective du projet sur la CTx et le VIH-1 serait de déterminer l'étape du cycle viral qui est affectée par la CTx. Dans un premier temps, la fusion virale pourrait être analysée. En effet, malgré que l'entrée totale (cytoplasmique et endosomale) ne soit pas modulée, la fusion virale pourrait être inhibée par la CTx. L'essai de fusion basé sur la protéine Gag fusionnée à la luciférase *Renilla* décrit au chapitre 7 n'est cependant pas assez sensible pour être utilisé avec des virions du VIH-1. L'utilisation d'un essai de fusion basé sur des virus Vpr-BLAM pourrait peut-être permettre une meilleure sensibilité. Cette technique consiste à incuber les cellules cibles avec des virions dont la protéine Vpr est fusionnée à l'enzyme de la β -lactamase suivi d'une incubation avec le colorant CCF2. S'il y a eu fusion virale, la β -lactamase présente dans le cytoplasme va cliver le CCF2 et entraîner un changement dans son spectre d'émission qui peut ensuite être détecté par cytométrie de flux (523). Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'analyser l'effet de la CTx sur la transcription inverse. Malheureusement, pour des raisons encore indéterminées, la CTx semble interférer avec le PCR en temps réel et les résultats obtenus ne nous permettent pas de déterminer si cette étape est affectée. Finalement, le transport intracellulaire du VIH-1 pourrait être analysé grâce à la microscopie confocale en temps réel. Pour ces expériences, des virions fluorescents pourraient être générés par la co-transfection d'un plasmide codant pour le provirus complet et d'un plasmide codant pour un provirus dont la protéine virale Gag a été fusionnée à la GFP (*green fluorescent protein*) (524).

9.5 L'importance physiologique de nos travaux

Le GALT est un environnement riche en cytokines, lesquelles vont varier selon les conditions intestinales. Ainsi dans une situation d'homéostasie, les cytokines dites régulatrices (ex. IL-4, IL-10, TGF- β) vont être prédominantes tandis que dans des situations d'infection, la réponse immune T_H1 ou T_H2 va induire respectivement la sécrétion d'IL-12,

d'IFN- γ , d'IL-1 et de TNF- α ou d'IL-4, d'IL-10 et d'IL-13 (386). Les cellules épithéliales intestinales expriment une grande variété de récepteurs de cytokines et vont être continuellement influencées par ces dernières (434). La présence de ces diverses cytokines va également influencer leur réponse aux divers pathogènes tels que le VIH-1. Notre étude revêt une importance physiologique puisque nous montrons que l'environnement homéostatique est défavorable à l'infection des cellules épithéliales intestinales, et donc à la transmission du VIH-1. De plus, notre étude montre l'importance de traiter les infections intestinales qui mènent à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires car ces dernières favorisent l'infection par le VIH-1.

Les infections intestinales sont nombreuses et une grande majorité d'entre elles peuvent causer des diarrhées (335). Un mécanisme d'action commun de plusieurs de ces pathogènes, tels que *Escherichia coli* entérotoxique, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni* et les rotavirus, est l'augmentation de l'AMPc intracellulaire (351, 356, 359, 525). De plus, diverses cytokines produites lors de ces infections peuvent également induire une augmentation de l'AMPc au niveau des cellules épithéliales intestinales. La présence d'infection pourrait donc influencer positivement ou négativement la transmission du VIH-1 via les muqueuses intestinales. Notre étude est d'une importance physiologique puisqu'elle démontre que la présence de pathogènes intestinaux peut être défavorable à la transmission intestinale du VIH-1.

Finalement, bien que des virus de type X4 ont été utilisés dans nos études, les inhibitions observées en présence d'IL-4 et de la CTx sont indépendantes du tropisme viral (CXCR4 ou CCR5). Ceci a une grande importance physiologique puisque la transmission du VIH-1 implique presque exclusivement des virus de type R5 (526) et que les cellules épithéliales intestinales primaires expriment le récepteur CCR5 (44).

9.6 Les applications thérapeutiques

Nous avons montré que l'IL-4 et la CTx inhibent l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1. Tel que mentionné au chapitre 9.1 et 9.2, ces cellules jouent un rôle important lors de la transmission du VIH-1 au niveau des muqueuses intestinales, particulièrement chez le nouveau-né où il y a absence de traumatisme physique de l'épithélium (474, 479, 480). Dans les dernières années, les applications cliniques de la CTx ont été de plus en plus nombreuses dont son utilisation comme adjuvant ou comme agent thérapeutique potentiel pour le contrôle de maladies auto-immunes (366, 527-529). Les doses requises pour ces applications thérapeutiques sont beaucoup plus faibles que les doses qui induisent la diarrhée (359, 530). Une application thérapeutique potentielle de nos résultats serait l'utilisation, par la voie orale, de la CTx afin de diminuer les risques de transmission du VIH-1 via les muqueuses intestinales. Avant de débiter les études cliniques, il serait important d'analyser les effets possibles de la CTx sur l'infection, par le VIH-1, des autres types cellulaires présents au niveau du GALT (ex. cellules dendritiques). Il a déjà été démontré que la CTx pouvait augmenter l'infection des lymphocytes T CD4+ par des virus de tropisme X4 via l'induction de l'expression du corécepteur CXCR4 (502, 503). Cependant, des résultats préliminaires effectués dans notre laboratoire montrent que lorsque des virus de tropisme R5 sont utilisés, la CTx n'entraîne pas d'augmentation de l'infection des lymphocytes T CD4+. Puisque ce sont les virus R5 qui sont impliqués dans la primo-infection, ces études préliminaires devraient être effectuées avec ce tropisme viral (526).

Les études cliniques devraient ensuite débiter par l'analyse des effets secondaires de la CTx chez les chimpanzés versus sa capacité à inhiber la réplication *in vivo* du VIH-1. Le fait que seulement de faibles doses (100 pg/ml) soient nécessaires, *in vitro*, à l'effet inhibiteur et que les doses utilisées comme adjuvants n'entraînent pas d'effets secondaires sont encourageant pour une application clinique de la CTx visant à limiter la transmission du VIH-1 (359, 528). De plus, la bactérie *Vibrio cholerae* n'étant pas administrée, les effets secondaires, s'ils surviennent, ne seront que temporaires. Puisque l'infection des cellules épithéliales intestinales est surtout importante pour la transmission du VIH-1 chez les

nourrissons, l'innocuité de la CTx devra d'abord être confirmée chez les bébés chimpanzés. La poursuite des études, si les résultats préliminaires montrent l'innocuité de la CTx, permettrait de déterminer si la CTx peut empêcher la déplétion des lymphocytes T CD4+ au niveau du GALT lors de la primo-infection par le VIH-1.

Un fait très intéressant de l'utilisation de la CTx *in vivo*, est sa capacité à induire une réponse de type T_H2 et la production des cytokines IL-4, IL-5 et IL-10 ou une réponse mixte T_H1/T_H2 et la sécrétion d'IL-4 et d'IFN- γ (531). Cette sécrétion d'IL-4 suite à l'ingestion orale de la CTx rehausserait l'effet inhibiteur de la CTx puisque nous avons démontré que l'IL-4 inhibe également la réplication virale. Donc en conclusion, l'utilisation de la CTx *in vivo* pourrait réduire la transmission du VIH-1 via les muqueuses intestinales, soit directement par son effet inhibiteur sur la réplication virale ou indirectement par l'induction de la sécrétion d'IL-4.

Chapitre 10 : Conclusion

Les cellules épithéliales intestinales sont importantes lors de la transmission intestinale du VIH-1. Elles permettent aux virus d'atteindre le GALT, soit directement via la transcytose ou indirectement suite à l'infection des cellules épithéliales et la production de nouvelles particules virales au niveau de la membrane basolatérale (en contact avec le GALT). Dans cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'influence des cytokines et des pathogènes sur l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1. Nous avons donc analysé les principales cytokines présentes au niveau du GALT soit l'IL-1, l'IL-4, l'IL-6, l'IL-10, l'IL-13 et le TNF- α . Pour l'influence des pathogènes intestinaux, nous avons utilisé la toxine du choléra (CTx) puisque cette dernière induit une augmentation de l'AMPc, un mécanisme commun à plusieurs entéropathogènes.

Dans un premier temps, nos résultats montrent que les cytokines pro-inflammatoires IL-1 et TNF- α augmentent la transcription virale tandis que les cytokines IL-4 et IL-13 inhibent la réplication virale. L'IL-4 agit en diminuant l'expression des récepteurs GalCer et CXCR4, mais également en diminuant la synthèse de l'ADN viral. Dans un deuxième temps, nos résultats montrent que la CTx inhibe la réplication virale et que cette inhibition est indépendante de l'expression des récepteurs CXCR4 et GalCer, de la transactivation virale et de l'activation de la PKA.

Globalement, nos résultats démontrent que les conditions d'homéostasies, c'est-à-dire celles favorisant la sécrétion d'IL-4, sont défavorables à l'infection des cellules épithéliales intestinales par le VIH-1. De plus, ils démontrent que la présence de certains pathogènes entériques, tels que *Vibrio cholerae*, pourraient également être défavorables à l'infection par le VIH-1. Ces résultats peuvent avoir des applications thérapeutiques importantes comme l'utilisation de la CTx afin de réduire les risques de transmission du VIH-1. Cette application est d'autant plus intéressante du fait que l'utilisation par la voie orale de la CTx entraîne la sécrétion de l'IL-4.

Bibliographie

1. Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-871.
2. Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, and et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-503.
3. Levy, J. A., A. D. Hoffman, S. M. Kramer, J. A. Landis, J. M. Shimabukuro, and L. S. Oshiro. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225:840-842.
4. Gonda, M. A., F. Wong-Staal, R. C. Gallo, J. E. Clements, O. Narayan, and R. V. Gilden. 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* 227:173-177.
5. Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and et al. 1986. Human immunodeficiency viruses. *Science* 232:697.
6. Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dautet, C. Katlama, C. Rouzioux, and et al. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233:343-346.
7. Zhu, T., B. T. Korber, A. J. Nahmias, E. Hooper, P. M. Sharp, and D. D. Ho. 1998. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391:594-597.
8. Korber, B., M. Muldoon, J. Theiler, F. Gao, R. Gupta, A. Lapedes, B. H. Hahn, S. Wolinsky, and T. Bhattacharya. 2000. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 288:1789-1796.
9. Korber, B., B. Gaschen, K. Yusim, R. Thakallapally, C. Kesmir, and V. Detours. 2001. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull* 58:19-42.
10. Rowland-Jones, S. L. 2003. Timeline: AIDS pathogenesis: what have two decades of HIV research taught us? *Nat Rev Immunol* 3:343-348.
11. Mascola, J. R., S. S. Frankel, and K. Brolden. 2000. HIV-1 entry at the mucosal surface: role of antibodies in protection. *Aids* 14 Suppl 3:S167-174.
12. Ridzon, R., K. Gallagher, C. Ciesielski, M. B. Ginsberg, B. J. Robertson, C. C. Luo, and A. DeMaria, Jr. 1997. Simultaneous transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus from a needle-stick injury. *N Engl J Med* 336:919-922.
13. Niu, M. T., D. S. Stein, and S. M. Schnittman. 1993. Primary human immunodeficiency virus type 1 infection: review of pathogenesis and early treatment intervention in humans and animal retrovirus infections. *J Infect Dis* 168:1490-1501.
14. Kahn, J. O., and B. D. Walker. 1998. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 339:33-39.

15. Mellors, J. W., C. R. Rinaldo, Jr., P. Gupta, R. M. White, J. A. Todd, and L. A. Kingsley. 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272:1167-1170.
16. Wei, X., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johnson, E. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn, and et al. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373:117-122.
17. Weber, J. 2001. The pathogenesis of HIV-1 infection. *Br Med Bull* 58:61-72.
18. Ho, D. D., and P. D. Bieniasz. 2008. HIV-1 at 25. *Cell* 133:561-565.
19. Chun, T. W., and A. S. Fauci. 1999. Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10958-10961.
20. Chun, T. W., L. Stuyver, S. B. Mizell, L. A. Ehler, J. A. Mican, M. Baseler, A. L. Lloyd, M. A. Nowak, and A. S. Fauci. 1997. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13193-13197.
21. Finzi, D., J. Blankson, J. D. Siliciano, J. B. Margolick, K. Chadwick, T. Pierson, K. Smith, J. Lisziewicz, F. Lori, C. Flexner, T. C. Quinn, R. E. Chaisson, E. Rosenberg, B. Walker, S. Gange, J. Gallant, and R. F. Siliciano. 1999. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 5:512-517.
22. Finzi, D., M. Hermankova, T. Pierson, L. M. Carruth, C. Buck, R. E. Chaisson, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D. D. Ho, D. D. Richman, and R. F. Siliciano. 1997. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278:1295-1300.
23. Wong, J. K., M. Hezareh, H. F. Gunthard, D. V. Havlir, C. C. Ignacio, C. A. Spina, and D. D. Richman. 1997. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 278:1291-1295.
24. Siliciano, J. D., J. Kajdas, D. Finzi, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. B. Margolick, C. Kovacs, S. J. Gange, and R. F. Siliciano. 2003. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med* 9:727-728.
25. Chun, T. W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J. A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T. C. Quinn, Y. H. Kuo, R. Brookmeyer, M. A. Zeiger, P. Barditch-Crovo, and R. F. Siliciano. 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387:183-188.
26. Brooks, D. G., D. H. Hamer, P. A. Arlen, L. Gao, G. Bristol, C. M. Kitchen, E. A. Berger, and J. A. Zack. 2003. Molecular characterization, reactivation, and depletion of latent HIV. *Immunity* 19:413-423.
27. Davey, R. T., Jr., D. G. Chaitt, J. M. Albert, S. C. Piscitelli, J. A. Kovacs, R. E. Walker, J. Falloon, M. A. Polis, J. A. Metcalf, H. Masur, R. Dewar, M. Baseler, G. Fyfe, M. A. Giedlin, and H. C. Lane. 1999. A randomized trial of high- versus low-dose subcutaneous interleukin-2 outpatient therapy for early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 179:849-858.
28. Wang, F. X., Y. Xu, J. Sullivan, E. Souder, E. G. Argyris, E. A. Acheampong, J. Fisher, M. Sierra, M. M. Thomson, R. Najera, I. Frank, J. Kulkosky, R. J. Pomerantz, and G. Nunnari. 2005. IL-7 is a potent and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART. *J Clin Invest* 115:128-137.

29. 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* 77:8227-8236.
30. Chermann, J. C. 1998. Sexual and mother-to-child transmission of the human immunodeficiency virus type 1: a review. *Am J Reprod Immunol* 40:183-186.
31. Royce, R. A., A. Sena, W. Cates, Jr., and M. S. Cohen. 1997. Sexual transmission of HIV. *N Engl J Med* 336:1072-1078.
32. Galvin, S. R., and M. S. Cohen. 2004. The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission. *Nat Rev Microbiol* 2:33-42.
33. Zagury, D., J. Bernard, J. Leibowitch, B. Safai, J. E. Groopman, M. Feldman, M. G. Sarngadharan, and R. C. Gallo. 1984. HTLV-III in cells cultured from semen of two patients with AIDS. *Science* 226:449-451.
34. Vogt, M. W., D. J. Witt, D. E. Craven, R. Byington, D. F. Crawford, R. T. Schooley, and M. S. Hirsch. 1986. Isolation of HTLV-III/LAV from cervical secretions of women at risk for AIDS. *Lancet* 1:525-527.
35. Lehman, D. A., and C. Farquhar. 2007. Biological mechanisms of vertical human immunodeficiency virus (HIV-1) transmission. *Rev Med Virol* 17:381-403.
36. Maury, W., B. J. Potts, and A. B. Rabson. 1989. HIV-1 infection of first-trimester and term human placental tissue: a possible mode of maternal-fetal transmission. *J Infect Dis* 160:583-588.
37. Lagaye, S., M. Derrien, E. Menu, C. Coito, E. Tresoldi, P. Mauclere, G. Scarlatti, G. Chaouat, F. Barre-Sinoussi, and M. Bomsel. 2001. Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasiespecies across a trophoblastic barrier by both transtocytosis and infection. *J Virol* 75:4780-4791.
38. De Cock, K. M., M. G. Fowler, E. Mercier, I. de Vincenzi, J. Saba, E. Hoff, D. J. Alnwick, M. Rogers, and N. Shaffer. 2000. Prevention of mother-to-child HIV transmission in resource-poor countries: translating research into policy and practice. *Jama* 283:1175-1182.
39. 1999. The mode of delivery and the risk of vertical transmission of human immunodeficiency virus type 1--a meta-analysis of 15 prospective cohort studies. The International Perinatal HIV Group. *N Engl J Med* 340:977-987.
40. Lewis, P., R. Nduati, J. K. Kreiss, G. C. John, B. A. Richardson, D. Mbori-Ngacha, J. Ndinya-Achola, and J. Overbaugh. 1998. Cell-free human immunodeficiency virus type 1 in breast milk. *J Infect Dis* 177:34-39.
41. Van de Perre, P., A. Simonon, D. G. Hitimana, F. Dabis, P. Msellati, B. Mukamabano, J. B. Butera, C. Van Goethem, E. Karita, and P. Lepage. 1993. Infective and anti-infective properties of breastmilk from HIV-1-infected women. *Lancet* 341:914-918.
42. Nduati, R. W., G. C. John, B. A. Richardson, J. Overbaugh, M. Welch, J. Ndinya-Achola, S. Moses, K. Holmes, F. Onyango, and J. K. Kreiss. 1995. Human immunodeficiency virus type 1-infected cells in breast milk: association with immunosuppression and vitamin A deficiency. *J Infect Dis* 172:1461-1468.
43. Janoff, E. N., and P. D. Smith. 2001. Emerging concepts in gastrointestinal aspects of HIV-1 pathogenesis and management. *Gastroenterology* 120:607-621.
44. Meng, G., X. Wei, X. Wu, M. T. Sellers, J. M. Decker, Z. Moldoveanu, J. M. Orenstein, M. F. Graham, J. C. Kappes, J. Mestecky, G. M. Shaw, and P. D. Smith.

2002. Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells. *Nat Med* 8:150-156.
45. Smith, P. D., G. Meng, J. F. Salazar-Gonzalez, and G. M. Shaw. 2003. Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir. *J Leukoc Biol* 74:642-649.
46. Van de Perre, P. 1999. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 through breast-feeding: how can it be prevented? *J Infect Dis* 179 Suppl 3:S405-407.
47. Ongradi, J., L. Ceccherini-Nelli, M. Pistello, S. Specter, and M. Bendinelli. 1990. Acid sensitivity of cell-free and cell-associated HIV-1: clinical implications. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6:1433-1436.
48. Kotler, D. P. 2005. HIV infection and the gastrointestinal tract. *Aids* 19:107-117.
49. Nannini, E. C., and P. C. Okhuysen. 2002. HIV1 and the gut in the era of highly active antiretroviral therapy. *Curr Gastroenterol Rep* 4:392-398.
50. Wu, L., and V. N. KewalRamani. 2006. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat Rev Immunol* 6:859-868.
51. Persaud, D., Y. Zhou, J. M. Siliciano, and R. F. Siliciano. 2003. Latency in human immunodeficiency virus type 1 infection: no easy answers. *J Virol* 77:1659-1665.
52. Ruff, C. T., S. C. Ray, P. Kwon, R. Zinn, A. Pendleton, N. Hutton, R. Ashworth, S. Gange, T. C. Quinn, R. F. Siliciano, and D. Persaud. 2002. Persistence of wild-type virus and lack of temporal structure in the latent reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in pediatric patients with extensive antiretroviral exposure. *J Virol* 76:9481-9492.
53. Robinson, H. L. 2007. HIV/AIDS vaccines: 2007. *Clin Pharmacol Ther* 82:686-693.
54. Whitney, J. B., and R. M. Ruprecht. 2004. Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects. *Curr Opin Infect Dis* 17:17-26.
55. Stott, E. J. 1994. Towards a vaccine against AIDS: lessons from simian immunodeficiency virus vaccines. *Curr Top Microbiol Immunol* 188:221-237.
56. Gilbert, P. B., M. L. Peterson, D. Follmann, M. G. Hudgens, D. P. Francis, M. Gurwith, W. L. Heyward, D. V. Jobes, V. Popovic, S. G. Self, F. Sinangil, D. Burke, and P. W. Berman. 2005. Correlation between immunologic responses to a recombinant glycoprotein 120 vaccine and incidence of HIV-1 infection in a phase 3 HIV-1 preventive vaccine trial. *J Infect Dis* 191:666-677.
57. Kwong, P. D., M. L. Doyle, D. J. Casper, C. Cicala, S. A. Leavitt, S. Majeed, T. D. Steenbeke, M. Venturi, I. Chaiken, M. Fung, H. Katinger, P. W. Parren, J. Robinson, D. Van Ryk, L. Wang, D. R. Burton, E. Freire, R. Wyatt, J. Sodroski, W. A. Hendrickson, and J. Arthos. 2002. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* 420:678-682.
58. Walker, B. D., and D. R. Burton. 2008. Toward an AIDS vaccine. *Science* 320:760-764.
59. Aloia, R. C., F. C. Jensen, C. C. Curtain, P. W. Mobley, and L. M. Gordon. 1988. Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:900-904.
60. Briggs, J. A., M. N. Simon, I. Gross, H. G. Krausslich, S. D. Fuller, V. M. Vogt, and M. C. Johnson. 2004. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol* 11:672-675.

61. Huet, T., R. Cheyrier, A. Meyerhans, G. Roelants, and S. Wain-Hobson. 1990. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 345:356-359.
62. Oberste, M. S., and M. A. Gonda. 1992. Conservation of amino-acid sequence motifs in lentivirus Vif proteins. *Virus Genes* 6:95-102.
63. Schwartz, S., B. K. Felber, and G. N. Pavlakis. 1991. Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is Rev-dependent and regulated by splicing. *Virology* 183:677-686.
64. Khan, M. A., C. Aberham, S. Kao, H. Akari, R. Gorelick, S. Bour, and K. Strebel. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein complex through an interaction with viral genomic RNA. *J Virol* 75:7252-7265.
65. Gabuzda, D. H., H. Li, K. Lawrence, B. S. Vasir, K. Crawford, and E. Langhoff. 1994. Essential role of vif in establishing productive HIV-1 infection in peripheral blood T lymphocytes and monocyte/macrophages. *J Acquir Immune Defic Syndr* 7:908-915.
66. Kishi, M., Y. Nishino, M. Sumiya, K. Ohki, T. Kimura, T. Goto, M. Nakai, M. Kakinuma, and K. Ikuta. 1992. Cells surviving infection by human immunodeficiency virus type 1: vif or vpu mutants produce non-infectious or markedly less cytopathic viruses. *J Gen Virol* 73 (Pt 1):77-87.
67. Madani, N., and D. Kabat. 1998. An endogenous inhibitor of human immunodeficiency virus in human lymphocytes is overcome by the viral Vif protein. *J Virol* 72:10251-10255.
68. Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, J. D. Choi, and M. H. Malim. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418:646-650.
69. Carr, J. M., A. J. Davis, C. Coolen, K. Cheney, C. J. Burrell, and P. Li. 2006. Vif-deficient HIV reverse transcription complexes (RTCs) are subject to structural changes and mutation of RTC-associated reverse transcription products. *Virology* 351:80-91.
70. Khan, M. A., S. Kao, E. Miyagi, H. Takeuchi, R. Goila-Gaur, S. Opi, C. L. Gipson, T. G. Parslow, H. Ly, and K. Strebel. 2005. Viral RNA is required for the association of APOBEC3G with human immunodeficiency virus type 1 nucleoprotein complexes. *J Virol* 79:5870-5874.
71. Yu, X., Y. Yu, B. Liu, K. Luo, W. Kong, P. Mao, and X. F. Yu. 2003. Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302:1056-1060.
72. Kotler, M., M. Simm, Y. S. Zhao, P. Sova, W. Chao, S. F. Ohnona, R. Roller, C. Krachmarov, M. J. Potash, and D. J. Volsky. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protein Vif inhibits the activity of HIV-1 protease in bacteria and in vitro. *J Virol* 71:5774-5781.
73. Strebel, K. 2007. HIV accessory genes Vif and Vpu. *Adv Pharmacol* 55:199-232.
74. Tristem, M., A. Purvis, and D. L. Quicke. 1998. Complex evolutionary history of primate lentiviral vpr genes. *Virology* 240:232-237.
75. Addo, M. M., M. Altfeld, A. Rathod, M. Yu, X. G. Yu, P. J. Goulder, E. S. Rosenberg, and B. D. Walker. 2002. HIV-1 Vpu represents a minor target for cytotoxic T lymphocytes in HIV-1-infection. *Aids* 16:1071-1073.

76. Gallay, P., V. Stitt, C. Mundy, M. Oettinger, and D. Trono. 1996. Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J Virol* 70:1027-1032.
77. Popov, S., M. Rexach, G. Zybarth, N. Reiling, M. A. Lee, L. Ratner, C. M. Lane, M. S. Moore, G. Blobel, and M. Bukrinsky. 1998. Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Embo J* 17:909-917.
78. Popov, S., M. Rexach, L. Ratner, G. Blobel, and M. Bukrinsky. 1998. Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 273:13347-13352.
79. de Noronha, C. M., M. P. Sherman, H. W. Lin, M. V. Cavrois, R. D. Moir, R. D. Goldman, and W. C. Greene. 2001. Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr. *Science* 294:1105-1108.
80. Zhao, R. Y., R. T. Elder, and M. Bukrinsky. 2007. Interactions of HIV-1 viral protein R with host cell proteins. *Adv Pharmacol* 55:233-260.
81. Green, D. R., and G. Kroemer. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629.
82. Muthumani, K., A. Y. Choo, D. S. Hwang, M. A. Chattergoon, N. N. Dayes, D. Zhang, M. D. Lee, U. Duvvuri, and D. B. Weiner. 2003. Mechanism of HIV-1 viral protein R-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304:583-592.
83. Yedavalli, V. S., H. M. Shih, Y. P. Chiang, C. Y. Lu, L. Y. Chang, M. Y. Chen, C. Y. Chuang, A. I. Dayton, K. T. Jeang, and L. M. Huang. 2005. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with antiapoptotic mitochondrial protein HAX-1. *J Virol* 79:13735-13746.
84. Lu, Y. L., P. Spearman, and L. Ratner. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol* 67:6542-6550.
85. Roumier, T., H. L. Vieira, M. Castedo, K. F. Ferri, P. Boya, K. Andreau, S. Druillennec, N. Joza, J. M. Penninger, B. Roques, and G. Kroemer. 2002. The C-terminal moiety of HIV-1 Vpr induces cell death via a caspase-independent mitochondrial pathway. *Cell Death Differ* 9:1212-1219.
86. Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1988. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature* 334:532-534.
87. Schneider, T., P. Hildebrandt, W. Ronspeck, W. Weigelt, and G. Pauli. 1990. The antibody response to the HIV-1 specific "out" (vpu) protein: identification of an immunodominant epitope and correlation of antibody detectability to clinical stages. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6:943-950.
88. Bour, S., and K. Strebel. 1996. The human immunodeficiency virus (HIV) type 2 envelope protein is a functional complement to HIV type 1 Vpu that enhances particle release of heterologous retroviruses. *J Virol* 70:8285-8300.
89. Terwilliger, E. F., E. A. Cohen, Y. C. Lu, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5163-5167.
90. Deora, A., and L. Ratner. 2001. Viral protein U (Vpu)-mediated enhancement of human immunodeficiency virus type 1 particle release depends on the rate of cellular proliferation. *J Virol* 75:6714-6718.
91. Handley, M. A., S. Paddock, A. Dall, and A. T. Panganiban. 2001. Association of Vpu-binding protein with microtubules and Vpu-dependent redistribution of HIV-1 Gag protein. *Virology* 291:198-207.

92. Schubert, U., A. V. Ferrer-Montiel, M. Oblatt-Montal, P. Henklein, K. Strebel, and M. Montal. 1996. Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS Lett* 398:12-18.
93. Varthakavi, V., R. M. Smith, S. P. Bour, K. Strebel, and P. Spearman. 2003. Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15154-15159.
94. Neil, S. J., T. Zang, and P. D. Bieniasz. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451:425-430.
95. Jabbar, M. A., and D. P. Nayak. 1990. Intracellular interaction of human immunodeficiency virus type 1 (ARV-2) envelope glycoprotein gp160 with CD4 blocks the movement and maturation of CD4 to the plasma membrane. *J Virol* 64:6297-6304.
96. Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* 66:7193-7200.
97. Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol* 66:226-234.
98. Margottin, F., S. P. Bour, H. Durand, L. Selig, S. Benichou, V. Richard, D. Thomas, K. Strebel, and R. Benarous. 1998. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell* 1:565-574.
99. Foster, J. L., and J. V. Garcia. 2007. Role of Nef in HIV-1 replication and pathogenesis. *Adv Pharmacol* 55:389-409.
100. Ahmad, N., and S. Venkatesan. 1988. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* 241:1481-1485.
101. Anderson, S. J., M. Lenburg, N. R. Landau, and J. V. Garcia. 1994. The cytoplasmic domain of CD4 is sufficient for its down-regulation from the cell surface by human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J Virol* 68:3092-3101.
102. Benson, R. E., A. Sanfridson, J. S. Ottinger, C. Doyle, and B. R. Cullen. 1993. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J Exp Med* 177:1561-1566.
103. Lama, J. 2003. The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection. *Curr HIV Res* 1:167-184.
104. Ross, T. M., A. E. Oran, and B. R. Cullen. 1999. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol* 9:613-621.
105. Simmons, A., V. Aluvihare, and A. McMichael. 2001. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity* 14:763-777.
106. Arora, V. K., B. L. Fredericksen, and J. V. Garcia. 2002. Nef: agent of cell subversion. *Microbes Infect* 4:189-199.
107. Arora, V. K., R. P. Molina, J. L. Foster, J. L. Blakemore, J. Chernoff, B. L. Fredericksen, and J. V. Garcia. 2000. Lentivirus Nef specifically activates Pak2. *J Virol* 74:11081-11087.

108. Renkema, G. H., A. Manninen, D. A. Mann, M. Harris, and K. Saksela. 1999. Identification of the Nef-associated kinase as p21-activated kinase 2. *Curr Biol* 9:1407-1410.
109. Schwartz, O., V. Marechal, S. Le Gall, F. Lemonnier, and J. M. Heard. 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 2:338-342.
110. Zheng, Y. H., A. Plemenitas, T. Linnemann, O. T. Fackler, and B. M. Peterlin. 2001. Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts. *Curr Biol* 11:875-879.
111. 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.
112. Campbell, E. M., R. Nunez, and T. J. Hope. 2004. Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* 78:5745-5755.
113. Kuppaswamy, M., T. Subramanian, A. Srinivasan, and G. Chinnadurai. 1989. Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acids Res* 17:3551-3561.
114. Kjems, J., B. J. Calnan, A. D. Frankel, and P. A. Sharp. 1992. Specific binding of a basic peptide from HIV-1 Rev. *Embo J* 11:1119-1129.
115. Cochrane, A. W., A. Perkins, and C. A. Rosen. 1990. Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function. *J Virol* 64:881-885.
116. Zapp, M. L., T. J. Hope, T. G. Parslow, and M. R. Green. 1991. Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7734-7738.
117. Fischer, U., J. Huber, W. C. Boelens, I. W. Mattaj, and R. Luhrmann. 1995. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82:475-483.
118. Tremblay, M. J., J. F. Fortin, and R. Cantin. 1998. The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunol Today* 19:346-351.
119. Mancini, E. J., M. Clarke, B. E. Gowen, T. Rutten, and S. D. Fuller. 2000. Cryo-electron microscopy reveals the functional organization of an enveloped virus, Semliki Forest virus. *Mol Cell* 5:255-266.
120. Henderson, L. E., R. Sowder, T. D. Copeland, S. Oroszlan, L. O. Arthur, W. G. Robey, and P. J. Fischinger. 1987. Direct identification of class II histocompatibility DR proteins in preparations of human T-cell lymphotropic virus type III. *J Virol* 61:629-632.
121. Orentas, R. J., and J. E. Hildreth. 1993. Association of host cell surface adhesion receptors and other membrane proteins with HIV and SIV. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9:1157-1165.
122. Ott, D. E. 2002. Potential roles of cellular proteins in HIV-1. *Rev Med Virol* 12:359-374.
123. Sattentau, Q. J., P. R. Clapham, R. A. Weiss, P. C. Beverley, L. Montagnier, M. F. Alhalabi, J. C. Gluckmann, and D. Klatzmann. 1988. The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule. *Aids* 2:101-105.

124. Millan, J., J. Cerny, V. Horejsi, and M. A. Alonso. 1999. CD4 segregates into specific detergent-resistant T-cell membrane microdomains. *Tissue Antigens* 53:33-40.
125. Littman, D. R. 1987. The structure of the CD4 and CD8 genes. *Annu Rev Immunol* 5:561-584.
126. Kruisbeek, A. M., J. J. Mond, B. J. Fowlkes, J. A. Carmen, S. Bridges, and D. L. Longo. 1985. Absence of the Lyt-2-,L3T4+ lineage of T cells in mice treated neonatally with anti-I-A correlates with absence of intrathymic I-A-bearing antigen-presenting cell function. *J Exp Med* 161:1029-1047.
127. Lamarre, D., D. J. Capon, D. R. Karp, T. Gregory, E. O. Long, and R. P. Sekaly. 1989. Class II MHC molecules and the HIV gp 120 envelope protein interact with functionally distinct regions of the CD4 molecule. *Embo J* 8:3271-3277.
128. Maddon, P. J., S. M. Molineaux, D. E. Maddon, K. A. Zimmerman, M. Godfrey, F. W. Alt, L. Chess, and R. Axel. 1987. Structure and expression of the human and mouse T4 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9155-9159.
129. Clark, S. J., W. A. Jefferies, A. N. Barclay, J. Gagnon, and A. F. Williams. 1987. Peptide and nucleotide sequences of rat CD4 (W3/25) antigen: evidence for derivation from a structure with four immunoglobulin-related domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:1649-1653.
130. Leahy, D. J. 1995. A structural view of CD4 and CD8. *Faseb J* 9:17-25.
131. Richardson, N. E., N. R. Brown, R. E. Hussey, A. Vaid, T. J. Matthews, D. P. Bolognesi, and E. L. Reinherz. 1988. Binding site for human immunodeficiency virus coat protein gp120 is located in the NH2-terminal region of T4 (CD4) and requires the intact variable-region-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:6102-6106.
132. Arthos, J., K. C. Deen, M. A. Chaikin, J. A. Fornwald, G. Sathe, Q. J. Sattentau, P. R. Clapham, R. A. Weiss, J. S. McDougal, C. Pietropaolo, and et al. 1989. Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV. *Cell* 57:469-481.
133. Clayton, L. K., M. Sieh, D. A. Pious, and E. L. Reinherz. 1989. Identification of human CD4 residues affecting class II MHC versus HIV-1 gp120 binding. *Nature* 339:548-551.
134. Mizukami, T., T. R. Fuerst, E. A. Berger, and B. Moss. 1988. Binding region for human immunodeficiency virus (HIV) and epitopes for HIV-blocking monoclonal antibodies of the CD4 molecule defined by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:9273-9277.
135. 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* 253:320-323.
136. Yahi, N., S. Baghdiguian, H. Moreau, and J. Fantini. 1992. Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. *J Virol* 66:4848-4854.
137. Bhat, S., R. V. Mettus, E. P. Reddy, K. E. Ugen, V. Srikanthan, W. V. Williams, and D. B. Weiner. 1993. The galactosyl ceramide/sulfatide receptor binding region of HIV-1 gp120 maps to amino acids 206-275. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9:175-181.

138. Cook, D. G., J. Fantini, S. L. Spitalnik, and F. Gonzalez-Scarano. 1994. Binding of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) gp120 to galactosylceramide (GalCer): relationship to the V3 loop. *Virology* 201:206-214.
139. Alfsen, A., and M. Bomsel. 2002. HIV-1 gp41 envelope residues 650-685 exposed on native virus act as a lectin to bind epithelial cell galactosyl ceramide. *J Biol Chem* 277:25649-25659.
140. Bagnarelli, P., L. Fiorelli, M. Vecchi, A. Monachetti, S. Menzo, and M. Clementi. 2003. Analysis of the functional relationship between V3 loop and gp120 context with regard to human immunodeficiency virus coreceptor usage using naturally selected sequences and different viral backbones. *Virology* 307:328-340.
141. Ogert, R. A., M. K. Lee, W. Ross, A. Buckler-White, M. A. Martin, and M. W. Cho. 2001. N-linked glycosylation sites adjacent to and within the V1/V2 and the V3 loops of dualtropic human immunodeficiency virus type 1 isolate DH12 gp120 affect coreceptor usage and cellular tropism. *J Virol* 75:5998-6006.
142. Ross, T. M., and B. R. Cullen. 1998. The ability of HIV type 1 to use CCR-3 as a coreceptor is controlled by envelope V1/V2 sequences acting in conjunction with a CCR-5 tropic V3 loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7682-7686.
143. Sharon, M., N. Kessler, R. Levy, S. Zolla-Pazner, M. Gorlach, and J. Anglister. 2003. Alternative conformations of HIV-1 V3 loops mimic beta hairpins in chemokines, suggesting a mechanism for coreceptor selectivity. *Structure* 11:225-236.
144. Zhang, Y. J., T. Dragic, Y. Cao, L. Kostrikis, D. S. Kwon, D. R. Littman, V. N. KewalRamani, and J. P. Moore. 1998. Use of coreceptors other than CCR5 by non-syncytium-inducing adult and pediatric isolates of human immunodeficiency virus type 1 is rare in vitro. *J Virol* 72:9337-9344.
145. Rucker, J., A. L. Edinger, M. Sharron, M. Samson, B. Lee, J. F. Berson, Y. Yi, B. Margulies, R. G. Collman, B. J. Doranz, M. Parmentier, and R. W. Doms. 1997. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol* 71:8999-9007.
146. Deng, H. K., D. Unutmaz, V. N. KewalRamani, and D. R. Littman. 1997. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 388:296-300.
147. Simmons, G., J. D. Reeves, S. Hibbitts, J. T. Stine, P. W. Gray, A. E. Proudfoot, and P. R. Clapham. 2000. Co-receptor use by HIV and inhibition of HIV infection by chemokine receptor ligands. *Immunol Rev* 177:112-126.
148. Willey, R. L., R. A. Rutledge, S. Dias, T. Folks, T. Theodore, C. E. Buckler, and M. A. Martin. 1986. Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5038-5042.
149. Wyatt, R., P. D. Kwong, E. Desjardins, R. W. Sweet, J. Robinson, W. A. Hendrickson, and J. G. Sodroski. 1998. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 393:705-711.
150. Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393:648-659.

151. Helseth, E., U. Olshevsky, C. Furman, and J. Sodroski. 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* 65:2119-2123.
152. Moore, J. P., Q. J. Sattentau, R. Wyatt, and J. Sodroski. 1994. Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J Virol* 68:469-484.
153. Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17:657-700.
154. Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim. 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 89:263-273.
155. Weissenhorn, W., A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley. 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387:426-430.
156. Bentz, J., and A. Mittal. 2000. Deployment of membrane fusion protein domains during fusion. *Cell Biol Int* 24:819-838.
157. Goff, S. P. 1990. Retroviral reverse transcriptase: synthesis, structure, and function. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3:817-831.
158. Trono, D. 1992. Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses. *J Virol* 66:4893-4900.
159. Huang, Y., J. Mak, Q. Cao, Z. Li, M. A. Wainberg, and L. Kleiman. 1994. Incorporation of excess wild-type and mutant tRNA(3Lys) into human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 68:7676-7683.
160. Auxilien, S., G. Keith, S. F. Le Grice, and J. L. Darlix. 1999. Role of post-transcriptional modifications of primer tRNA^{Lys,3} in the fidelity and efficacy of plus strand DNA transfer during HIV-1 reverse transcription. *J Biol Chem* 274:4412-4420.
161. Charneau, P., M. Alizon, and F. Clavel. 1992. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* 66:2814-2820.
162. Charneau, P., G. Mirambeau, P. Roux, S. Paulous, H. Buc, and F. Clavel. 1994. HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *J Mol Biol* 241:651-662.
163. Abbink, T. E., and B. Berkhout. 2007. HIV-1 reverse transcription: close encounters between the viral genome and a cellular tRNA. *Adv Pharmacol* 55:99-135.
164. Auewarakul, P., P. Wacharapornin, S. Srichatrapimuk, S. Chutipongtanate, and P. Puthavathana. 2005. Uncoating of HIV-1 requires cellular activation. *Virology* 337:93-101.
165. Hui, E. K. 2002. Virion-associated protein kinases. *Cell Mol Life Sci* 59:920-931.
166. Wacharapornin, P., D. Lauhakirti, and P. Auewarakul. 2007. The effect of capsid mutations on HIV-1 uncoating. *Virology* 358:48-54.
167. Arhel, N. J., S. Souquere-Besse, S. Munier, P. Souque, S. Guadagnini, S. Rutherford, M. C. Prevost, T. D. Allen, and P. Charneau. 2007. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *Embo J* 26:3025-3037.
168. Arhel, N., S. Munier, P. Souque, K. Mollier, and P. Charneau. 2006. Nuclear import defect of human immunodeficiency virus type 1 DNA flap mutants is not dependent on the viral strain or target cell type. *J Virol* 80:10262-10269.

169. Lewis, P., M. Hensel, and M. Emerman. 1992. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *Embo J* 11:3053-3058.
170. Roe, T., T. C. Reynolds, G. Yu, and P. O. Brown. 1993. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *Embo J* 12:2099-2108.
171. Farnet, C. M., and W. A. Haseltine. 1991. Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J Virol* 65:1910-1915.
172. Miller, M. D., C. M. Farnet, and F. D. Bushman. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* 71:5382-5390.
173. Hearps, A. C., and D. A. Jans. 2007. Regulating the functions of the HIV-1 matrix protein. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:341-346.
174. Bukrinsky, M. I., S. Haggerty, M. P. Dempsey, N. Sharova, A. Adzhubel, L. Spitz, P. Lewis, D. Goldfarb, M. Emerman, and M. Stevenson. 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* 365:666-669.
175. Depienne, C., P. Roques, C. Creminon, L. Fritsch, R. Casseron, D. Dormont, C. Dargemont, and S. Benichou. 2000. Cellular distribution and karyophilic properties of matrix, integrase, and Vpr proteins from the human and simian immunodeficiency viruses. *Exp Cell Res* 260:387-395.
176. Kukolj, G., K. S. Jones, and A. M. Skalka. 1997. Subcellular localization of avian sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1 integrases. *J Virol* 71:843-847.
177. Stevenson, M. 2000. HIV nuclear import: What's the flap? *Nat Med* 6:626-628.
178. Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier, and P. Charneau. 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* 101:173-185.
179. Dyda, F., A. B. Hickman, T. M. Jenkins, A. Engelman, R. Craigie, and D. R. Davies. 1994. Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science* 266:1981-1986.
180. Katzman, M., and R. A. Katz. 1999. Substrate recognition by retroviral integrases. *Adv Virus Res* 52:371-395.
181. Pauza, C. D. 1990. Two bases are deleted from the termini of HIV-1 linear DNA during integrative recombination. *Virology* 179:886-889.
182. Holman, A. G., and J. M. Coffin. 2005. Symmetrical base preferences surrounding HIV-1, avian sarcoma/leukosis virus, and murine leukemia virus integration sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:6103-6107.
183. Wu, X., Y. Li, B. Crise, S. M. Burgess, and D. J. Munroe. 2005. Weak palindromic consensus sequences are a common feature found at the integration target sites of many retroviruses. *J Virol* 79:5211-5214.
184. Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman. 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110:521-529.
185. Ciuffi, A., M. Llano, E. Poeschla, C. Hoffmann, J. Leipzig, P. Shinn, J. R. Ecker, and F. Bushman. 2005. A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med* 11:1287-1289.

186. Vandegraaff, N., and A. Engelman. 2007. Molecular mechanisms of HIV integration and therapeutic intervention. *Expert Rev Mol Med* 9:1-19.
187. Quivy, V., and C. Van Lint. 2002. Diversity of acetylation targets and roles in transcriptional regulation: the human immunodeficiency virus type 1 promoter as a model system. *Biochem Pharmacol* 64:925-934.
188. Copeland, K. F. 2005. Modulation of HIV-1 transcription by cytokines and chemokines. *Mini Rev Med Chem* 5:1093-1101.
189. Berkhout, B., R. H. Silverman, and K. T. Jeang. 1989. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 59:273-282.
190. Berkhout, B., and K. T. Jeang. 1992. Functional roles for the TATA promoter and enhancers in basal and Tat-induced expression of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* 66:139-149.
191. Perkins, N. D., N. L. Edwards, C. S. Duckett, A. B. Agranoff, R. M. Schmid, and G. J. Nabel. 1993. A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *Embo J* 12:3551-3558.
192. Feinberg, M. B., R. F. Jarrett, A. Aldovini, R. C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1986. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell* 46:807-817.
193. Meyer, B. E., and M. H. Malim. 1994. The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev* 8:1538-1547.
194. Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen. 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338:254-257.
195. Felber, B. K., C. M. Drysdale, and G. N. Pavlakis. 1990. Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein. *J Virol* 64:3734-3741.
196. Pollard, V. W., and M. H. Malim. 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* 52:491-532.
197. Malim, M. H., and B. R. Cullen. 1991. HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* 65:241-248.
198. Henderson, B. R., and P. Percipalle. 1997. Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J Mol Biol* 274:693-707.
199. Ono, A., and E. O. Freed. 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13925-13930.
200. Martin-Serrano, J., T. Zang, and P. D. Bieniasz. 2001. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* 7:1313-1319.
201. Ono, A., and E. O. Freed. 2004. Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol* 78:1552-1563.
202. Krausslich, H. G. 1991. Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3213-3217.

203. Jarmuz, A., A. Chester, J. Bayliss, J. Gisbourne, I. Dunham, J. Scott, and N. Navaratnam. 2002. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 79:285-296.
204. Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin, and D. Trono. 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* 424:99-103.
205. Strebel, K. 2005. APOBEC3G & HTLV-1: inhibition without deamination. *Retrovirology* 2:37.
206. Bishop, K. N., R. K. Holmes, A. M. Sheehy, N. O. Davidson, S. J. Cho, and M. H. Malim. 2004. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Curr Biol* 14:1392-1396.
207. Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, and M. H. Malim. 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 9:1404-1407.
208. Stremlau, M., C. M. Owens, M. J. Perron, M. Kiessling, P. Autissier, and J. Sodroski. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427:848-853.
209. Wu, X., J. L. Anderson, E. M. Campbell, A. M. Joseph, and T. J. Hope. 2006. Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5alpha restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7465-7470.
210. Luban, J. 2007. Cyclophilin A, TRIM5, and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 81:1054-1061.
211. Braaten, D., C. Aberham, E. K. Franke, L. Yin, W. Phares, and J. Luban. 1996. Cyclosporine A-resistant human immunodeficiency virus type 1 mutants demonstrate that Gag encodes the functional target of cyclophilin A. *J Virol* 70:5170-5176.
212. Franke, E. K., H. E. Yuan, and J. Luban. 1994. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* 372:359-362.
213. Towers, G. J., T. Hatzioannou, S. Cowan, S. P. Goff, J. Luban, and P. D. Bieniasz. 2003. Cyclophilin A modulates the sensitivity of HIV-1 to host restriction factors. *Nat Med* 9:1138-1143.
214. Stremlau, M., B. Song, H. Javanbakht, M. Perron, and J. Sodroski. 2006. Cyclophilin A: an auxiliary but not necessary cofactor for TRIM5alpha restriction of HIV-1. *Virology* 351:112-120.
215. Sokolskaja, E., L. Berthoux, and J. Luban. 2006. Cyclophilin A and TRIM5alpha independently regulate human immunodeficiency virus type 1 infectivity in human cells. *J Virol* 80:2855-2862.
216. Asjo, B., L. Morfeldt-Manson, J. Albert, G. Biberfeld, A. Karlsson, K. Lidman, and E. M. Fenyo. 1986. Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. *Lancet* 2:660-662.
217. Tersmette, M., R. E. de Goede, B. J. Al, I. N. Winkel, R. A. Gruters, H. T. Cuypers, H. G. Huisman, and F. Miedema. 1988. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol* 62:2026-2032.
218. Klatzmann, D., F. Barre-Sinoussi, M. T. Nugeyre, C. Danquet, E. Vilmer, C. Griscelli, F. Brun-Veziret, C. Rouzioux, J. C. Gluckman, J. C. Chermann, and et al.

1984. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science* 225:59-63.
219. Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312:767-768.
220. Marvel, J., E. Lightstone, N. L. Samberg, D. Ettinghausen, and H. J. Stauss. 1991. The CD45RA molecule is expressed in naive murine CTL precursors but absent in memory and effector CTL. *Int Immunol* 3:21-28.
221. Woods, T. C., B. D. Roberts, S. T. Butera, and T. M. Folks. 1997. Loss of inducible virus in CD45RA naive cells after human immunodeficiency virus-1 entry accounts for preferential viral replication in CD45RO memory cells. *Blood* 89:1635-1641.
222. Spina, C. A., H. E. Prince, and D. D. Richman. 1997. Preferential replication of HIV-1 in the CD45RO memory cell subset of primary CD4 lymphocytes in vitro. *J Clin Invest* 99:1774-1785.
223. Robichaud, G. A., B. Barbeau, J. F. Fortin, D. M. Rothstein, and M. J. Tremblay. 2002. Nuclear factor of activated T cells is a driving force for preferential productive HIV-1 infection of CD45RO-expressing CD4+ T cells. *J Biol Chem* 277:23733-23741.
224. Bleul, C. C., L. Wu, J. A. Hoxie, T. A. Springer, and C. R. Mackay. 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1925-1930.
225. Gartner, S., P. Markovits, D. M. Markovitz, M. H. Kaplan, R. C. Gallo, and M. Popovic. 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 233:215-219.
226. Koenig, S., H. E. Gendelman, J. M. Orenstein, M. C. Dal Canto, G. H. Pezeshkpour, M. Yungbluth, F. Janotta, A. Aksamit, M. A. Martin, and A. S. Fauci. 1986. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* 233:1089-1093.
227. Embretson, J., M. Zupancic, J. L. Ribas, A. Burke, P. Racz, K. Tenner-Racz, and A. T. Haase. 1993. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 362:359-362.
228. Eckstein, D. A., M. P. Sherman, M. L. Penn, P. S. Chin, C. M. De Noronha, W. C. Greene, and M. A. Goldsmith. 2001. HIV-1 Vpr enhances viral burden by facilitating infection of tissue macrophages but not nondividing CD4+ T cells. *J Exp Med* 194:1407-1419.
229. Igarashi, T., H. Imamichi, C. R. Brown, V. M. Hirsch, and M. A. Martin. 2003. The emergence and characterization of macrophage-tropic SIV/HIV chimeric viruses (SHIVs) present in CD4+ T cell-depleted rhesus monkeys. *J Leukoc Biol* 74:772-780.
230. Orenstein, J. M., M. S. Meltzer, T. Phipps, and H. E. Gendelman. 1988. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J Virol* 62:2578-2586.
231. Swingler, S., B. Brichacek, J. M. Jacque, C. Ulich, J. Zhou, and M. Stevenson. 2003. HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection. *Nature* 424:213-219.

232. Granelli-Piperno, A., E. Delgado, V. Finkel, W. Paxton, and R. M. Steinman. 1998. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol* 72:2733-2737.
233. Granelli-Piperno, A., V. Finkel, E. Delgado, and R. M. Steinman. 1999. Virus replication begins in dendritic cells during the transmission of HIV-1 from mature dendritic cells to T cells. *Curr Biol* 9:21-29.
234. Levy, J. A. 2006. HIV pathogenesis: knowledge gained after two decades of research. *Adv Dent Res* 19:10-16.
235. Maury, J., C. Nicoletti, L. Guzzo-Chambraud, and S. Maroux. 1995. The filamentous brush border glycocalyx, a mucin-like marker of enterocyte hyperpolarization. *Eur J Biochem* 228:323-331.
236. Mayer, L. 2000. Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30 Suppl:S4-12.
237. Magalhaes, J. G., I. Tattoli, and S. E. Girardin. 2007. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol* 19:106-115.
238. Wershil, B. K., and G. T. Furuta. 2008. 4. Gastrointestinal mucosal immunity. *J Allergy Clin Immunol* 121:S380-383; quiz S415.
239. Niess, J. H. 2008. Role of mucosal dendritic cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14:5138-5148.
240. Spahn, T. W., and T. Kucharzik. 2004. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* 53:456-465.
241. Kiyono, H., J. Bienenstock, J. R. McGhee, and P. B. Ernst. 1992. The mucosal immune system: features of inductive and effector sites to consider in mucosal immunization and vaccine development. *Reg Immunol* 4:54-62.
242. Picker, L. J., and E. C. Butcher. 1992. Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 10:561-591.
243. MacDonald, T. T. 2003. The mucosal immune system. *Parasite Immunol* 25:235-246.
244. Brandtzaeg, P., V. Bosnes, T. S. Halstensen, H. Scott, L. M. Sollid, and K. N. Valnes. 1989. T lymphocytes in human gut epithelium preferentially express the alpha/beta antigen receptor and are often CD45/UCHL1-positive. *Scand J Immunol* 30:123-128.
245. Brandtzaeg, P., I. N. Farstad, and L. Helgeland. 1998. Phenotypes of T cells in the gut. *Chem Immunol* 71:1-26.
246. Chen, Y., K. Chou, E. Fuchs, W. L. Havran, and R. Boismenu. 2002. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14338-14343.
247. Cheroutre, H. 2004. Starting at the beginning: new perspectives on the biology of mucosal T cells. *Annu Rev Immunol* 22:217-246.
248. Acheson, D. W., and S. Luccioli. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Mucosal immune responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18:387-404.
249. Moncada, D. M., S. J. Kammanadiminti, and K. Chadee. 2003. Mucin and Toll-like receptors in host defense against intestinal parasites. *Trends Parasitol* 19:305-311.

250. Ouellette, A. J. 2005. Paneth cell alpha-defensins: peptide mediators of innate immunity in the small intestine. *Springer Semin Immunopathol* 27:133-146.
251. Bevins, C. L. 2006. Paneth cell defensins: key effector molecules of innate immunity. *Biochem Soc Trans* 34:263-266.
252. De Smet, K., and R. Contreras. 2005. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* 27:1337-1347.
253. Lehrer, R. I. 2004. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2:727-738.
254. Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3:710-720.
255. Yuan, Q., and W. A. Walker. 2004. Innate immunity of the gut: mucosal defense in health and disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 38:463-473.
256. Harder, J., J. Bartels, E. Christophers, and J. M. Schroder. 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 387:861.
257. Fahlgren, A., S. Hammarstrom, A. Danielsson, and M. L. Hammarstrom. 2004. beta-Defensin-3 and -4 in intestinal epithelial cells display increased mRNA expression in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 137:379-385.
258. Fahlgren, A., S. Hammarstrom, A. Danielsson, and M. L. Hammarstrom. 2003. Increased expression of antimicrobial peptides and lysozyme in colonic epithelial cells of patients with ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol* 131:90-101.
259. Eckmann, L. 2005. Defence molecules in intestinal innate immunity against bacterial infections. *Curr Opin Gastroenterol* 21:147-151.
260. Hase, K., L. Eckmann, J. D. Leopard, N. Varki, and M. F. Kagnoff. 2002. Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infect Immun* 70:953-963.
261. Bals, R. 2000. Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* 1:141-150.
262. Reid, K. B., and R. R. Porter. 1981. The proteolytic activation systems of complement. *Annu Rev Biochem* 50:433-464.
263. Muller-Eberhard, H. J. 1988. Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem* 57:321-347.
264. Roozendaal, R., and M. C. Carroll. 2007. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol Rev* 219:157-166.
265. Nimmerjahn, F., and J. V. Ravetch. 2007. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol* 96:179-204.
266. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-376.
267. Zarembek, K. A., and P. J. Godowski. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168:554-561.
268. Cario, E., and D. K. Podolsky. 2000. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 68:7010-7017.
269. Michelsen, K. S., and M. Arditi. 2007. Toll-like receptors and innate immunity in gut homeostasis and pathology. *Curr Opin Hematol* 14:48-54.

270. Furrie, E., S. Macfarlane, G. Thomson, and G. T. Macfarlane. 2005. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology* 115:565-574.
271. Chamaillard, M., M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M. A. Valvano, S. J. Foster, T. W. Mak, G. Nunez, and N. Inohara. 2003. An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nat Immunol* 4:702-707.
272. Girardin, S. E., I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpott, and P. J. Sansonetti. 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 278:8869-8872.
273. Fritz, J. H., S. E. Girardin, C. Fitting, C. Werts, D. Mengin-Lecreulx, M. Caroff, J. M. Cavaillon, D. J. Philpott, and M. Adib-Conquy. 2005. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol* 35:2459-2470.
274. Stagg, A. J., A. L. Hart, S. C. Knight, and M. A. Kamm. 2003. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* 52:1522-1529.
275. Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2:361-367.
276. Yoshida, M., S. M. Claypool, J. S. Wagner, E. Mizoguchi, A. Mizoguchi, D. C. Roopenian, W. I. Lencer, and R. S. Blumberg. 2004. Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity* 20:769-783.
277. Talal, A. H., S. Monard, M. Vesanen, Z. Zheng, A. Hurley, Y. Cao, F. Fang, L. Smiley, J. Johnson, R. Kost, and M. H. Markowitz. 2001. Virologic and immunologic effect of antiretroviral therapy on HIV-1 in gut-associated lymphoid tissue. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26:1-7.
278. Cazac, B. B., and J. Roes. 2000. TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo. *Immunity* 13:443-451.
279. Crago, S. S., W. H. Kutteh, I. Moro, M. R. Allansmith, J. Radl, J. J. Haaijman, and J. Mestecky. 1984. Distribution of IgA1-, IgA2-, and J chain-containing cells in human tissues. *J Immunol* 132:16-18.
280. Conley, M. E., and D. L. Delacroix. 1987. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? *Ann Intern Med* 106:892-899.
281. Bleackley, R. C. 2005. A molecular view of cytotoxic T lymphocyte induced killing. *Biochem Cell Biol* 83:747-751.
282. Appay, V., D. C. Douek, and D. A. Price. 2008. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med* 14:623-628.
283. Prlic, M., M. A. Williams, and M. J. Bevan. 2007. Requirements for CD8 T-cell priming, memory generation and maintenance. *Curr Opin Immunol* 19:315-319.
284. Mempel, T. R., S. E. Henrickson, and U. H. Von Andrian. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427:154-159.
285. Haring, J. S., V. P. Badovinac, and J. T. Harty. 2006. Inflaming the CD8+ T cell response. *Immunity* 25:19-29.

286. Mescher, M. F., J. M. Curtsinger, P. Agarwal, K. A. Casey, M. Gerner, C. D. Hammerbeck, F. Popescu, and Z. Xiao. 2006. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* 211:81-92.
287. Janssen, E. M., N. M. Droin, E. E. Lemmens, M. J. Pinkoski, S. J. Bensinger, B. D. Ehst, T. S. Griffith, D. R. Green, and S. P. Schoenberger. 2005. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* 434:88-93.
288. Kaech, S. M., E. J. Wherry, and R. Ahmed. 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2:251-262.
289. Badovinac, V. P., and J. T. Harty. 2006. Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory. *Immunol Rev* 211:67-80.
290. Harty, J. T., and V. P. Badovinac. 2008. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol* 8:107-119.
291. Benjamini, E., R. Coici, and G. Sunshine. 2000. *Immunology, a short course*. John Wiley and sons, New York.
292. Sancho, E., E. Batlle, and H. Clevers. 2003. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 15:763-770.
293. Bry, L., P. Falk, K. Huttner, A. Ouellette, T. Midtvedt, and J. I. Gordon. 1994. Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10335-10339.
294. Roth, K. A., J. M. Hertz, and J. I. Gordon. 1990. Mapping enteroendocrine cell populations in transgenic mice reveals an unexpected degree of complexity in cellular differentiation within the gastrointestinal tract. *J Cell Biol* 110:1791-1801.
295. Falk, P., K. A. Roth, and J. I. Gordon. 1994. Lectins are sensitive tools for defining the differentiation programs of mouse gut epithelial cell lineages. *Am J Physiol* 266:G987-1003.
296. Massey-Harroche, D. 2000. Epithelial cell polarity as reflected in enterocytes. *Microsc Res Tech* 49:353-362.
297. Danielsen, E. M., and G. H. Hansen. 2003. Lipid rafts in epithelial brush borders: atypical membrane microdomains with specialized functions. *Biochim Biophys Acta* 1617:1-9.
298. Ishizuya-Oka, A. 2005. Epithelial-connective tissue cross-talk is essential for regeneration of intestinal epithelium. *J Nippon Med Sch* 72:13-18.
299. Neutra, M. R., N. J. Mantis, and J. P. Kraehenbuhl. 2001. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2:1004-1009.
300. Nicoletti, C. 2000. Unsolved mysteries of intestinal M cells. *Gut* 47:735-739.
301. Kraehenbuhl, J. P., and M. R. Neutra. 2000. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:301-332.
302. Jones, B. D., N. Ghori, and S. Falkow. 1994. Salmonella typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* 180:15-23.
303. Sansonetti, P. J., and A. Phalipon. 1999. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin Immunol* 11:193-203.
304. Sansonetti, P. J., J. Arondel, J. R. Cantey, M. C. Prevost, and M. Huerre. 1996. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or

- invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. *Infect Immun* 64:2752-2764.
305. Blanco, L. P., and V. J. Dirita. 2006. Antibodies enhance interaction of *Vibrio cholerae* with intestinal M-like cells. *Infect Immun* 74:6957-6964.
306. Cantey, J. R., and L. R. Inman. 1981. Diarrhea due to *Escherichia coli* strain RDEC-1 in the rabbit: the peyer's patch as the initial site of attachment and colonization. *J Infect Dis* 143:440-446.
307. Corr, S., C. Hill, and C. G. Gahan. 2006. An in vitro cell-culture model demonstrates internalin- and hemolysin-independent translocation of *Listeria monocytogenes* across M cells. *Microb Pathog* 41:241-250.
308. Amerongen, H. M., R. Weltzin, C. M. Farnet, P. Michetti, W. A. Haseltine, and M. R. Neutra. 1991. Transepithelial transport of HIV-1 by intestinal M cells: a mechanism for transmission of AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 4:760-765.
309. Sicinski, P., J. Rowinski, J. B. Warchol, Z. Jarzabek, W. Gut, B. Szczygiel, K. Bielecki, and G. Koch. 1990. Poliovirus type 1 enters the human host through intestinal M cells. *Gastroenterology* 98:56-58.
310. Amerongen, H. M., G. A. Wilson, B. N. Fields, and M. R. Neutra. 1994. Proteolytic processing of reovirus is required for adherence to intestinal M cells. *J Virol* 68:8428-8432.
311. Corr, S. C., C. C. Gahan, and C. Hill. 2008. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52:2-12.
312. Bye, W. A., C. H. Allan, and J. S. Trier. 1984. Structure, distribution, and origin of M cells in Peyer's patches of mouse ileum. *Gastroenterology* 86:789-801.
313. Owen, R. L., R. T. Apple, and D. K. Bhalla. 1986. Morphometric and cytochemical analysis of lysosomes in rat Peyer's patch follicle epithelium: their reduction in volume fraction and acid phosphatase content in M cells compared to adjacent enterocytes. *Anat Rec* 216:521-527.
314. Fujimura, Y. 1986. Functional morphology of microfold cells (M cells) in Peyer's patches--phagocytosis and transport of BCG by M cells into rabbit Peyer's patches. *Gastroenterol Jpn* 21:325-335.
315. Neutra, M. R., T. L. Phillips, E. L. Mayer, and D. J. Fishkind. 1987. Transport of membrane-bound macromolecules by M cells in follicle-associated epithelium of rabbit Peyer's patch. *Cell Tissue Res* 247:537-546.
316. Dickinson, B. L., K. Badizadegan, Z. Wu, J. C. Ahouse, X. Zhu, N. E. Simister, R. S. Blumberg, and W. I. Lencer. 1999. Bidirectional FcRn-dependent IgG transport in a polarized human intestinal epithelial cell line. *J Clin Invest* 104:903-911.
317. Kaiserlian, D., A. Lachaux, I. Grosjean, P. Graber, and J. Y. Bonnefoy. 1993. Intestinal epithelial cells express the CD23/Fc epsilon RII molecule: enhanced expression in enteropathies. *Immunology* 80:90-95.
318. Giffroy, D., A. Langendries, M. Maurice, F. Daniel, B. Lardeux, P. J. Courtoy, and J. P. Vaerman. 1998. In vivo stimulation of polymeric Ig receptor transcytosis by circulating polymeric IgA in rat liver. *Int Immunol* 10:347-354.
319. Jung, H. C., L. Eckmann, S. K. Yang, A. Panja, J. Fierer, E. Morzycka-Wroblewska, and M. F. Kagnoff. 1995. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 95:55-65.

320. Shibahara, T., J. N. Wilcox, T. Couse, and J. L. Madara. 2001. Characterization of epithelial chemoattractants for human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 120:60-70.
321. Shao, L., D. Serrano, and L. Mayer. 2001. The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. *Semin Immunol* 13:163-176.
322. Hershberg, R. M., D. H. Cho, A. Youakim, M. B. Bradley, J. S. Lee, P. E. Framson, and G. T. Nepom. 1998. Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 102:792-803.
323. Nakazawa, A., I. Dotan, J. Brimnes, M. Allez, L. Shao, F. Tsushima, M. Azuma, and L. Mayer. 2004. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 126:1347-1357.
324. Yio, X. Y., and L. Mayer. 1997. Characterization of a 180-kDa intestinal epithelial cell membrane glycoprotein, gp180. A candidate molecule mediating t cell-epithelial cell interactions. *J Biol Chem* 272:12786-12792.
325. Panja, A., R. S. Blumberg, S. P. Balk, and L. Mayer. 1993. CD1d is involved in T cell-intestinal epithelial cell interactions. *J Exp Med* 178:1115-1119.
326. Colgan, S. P., R. M. Hershberg, G. T. Furuta, and R. S. Blumberg. 1999. Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13938-13943.
327. Falk, P. G., L. V. Hooper, T. Midtvedt, and J. I. Gordon. 1998. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1157-1170.
328. Cario, E., G. Gerken, and D. K. Podolsky. 2004. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology* 127:224-238.
329. Vora, P., A. Youdim, L. S. Thomas, M. Fukata, S. Y. Tesfay, K. Lukasek, K. S. Michelsen, A. Wada, T. Hirayama, M. Arditi, and M. T. Abreu. 2004. Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol* 173:5398-5405.
330. Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg, and R. Medzhitov. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118:229-241.
331. Mahida, Y. R. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18:241-253.
332. Hooper, L. V., and J. I. Gordon. 2001. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292:1115-1118.
333. Xu, J., and J. I. Gordon. 2003. Inaugural Article: Honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10452-10459.
334. van der Waaij, D. 1989. The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*. *Annu Rev Microbiol* 43:69-87.
335. Levine, M. M. 2006. Enteric infections and the vaccines to counter them: future directions. *Vaccine* 24:3865-3873.
336. Casburn-Jones, A. C., and M. J. Farthing. 2004. Management of infectious diarrhoea. *Gut* 53:296-305.
337. Schafer, T. W., and A. Skopic. 2006. Parasites of the small intestine. *Curr Gastroenterol Rep* 8:312-320.

338. Savioli, L., H. Smith, and A. Thompson. 2006. Giardia and Cryptosporidium join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol* 22:203-208.
339. Caccio, S. M., R. C. Thompson, J. McLauchlin, and H. V. Smith. 2005. Unravelling Cryptosporidium and Giardia epidemiology. *Trends Parasitol* 21:430-437.
340. Lane, S., and D. Lloyd. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite Giardia. *Crit Rev Microbiol* 28:123-147.
341. Eckmann, L. 2003. Mucosal defences against Giardia. *Parasite Immunol* 25:259-270.
342. Chai, J. Y., S. M. Guk, H. K. Han, and C. K. Yun. 1999. Role of intraepithelial lymphocytes in mucosal immune responses of mice experimentally infected with Cryptosporidium parvum. *J Parasitol* 85:234-239.
343. Scott, K. G., M. R. Logan, G. M. Klammer, D. A. Teoh, and A. G. Buret. 2000. Jejunal brush border microvillous alterations in Giardia muris-infected mice: role of T lymphocytes and interleukin-6. *Infect Immun* 68:3412-3418.
344. Scott, K. G., L. C. Yu, and A. G. Buret. 2004. Role of CD8+ and CD4+ T lymphocytes in jejunal mucosal injury during murine giardiasis. *Infect Immun* 72:3536-3542.
345. Guk, S. M., T. S. Yong, and J. Y. Chai. 2003. Role of murine intestinal intraepithelial lymphocytes and lamina propria lymphocytes against primary and challenge infections with Cryptosporidium parvum. *J Parasitol* 89:270-275.
346. Chin, A. C., D. A. Teoh, K. G. Scott, J. B. Meddings, W. K. Macnaughton, and A. G. Buret. 2002. Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by Giardia lamblia disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect Immun* 70:3673-3680.
347. McCole, D. F., L. Eckmann, F. Laurent, and M. F. Kagnoff. 2000. Intestinal epithelial cell apoptosis following Cryptosporidium parvum infection. *Infect Immun* 68:1710-1713.
348. Baxt, L. A., and U. Singh. 2008. New insights into Entamoeba histolytica pathogenesis. *Curr Opin Infect Dis* 21:489-494.
349. de Silva, N. R., S. Brooker, P. J. Hotez, A. Montresor, D. Engels, and L. Savioli. 2003. Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends Parasitol* 19:547-551.
350. Diemert, D. J., J. M. Bethony, and P. J. Hotez. 2008. Hookworm vaccines. *Clin Infect Dis* 46:282-288.
351. Colbere-Garapin, F., S. Martin-Latil, B. Blondel, L. Mousson, I. Pelletier, A. Autret, A. Francois, V. Niborski, G. Grompone, G. Catonnet, and A. van de Moer. 2007. Prevention and treatment of enteric viral infections: possible benefits of probiotic bacteria. *Microbes Infect* 9:1623-1631.
352. Parashar, U. D., E. G. Hummelman, J. S. Bresee, M. A. Miller, and R. I. Glass. 2003. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis* 9:565-572.
353. Mounts, A. W., R. C. Holman, M. J. Clarke, J. S. Bresee, and R. I. Glass. 1999. Trends in hospitalizations associated with gastroenteritis among adults in the United States, 1979-1995. *Epidemiol Infect* 123:1-8.
354. Fankhauser, R. L., J. S. Noel, S. S. Monroe, T. Ando, and R. I. Glass. 1998. Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 178:1571-1578.

355. Girard, M. P., D. Steele, C. L. Chaignat, and M. P. Kieny. 2006. A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine* 24:2732-2750.
356. Wassenaar, T. M. 1997. Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol Rev* 10:466-476.
357. Young, K. T., L. M. Davis, and V. J. Dirita. 2007. *Campylobacter jejuni*: molecular biology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 5:665-679.
358. Niyogi, S. K. 2005. Shigellosis. *J Microbiol* 43:133-143.
359. Vanden Broeck, D., C. Horvath, and M. J. De Wolf. 2007. *Vibrio cholerae*: cholera toxin. *Int J Biochem Cell Biol* 39:1771-1775.
360. Clarke, S. C. 2001. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*--an emerging problem? *Diagn Microbiol Infect Dis* 41:93-98.
361. Sandvig, K. 2001. Shiga toxins. *Toxicon* 39:1629-1635.
362. Abu-Elyazeed, R., T. F. Wierzba, A. S. Mourad, L. F. Peruski, B. A. Kay, M. Rao, A. M. Churilla, A. L. Bourgeois, A. K. Mortagy, S. M. Kamal, S. J. Savarino, J. R. Campbell, J. R. Murphy, A. Naficy, and J. D. Clemens. 1999. Epidemiology of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in a pediatric cohort in a periurban area of lower Egypt. *J Infect Dis* 179:382-389.
363. Rao, M. C. 1985. Toxins which activate guanylate cyclase: heat-stable enterotoxins. *Ciba Found Symp* 112:74-93.
364. Chinnapen, D. J., H. Chinnapen, D. Saslowsky, and W. I. Lencer. 2007. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol Lett* 266:129-137.
365. Hansen, G. H., S. M. Dalskov, C. R. Rasmussen, L. Immerdal, L. L. Niels-Christiansen, and E. M. Danielsen. 2005. Cholera toxin entry into pig enterocytes occurs via a lipid raft- and clathrin-dependent mechanism. *Biochemistry* 44:873-882.
366. Sanchez, J., and J. Holmgren. 2008. Cholera toxin structure, gene regulation and pathophysiological and immunological aspects. *Cell Mol Life Sci* 65:1347-1360.
367. Serezani, C. H., M. N. Ballinger, D. M. Aronoff, and M. Peters-Golden. 2008. Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. *Am J Respir Cell Mol Biol* 39:127-132.
368. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
369. van Niel, G., G. Raposo, C. Candalh, M. Boussac, R. Hershberg, N. Cerf-Bensussan, and M. Heyman. 2001. Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 121:337-349.
370. Karlsson, M., S. Lundin, U. Dahlgren, H. Kahu, I. Pettersson, and E. Telemo. 2001. "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol* 31:2892-2900.
371. Rimoldi, M., M. Chieppa, V. Salucci, F. Avogadri, A. Sonzogni, G. M. Sampietro, A. Nespoli, G. Viale, P. Allavena, and M. Rescigno. 2005. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 6:507-514.
372. Honda, K., S. Sakaguchi, C. Nakajima, A. Watanabe, H. Yanai, M. Matsumoto, T. Ohteki, T. Kaisho, A. Takaoka, S. Akira, T. Seya, and T. Taniguchi. 2003. Selective contribution of IFN-alpha/beta signaling to the maturation of dendritic cells induced

- by double-stranded RNA or viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10872-10877.
373. Shi, Y., J. E. Evans, and K. L. Rock. 2003. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425:516-521.
 374. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767-811.
 375. Kapsenberg, M. L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* 3:984-993.
 376. Reis e Sousa, C., S. D. Diebold, A. D. Edwards, N. Rogers, O. Schulz, and R. Sporri. 2003. Regulation of dendritic cell function by microbial stimuli. *Pathol Biol (Paris)* 51:67-68.
 377. Rescigno, M. 2002. Dendritic cells and the complexity of microbial infection. *Trends Microbiol* 10:425-461.
 378. Kaisho, T., and S. Akira. 2003. Regulation of dendritic cell function through toll-like receptors. *Curr Mol Med* 3:759-771.
 379. Kelsall, B. L., and F. Leon. 2005. Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 206:132-148.
 380. Johansson, C., and B. L. Kelsall. 2005. Phenotype and function of intestinal dendritic cells. *Semin Immunol* 17:284-294.
 381. Rissoan, M. C., V. Soumelis, N. Kadowaki, G. Grouard, F. Briere, R. de Waal Malefyt, and Y. J. Liu. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283:1183-1186.
 382. Pulendran, B., J. L. Smith, G. Caspary, K. Brasel, D. Pettit, E. Maraskovsky, and C. R. Maliszewski. 1999. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1036-1041.
 383. Kadowaki, N., S. Ho, S. Antonenko, R. W. Malefyt, R. A. Kastelein, F. Bazan, and Y. J. Liu. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194:863-869.
 384. Coombes, J. L., and F. Powrie. 2008. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 8:435-446.
 385. Artis, D. 2008. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 8:411-420.
 386. Smith, D. W., and C. Nagler-Anderson. 2005. Preventing intolerance: the induction of nonresponsiveness to dietary and microbial antigens in the intestinal mucosa. *J Immunol* 174:3851-3857.
 387. Xavier, R. J., and D. K. Podolsky. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 448:427-434.
 388. Macpherson, A. J., and T. Uhr. 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303:1662-1665.
 389. Macpherson, A. J., and K. Smith. 2006. Mesenteric lymph nodes at the center of immune anatomy. *J Exp Med* 203:497-500.
 390. Sato, A., M. Hashiguchi, E. Toda, A. Iwasaki, S. Hachimura, and S. Kaminogawa. 2003. CD11b⁺ Peyer's patch dendritic cells secrete IL-6 and induce IgA secretion from naive B cells. *J Immunol* 171:3684-3690.

391. Qi, H., J. G. Egen, A. Y. Huang, and R. N. Germain. 2006. Extrafollicular activation of lymph node B cells by antigen-bearing dendritic cells. *Science* 312:1672-1676.
392. Brandtzaeg, P., and F. E. Johansen. 2005. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* 206:32-63.
393. Muraguchi, A., T. Hirano, B. Tang, T. Matsuda, Y. Horii, K. Nakajima, and T. Kishimoto. 1988. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* 167:332-344.
394. Goldstein, H., D. Koerholz, L. Chesky, X. D. Fan, and J. L. Ambrus, Jr. 1990. Divergent activities of protein kinases in IL-6-induced differentiation of a human B cell line. *J Immunol* 145:952-961.
395. Murray, P. D., D. T. McKenzie, S. L. Swain, and M. F. Kagnoff. 1987. Interleukin 5 and interleukin 4 produced by Peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J Immunol* 139:2669-2674.
396. Beagley, K. W., J. H. Eldridge, F. Lee, H. Kiyono, M. P. Everson, W. J. Koopman, T. Hirano, T. Kishimoto, and J. R. McGhee. 1989. Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *J Exp Med* 169:2133-2148.
397. Islam, K. B., L. Nilsson, P. Sideras, L. Hammarstrom, and C. I. Smith. 1991. TGF-beta 1 induces germ-line transcripts of both IgA subclasses in human B lymphocytes. *Int Immunol* 3:1099-1106.
398. Nilsson, L., K. B. Islam, O. Olafsson, I. Zalcberg, C. Samakovlis, L. Hammarstrom, C. I. Smith, and P. Sideras. 1991. Structure of TGF-beta 1-induced human immunoglobulin C alpha 1 and C alpha 2 germ-line transcripts. *Int Immunol* 3:1107-1115.
399. Fujihashi, K., J. R. McGhee, C. Lue, K. W. Beagley, T. Taga, T. Hirano, T. Kishimoto, J. Mestecky, and H. Kiyono. 1991. Human appendix B cells naturally express receptors for and respond to interleukin 6 with selective IgA1 and IgA2 synthesis. *J Clin Invest* 88:248-252.
400. Mestecky, J., M. W. Russell, and C. O. Elson. 1999. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut* 44:2-5.
401. Fagarasan, S., and T. Honjo. 2004. Regulation of IgA synthesis at mucosal surfaces. *Curr Opin Immunol* 16:277-283.
402. Tsuji, N. M. 2006. Antigen-specific CD4(+) regulatory T cells in the intestine. *Inflamm Allergy Drug Targets* 5:191-201.
403. Iwasaki, A., and B. L. Kelsall. 1999. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med* 190:229-239.
404. Battaglia, M., S. Gregori, R. Bacchetta, and M. G. Roncarolo. 2006. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin Immunol* 18:120-127.
405. Weiner, H. L. 2001. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect* 3:947-954.
406. Weiner, H. L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182:207-214.

407. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 194:629-644.
408. Oida, T., X. Zhang, M. Goto, S. Hachimura, M. Totsuka, S. Kaminogawa, and H. L. Weiner. 2003. CD4+CD25- T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4+CD45RBhigh-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. *J Immunol* 170:2516-2522.
409. Del Prete, G., M. De Carli, F. Almerigogna, M. G. Giudizi, R. Biagiotti, and S. Romagnani. 1993. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 150:353-360.
410. Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, P. Vieira, T. R. Mosmann, M. Howard, K. W. Moore, and A. O'Garra. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146:3444-3451.
411. Huang, S. S., and J. S. Huang. 2005. TGF-beta control of cell proliferation. *J Cell Biochem* 96:447-462.
412. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
413. Tsuji, N. M., K. Mizumachi, and J. Kurisaki. 2001. Interleukin-10-secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. *Immunology* 103:458-464.
414. Tsuji, N. M., K. Mizumachi, and J. Kurisaki. 2003. Antigen-specific, CD4+CD25+ regulatory T cell clones induced in Peyer's patches. *Int Immunol* 15:525-534.
415. Kagnoff, M. F., and L. Eckmann. 1997. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* 100:6-10.
416. Coombes, J. L., K. R. Siddiqui, C. V. Arancibia-Carcamo, J. Hall, C. M. Sun, Y. Belkaid, and F. Powrie. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 204:1757-1764.
417. Annacker, O., J. L. Coombes, V. Malmstrom, H. H. Uhlig, T. Bourne, B. Johansson-Lindbom, W. W. Agace, C. M. Parker, and F. Powrie. 2005. Essential role for CD103 in the T cell-mediated regulation of experimental colitis. *J Exp Med* 202:1051-1061.
418. Moser, M., and K. M. Murphy. 2000. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* 1:199-205.
419. Macatonia, S. E., N. A. Hosken, M. Litton, P. Vieira, C. S. Hsieh, J. A. Culpepper, M. Wysocka, G. Trinchieri, K. M. Murphy, and A. O'Garra. 1995. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154:5071-5079.
420. Manetti, R., F. Gerosa, M. G. Giudizi, R. Biagiotti, P. Parronchi, M. P. Piccinni, S. Sampognaro, E. Maggi, S. Romagnani, G. Trinchieri, and et al. 1994. Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones. *J Exp Med* 179:1273-1283.
421. Manetti, R., P. Parronchi, M. G. Giudizi, M. P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri, and S. Romagnani. 1993. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-

- 12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 177:1199-1204.
422. Seder, R. A., R. Gazzinelli, A. Sher, and W. E. Paul. 1993. Interleukin 12 acts directly on CD4⁺ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:10188-10192.
423. Gajewski, T. F., and F. W. Fitch. 1988. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 140:4245-4252.
424. Le Gros, G., S. Z. Ben-Sasson, R. Seder, F. D. Finkelman, and W. E. Paul. 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 172:921-929.
425. Skapenko, A., G. U. Niedobitek, J. R. Kalden, P. E. Lipsky, and H. Schulze-Koops. 2004. Generation and regulation of human Th1-biased immune responses in vivo: a critical role for IL-4 and IL-10. *J Immunol* 172:6427-6434.
426. Ghoreschi, K., P. Thomas, S. Breit, M. Dugas, R. Mailhammer, W. van Eden, R. van der Zee, T. Biedermann, J. Prinz, M. Mack, U. Mrowietz, E. Christophers, D. Schlondorff, G. Plewig, C. A. Sander, and M. Rocken. 2003. Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat Med* 9:40-46.
427. Swain, S. L., A. D. Weinberg, M. English, and G. Huston. 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 145:3796-3806.
428. Lundgren, M., U. Persson, P. Larsson, C. Magnusson, C. I. Smith, L. Hammarstrom, and E. Severinson. 1989. Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *Eur J Immunol* 19:1311-1315.
429. Punnonen, J., G. Aversa, B. G. Cocks, A. N. McKenzie, S. Menon, G. Zurawski, R. de Waal Malefyt, and J. E. de Vries. 1993. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3730-3734.
430. de Vries, J. E., and G. Zurawski. 1995. Immunoregulatory properties of IL-13: its potential role in atopic disease. *Int Arch Allergy Immunol* 106:175-179.
431. Levings, M. K., and J. W. Schrader. 1999. IL-4 inhibits the production of TNF-alpha and IL-12 by STAT6-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol* 162:5224-5229.
432. Baumgart, D. C., and A. U. Dignass. 2002. Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5:685-694.
433. Kagnoff, M. F. 2006. Microbial-epithelial cell crosstalk during inflammation: the host response. *Ann N Y Acad Sci* 1072:313-320.
434. Maaser, C., and M. F. Kagnoff. 2002. Role of the intestinal epithelium in orchestrating innate and adaptive mucosal immunity. *Z Gastroenterol* 40:525-529.
435. Izadpanah, A., M. B. Dwinell, L. Eckmann, N. M. Varki, and M. F. Kagnoff. 2001. Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280:G710-719.
436. Eckmann, L., M. F. Kagnoff, and J. Fierer. 1993. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 61:4569-4574.

437. Yang, S. K., L. Eckmann, A. Panja, and M. F. Kagnoff. 1997. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C, and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology* 113:1214-1223.
438. Reinecker, H. C., E. Y. Loh, D. J. Ringler, A. Mehta, J. L. Rombeau, and R. P. MacDermott. 1995. Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. *Gastroenterology* 108:40-50.
439. Maaser, C., S. Schoeppner, T. Kucharzik, M. Kraft, E. Schoenherr, W. Domschke, and N. Luegering. 2001. Colonic epithelial cells induce endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 by a NF-kappaB-dependent mechanism. *Clin Exp Immunol* 124:208-213.
440. Kotler, D. P., S. Reka, A. Borcich, and W. J. Cronin. 1991. Detection, localization, and quantitation of HIV-associated antigens in intestinal biopsies from patients with HIV. *Am J Pathol* 139:823-830.
441. Meng, G., M. T. Sellers, M. Mosteller-Barnum, T. S. Rogers, G. M. Shaw, and P. D. Smith. 2000. Lamina propria lymphocytes, not macrophages, express CCR5 and CXCR4 and are the likely target cell for human immunodeficiency virus type 1 in the intestinal mucosa. *J Infect Dis* 182:785-791.
442. Veazey, R. S., K. G. Mansfield, I. C. Tham, A. C. Carville, D. E. Shvetz, A. E. Forand, and A. A. Lackner. 2000. Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 74:11001-11007.
443. Lapenta, C., M. Boirivant, M. Marini, S. M. Santini, M. Logozzi, M. Viora, F. Belardelli, and S. Fais. 1999. Human intestinal lamina propria lymphocytes are naturally permissive to HIV-1 infection. *Eur J Immunol* 29:1202-1208.
444. Poles, M. A., J. Elliott, P. Taing, P. A. Anton, and I. S. Chen. 2001. A preponderance of CCR5(+) CXCR4(+) mononuclear cells enhances gastrointestinal mucosal susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 75:8390-8399.
445. Mehandru, S., M. A. Poles, K. Tenner-Racz, V. Manuelli, P. Jean-Pierre, P. Lopez, A. Shet, A. Low, H. Mohri, D. Boden, P. Racz, and M. Markowitz. 2007. Mechanisms of gastrointestinal CD4+ T-cell depletion during acute and early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 81:599-612.
446. Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B. R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J. N. Martin, F. M. Hecht, L. J. Picker, M. M. Lederman, S. G. Deeks, and D. C. Douek. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12:1365-1371.
447. Wallace, M. R., and O. S. Brann. 2000. Gastrointestinal manifestations of HIV infection. *Curr Gastroenterol Rep* 2:283-293.
448. Kapembwa, M. S., S. C. Fleming, N. Sewankambo, D. Serwadda, S. Lucas, A. Moody, and G. E. Griffin. 1991. Altered small-intestinal permeability associated with diarrhoea in human-immunodeficiency-virus-infected Caucasian and African subjects. *Clin Sci (Lond)* 81:327-334.
449. Bjarnason, I., D. R. Sharpstone, N. Francis, A. Marker, C. Taylor, M. Barrett, A. Macpherson, C. Baldwin, I. S. Menzies, R. C. Crane, T. Smith, A. Pozniak, and B.

- G. Gazzard. 1996. Intestinal inflammation, ileal structure and function in HIV. *Aids* 10:1385-1391.
450. Sharpstone, D., P. Neild, R. Crane, C. Taylor, C. Hodgson, R. Sherwood, B. Gazzard, and I. Bjarnason. 1999. Small intestinal transit, absorption, and permeability in patients with AIDS with and without diarrhoea. *Gut* 45:70-76.
451. Thom, K., and G. Forrest. 2006. Gastrointestinal infections in immunocompromised hosts. *Curr Opin Gastroenterol* 22:18-23.
452. Kaslow, R. A., J. P. Phair, H. B. Friedman, D. Lyter, R. E. Solomon, J. Dudley, B. F. Polk, and W. Blackwelder. 1987. Infection with the human immunodeficiency virus: clinical manifestations and their relationship to immune deficiency. A report from the Multicenter AIDS Cohort Study. *Ann Intern Med* 107:474-480.
453. Ho-Yen, C., F. Chang, J. van der Walt, and S. Lucas. 2007. Gastrointestinal malignancies in HIV-infected or immunosuppressed patients: pathologic features and review of the literature. *Adv Anat Pathol* 14:431-443.
454. Monkemuller, K. E., S. A. Call, A. J. Lazenby, and C. M. Wilcox. 2000. Declining prevalence of opportunistic gastrointestinal disease in the era of combination antiretroviral therapy. *Am J Gastroenterol* 95:457-462.
455. Di Stefano, M., A. Favia, L. Monno, P. Lopalco, O. Caputi, A. C. Scardigno, G. Pastore, J. R. Fiore, and G. Angarano. 2001. Intracellular and cell-free (infectious) HIV-1 in rectal mucosa. *J Med Virol* 65:637-643.
456. Clayton, F., D. P. Kotler, S. K. Kuwada, T. Morgan, C. Stepan, J. Kuang, J. Le, and J. Fantini. 2001. Gp120-induced Bob/GPR15 activation: a possible cause of human immunodeficiency virus enteropathy. *Am J Pathol* 159:1933-1939.
457. Canani, R. B., G. De Marco, A. Passariello, V. Buccigrossi, S. Ruotolo, I. Bracale, F. Porcaro, G. Bifulco, and A. Guarino. 2006. Inhibitory effect of HIV-1 Tat protein on the sodium-D-glucose symporter of human intestinal epithelial cells. *Aids* 20:5-10.
458. Ostrowski, M. A., S. J. Justement, L. Ehler, S. B. Mizell, S. Lui, J. Mican, B. D. Walker, E. K. Thomas, R. Seder, and A. S. Fauci. 2000. The role of CD4+ T cell help and CD40 ligand in the in vitro expansion of HIV-1-specific memory cytotoxic CD8+ T cell responses. *J Immunol* 165:6133-6141.
459. Kalams, S. A., and B. D. Walker. 1998. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 188:2199-2204.
460. Veazey, R., and A. Lackner. 2003. The mucosal immune system and HIV-1 infection. *AIDS Rev* 5:245-252.
461. Veazey, R. S., J. D. Lifson, I. Pandrea, J. Purcell, M. Piatak, Jr., and A. A. Lackner. 2003. Simian immunodeficiency virus infection in neonatal macaques. *J Virol* 77:8783-8792.
462. Clayton, F., G. Snow, S. Reka, and D. P. Kotler. 1997. Selective depletion of rectal lamina propria rather than lymphoid aggregate CD4 lymphocytes in HIV infection. *Clin Exp Immunol* 107:288-292.
463. Ameisen, J. C., and A. Capron. 1991. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol Today* 12:102-105.
464. Gougeon, M. L., E. Ledru, H. Lecoeur, and S. Garcia. 1998. T cell apoptosis in HIV infection: mechanisms and relevance for AIDS pathogenesis. *Results Probl Cell Differ* 24:233-248.

465. Greenberg, M. E., S. Bronson, M. Lock, M. Neumann, G. N. Pavlakis, and J. Skowronski. 1997. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *Embo J* 16:6964-6976.
466. Harouse, J. M., A. Gettie, R. C. Tan, J. Blanchard, and C. Cheng-Mayer. 1999. Distinct pathogenic sequela in rhesus macaques infected with CCR5 or CXCR4 utilizing SHIVs. *Science* 284:816-819.
467. Veazey, R. S., P. A. Marx, and A. A. Lackner. 2001. The mucosal immune system: primary target for HIV infection and AIDS. *Trends Immunol* 22:626-633.
468. Kotler, D. P., T. Shimada, G. Snow, G. Winson, W. Chen, M. Zhao, Y. Inada, and F. Clayton. 1998. Effect of combination antiretroviral therapy upon rectal mucosal HIV RNA burden and mononuclear cell apoptosis. *Aids* 12:597-604.
469. Guadalupe, M., S. Sankaran, M. D. George, E. Reay, D. Verhoeven, B. L. Shacklett, J. Flamm, J. Wegelin, T. Prindiville, and S. Dandekar. 2006. Viral suppression and immune restoration in the gastrointestinal mucosa of human immunodeficiency virus type 1-infected patients initiating therapy during primary or chronic infection. *J Virol* 80:8236-8247.
470. Lane, P., M. Y. Kim, D. Withers, F. Gaspal, V. Bekiaris, G. Desanti, M. Khan, F. McConnell, and G. Anderson. 2008. Lymphoid tissue inducer cells in adaptive CD4 T cell dependent responses. *Semin Immunol* 20:159-163.
471. Ivanov, II, G. E. Diehl, and D. R. Littman. 2006. Lymphoid tissue inducer cells in intestinal immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 308:59-82.
472. Thiebaut, F., T. Tsuruo, H. Hamada, M. M. Gottesman, I. Pastan, and M. C. Willingham. 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:7735-7738.
473. Rollins, N. C., S. M. Filteau, A. Coutoudis, and A. M. Tomkins. 2001. Feeding mode, intestinal permeability, and neopterin excretion: a longitudinal study in infants of HIV-infected South African women. *J Acquir Immune Defic Syndr* 28:132-139.
474. Shattock, R. J., and J. P. Moore. 2003. Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection. *Nat Rev Microbiol* 1:25-34.
475. Chenine, A. L., E. Matouskova, G. Sanchez, J. Reischig, L. Pavlikova, C. LeContel, J. C. Chermann, and I. Hirsch. 1998. Primary intestinal epithelial cells can be infected with laboratory-adapted strain HIV type 1 NDK but not with clinical primary isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 14:1235-1238.
476. Delezay, O., N. Koch, N. Yahi, D. Hammache, C. Tourres, C. Tamalet, and J. Fantini. 1997. Co-expression of CXCR4/fusin and galactosylceramide in the human intestinal epithelial cell line HT-29. *Aids* 11:1311-1318.
477. Furuta, Y., K. Eriksson, B. Svennerholm, P. Fredman, P. Horal, S. Jeansson, A. Vahlne, J. Holmgren, and C. Czerkinsky. 1994. Infection of vaginal and colonic epithelial cells by the human immunodeficiency virus type 1 is neutralized by antibodies raised against conserved epitopes in the envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:12559-12563.
478. Vidricaire, G., M. R. Tardif, and M. J. Tremblay. 2003. The low viral production in trophoblastic cells is due to a high endocytic internalization of the human immunodeficiency virus type 1 and can be overcome by the pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J Biol Chem* 278:15832-15841.

479. Coutoudis, A. 2005. Breastfeeding and the HIV positive mother: the debate continues. *Early Hum Dev* 81:87-93.
480. Catassi, C., A. Bonucci, G. V. Coppa, A. Carlucci, and P. L. Giorgi. 1995. Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 21:383-386.
481. Bomsel, M. 1997. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* 3:42-47.
482. Jepson, M. A., and M. A. Clark. 1998. Studying M cells and their role in infection. *Trends Microbiol* 6:359-365.
483. Stappenbeck, T. S., M. H. Wong, J. R. Saam, I. U. Mysorekar, and J. I. Gordon. 1998. Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* 10:702-709.
484. Fantini, J., S. Baghdiguian, N. Yahi, and J. C. Chermann. 1991. Selected human immunodeficiency virus replicates preferentially through the basolateral surface of differentiated human colon epithelial cells. *Virology* 185:904-907.
485. Adachi, A., S. Koenig, H. E. Gendelman, D. Daugherty, S. Gattoni-Celli, A. S. Fauci, and M. A. Martin. 1987. Productive, persistent infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. *J Virol* 61:209-213.
486. Maresca, M., R. Mahfoud, N. Garmy, D. P. Kotler, J. Fantini, and F. Clayton. 2003. The virotoxin model of HIV-1 enteropathy: involvement of GPR15/Bob and galactosylceramide in the cytopathic effects induced by HIV-1 gp120 in the HT-29-D4 intestinal cell line. *J Biomed Sci* 10:156-166.
487. Nelms, K., A. D. Keegan, J. Zamorano, J. J. Ryan, and W. E. Paul. 1999. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17:701-738.
488. Hebenstreit, D., G. Wirnsberger, J. Horejs-Hoeck, and A. Duschl. 2006. Signaling mechanisms, interaction partners, and target genes of STAT6. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:173-188.
489. Ohmori, Y., and T. A. Hamilton. 2000. Interleukin-4/STAT6 represses STAT1 and NF-kappa B-dependent transcription through distinct mechanisms. *J Biol Chem* 275:38095-38103.
490. Schroder, A. J., P. Pavlidis, A. Arimura, D. Capece, and P. B. Rothman. 2002. Cutting edge: STAT6 serves as a positive and negative regulator of gene expression in IL-4-stimulated B lymphocytes. *J Immunol* 168:996-1000.
491. Keegan, A. D., K. Nelms, M. White, L. M. Wang, J. H. Pierce, and W. E. Paul. 1994. An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4-mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth. *Cell* 76:811-820.
492. Ryan, J. J., L. J. McReynolds, A. Keegan, L. H. Wang, E. Garfein, P. Rothman, K. Nelms, and W. E. Paul. 1996. Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor. *Immunity* 4:123-132.
493. Sun, X. J., L. M. Wang, Y. Zhang, L. Yenush, M. G. Myers, Jr., E. Glasheen, W. S. Lane, J. H. Pierce, and M. F. White. 1995. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 377:173-177.
494. McDonald, D., M. A. Vodicka, G. Lucero, T. M. Svitkina, G. G. Borisy, M. Emerman, and T. J. Hope. 2002. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* 159:441-452.

495. Kamata, M., Y. Nagaoka, and I. S. Chen. 2009. Reassessing the role of APOBEC3G in human immunodeficiency virus type 1 infection of quiescent CD4⁺ T-cells. *PLoS Pathog* 5:e1000342.
496. Chiu, Y. L., V. B. Soros, J. F. Kreisberg, K. Stopak, W. Yonemoto, and W. C. Greene. 2005. Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4⁺ T cells. *Nature* 435:108-114.
497. Wang, Y. J., X. Wang, H. Zhang, L. Zhou, S. Liu, D. L. Kolson, L. Song, L. Ye, and W. Z. Ho. 2008. Expression and regulation of antiviral protein APOBEC3G in human neuronal cells. *J Neuroimmunol*.
498. Sakuma, R., A. A. Mael, and Y. Ikeda. 2007. Alpha interferon enhances TRIM5alpha-mediated antiviral activities in human and rhesus monkey cells. *J Virol* 81:10201-10206.
499. Guo, X., D. S. Waddell, W. Wang, Z. Wang, N. T. Liberati, S. Yong, X. Liu, and X. F. Wang. 2008. Ligand-dependent ubiquitination of Smad3 is regulated by casein kinase 1 gamma 2, an inhibitor of TGF-beta signaling. *Oncogene*.
500. Swaminathan, G., B. Varghese, C. Thangavel, C. J. Carbone, A. Plotnikov, K. G. Kumar, E. M. Jablonski, C. V. Clevenger, V. Goffin, L. Deng, S. J. Frank, and S. Y. Fuchs. 2008. Prolactin stimulates ubiquitination, initial internalization, and degradation of its receptor via catalytic activation of Janus kinase 2. *J Endocrinol* 196:R1-7.
501. Zhong, L., W. Zhao, J. Wu, B. Li, S. Zolotukhin, L. Govindasamy, M. Agbandje-McKenna, and A. Srivastava. 2007. A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling in ubiquitination of AAV2 capsids and viral second-strand DNA synthesis. *Mol Ther* 15:1323-1330.
502. Cole, S. W., B. D. Jamieson, and J. A. Zack. 1999. cAMP up-regulates cell surface expression of lymphocyte CXCR4: implications for chemotaxis and HIV-1 infection. *J Immunol* 162:1392-1400.
503. Cristillo, A. D., X. Xiao, R. Campbell-Malone, D. S. Dimitrov, and B. E. Bierer. 2002. Differences between CEM and human peripheral blood T lymphocytes in cAMP-dependent HIV viral fusion and CXCR4 expression. *Exp Mol Pathol* 73:9-18.
504. Cristillo, A. D., H. C. Highbarger, R. L. Dewar, D. S. Dimitrov, H. Golding, and B. E. Bierer. 2002. Up-regulation of HIV coreceptor CXCR4 expression in human T lymphocytes is mediated in part by a cAMP-responsive element. *Faseb J* 16:354-364.
505. Odemis, V., B. Moepps, P. Gierschik, and J. Engele. 2002. Interleukin-6 and cAMP induce stromal cell-derived factor-1 chemotaxis in astroglia by up-regulating CXCR4 cell surface expression. Implications for brain inflammation. *J Biol Chem* 277:39801-39808.
506. Mary, D., C. Aussel, B. Ferrua, and M. Fehlmann. 1987. Regulation of interleukin 2 synthesis by cAMP in human T cells. *J Immunol* 139:1179-1184.
507. De Haan, L., and T. R. Hirst. 2004. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). *Mol Membr Biol* 21:77-92.
508. Cheng, X., Z. Ji, T. Tsalkova, and F. Mei. 2008. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 40:651-662.
509. Holz, G. G., G. Kang, M. Harbeck, M. W. Roe, and O. G. Chepurny. 2006. Cell physiology of cAMP sensor Epac. *J Physiol* 577:5-15.

510. Bos, J. L., K. de Bruyn, J. Enserink, B. Kuiperij, S. Rangarajan, H. Rehmann, J. Riedl, J. de Rooij, F. van Mansfeld, and F. Zwartkruis. 2003. The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. *Biochem Soc Trans* 31:83-86.
511. Kooistra, M. R., N. Dube, and J. L. Bos. 2007. Rap1: a key regulator in cell-cell junction formation. *J Cell Sci* 120:17-22.
512. Seino, S., and T. Shibasaki. 2005. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev* 85:1303-1342.
513. Sands, W. A., and T. M. Palmer. 2008. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal* 20:460-466.
514. Bryn, T., M. Mahic, J. M. Enserink, F. Schwede, E. M. Aandahl, and K. Tasken. 2006. The cyclic AMP-Epac1-Rap1 pathway is dissociated from regulation of effector functions in monocytes but acquires immunoregulatory function in mature macrophages. *J Immunol* 176:7361-7370.
515. Mei, F. C., and X. Cheng. 2005. Interplay between exchange protein directly activated by cAMP (Epac) and microtubule cytoskeleton. *Mol Biosyst* 1:325-331.
516. Massi, P., T. Rubino, M. Parenti, G. Giagnoni, A. Groppetti, and D. Parolaro. 1993. Cholera toxin antagonizes morphine-induced catalepsy through a cyclic AMP-independent mechanism. *Eur J Pharmacol* 243:65-71.
517. Uhal, B. D., M. Papp, K. Flynn, and M. E. Steck. 1998. Cholera toxin stimulates type II pneumocyte proliferation by a cyclic AMP-independent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1405:99-109.
518. Buckley, N. E., Y. Su, S. Milstien, and S. Spiegel. 1995. The role of calcium influx in cellular proliferation induced by interaction of endogenous ganglioside GM1 with the B subunit of cholera toxin. *Biochim Biophys Acta* 1256:275-283.
519. Fantini, J., M. Maresca, D. Hammache, N. Yahi, and O. Delezay. 2000. Glycosphingolipid (GSL) microdomains as attachment platforms for host pathogens and their toxins on intestinal epithelial cells: activation of signal transduction pathways and perturbations of intestinal absorption and secretion. *Glycoconj J* 17:173-179.
520. Darnell, J. E., Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635.
521. Christensen, A. E., F. Selheim, J. de Rooij, S. Dremier, F. Schwede, K. K. Dao, A. Martinez, C. Maenhaut, J. L. Bos, H. G. Genieser, and S. O. Doskeland. 2003. cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J Biol Chem* 278:35394-35402.
522. Kurachi, H., Y. Wada, N. Tsukamoto, M. Maeda, H. Kubota, M. Hattori, K. Iwai, and N. Minato. 1997. Human SPA-1 gene product selectively expressed in lymphoid tissues is a specific GTPase-activating protein for Rap1 and Rap2. Segregate expression profiles from a rap1GAP gene product. *J Biol Chem* 272:28081-28088.
523. Cavrois, M., C. De Noronha, and W. C. Greene. 2002. A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat Biotechnol* 20:1151-1154.
524. Markosyan, R. M., F. S. Cohen, and G. B. Melikyan. 2005. Time-resolved imaging of HIV-1 Env-mediated lipid and content mixing between a single virion and cell membrane. *Mol Biol Cell* 16:5502-5513.

525. Qadri, F., A. M. Svennerholm, A. S. Faruque, and R. B. Sack. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* 18:465-483.
526. Moore, J. P., S. G. Kitchen, P. Pugach, and J. A. Zack. 2004. The CCR5 and CXCR4 coreceptors--central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 20:111-126.
527. Tsuru, S., M. Taniguchi, N. Shinomiya, H. Fujisawa, Y. Zinnaka, and K. Nomoto. 1987. Cholera toxin-induced tolerance to allografts in mice. *Immunology* 61:77-83.
528. Williams, N. A., T. R. Hirst, and T. O. Nashar. 1999. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins: from adjuvant to therapeutic. *Immunol Today* 20:95-101.
529. Yura, M., I. Takahashi, S. Terawaki, T. Hiroi, M. N. Kweon, Y. Yuki, and H. Kiyono. 2001. Nasal administration of cholera toxin (CT) suppresses clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Vaccine* 20:134-139.
530. Hirst, T. R., S. Fraser, M. Soriani, A. T. Aman, H. L. de, A. Hearn, and E. Merritt. 2002. New insights into the structure-function relationships and therapeutic applications of cholera-like enterotoxins. *Int J Med Microbiol* 291:531-535.
531. Lavelle, E. C., A. Jarnicki, E. McNeela, M. E. Armstrong, S. C. Higgins, O. Leavy, and K. H. Mills. 2004. Effects of cholera toxin on innate and adaptive immunity and its application as an immunomodulatory agent. *J Leukoc Biol* 75:756-763.

Section 4 :

Annexes

Annexe 1 : Rôle de la gp120 dans l'infection des trophoblastes par le VIH-1

Résumé:

La transmission mère-enfant est la principale cause d'infection pédiatrique par le VIH-1. L'infection directe des trophoblastes, les cellules structurales du placenta, est un des mécanismes postulés pour expliquer la transmission verticale du VIH-1. Le mécanisme par lequel le VIH-1 infecte les trophoblastes est inhabituel. En effet, son internalisation et son transport par les endosomes sont requis. Puisque les trophoblastes expriment peu ou pas les récepteurs et corécepteurs requis pour l'entrée virale, les étapes précoces du cycle viral dans ces cellules demeurent mystérieuses. Nous montrons ici que l'entrée et l'infection par le VIH-1 des trophoblastes polarisés sont non seulement indépendantes du CD4, mais aussi des glycoprotéines de l'enveloppe. L'internalisation du virus, le relâchement cytoplasmique, la transcription inverse, l'intégration et l'expression des gènes viraux surviennent autant chez les virions incompetents pour la fusion que déficients pour l'enveloppe virale et ce à des niveaux comparables aux virions de type sauvage. Cette infection indépendante de l'enveloppe est observée non seulement en utilisant des virus produits sur 293T, mais également produits sur des cellules primaires humaines. Finalement, nous avons montré que l'internalisation du VIH-1 par les trophoblastes polarisés requiert la participation des héparans sulfates. Dans l'ensemble, nos découvertes montrent que le VIH-1 utilise une voie inhabituelle pour son entrée dans les trophoblastes polarisés. Nous postulons que l'accès au cytoplasme des virus pourrait survenir suite à une fusion des virus avec la membrane des endosomes grâce à la machinerie de la cellule hôte.

Contribution :

Les résultats de la figure 5C ont été générés par Sonia Gauthier.

**HIV-1 infection of trophoblasts is independent of gp120/CD4 interactions
but relies on heparan sulfate proteoglycans**

Gaël Vidricaire, Sonia Gauthier and Michel J. Tremblay*

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

Word counts: abstract - 150; main text - 3496

Running title: HIV-1 infection of human trophoblasts

Footnotes

1. The authors do not have a commercial or other association that may pose a conflict of interest.

2. This study was supported by a grant to M.J.T. from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) HIV/AIDS Initiative (HOP-67259).

3. Corresponding author. Mailing address:

Dr. Michel J. Tremblay

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

Mother-to-child transmission of HIV-1 is the leading cause of infection in infants. Direct infection of the trophoblasts, cells forming the placental barrier, may cause such transmission. Entry of HIV-1 in trophoblasts is unusual for this retrovirus since it is associated with endocytosis. However, given that trophoblasts express no or little receptors/coreceptors required for virus internalization, the mechanism underlying this event remains ambiguous. We show here that HIV-1 entry and infection of polarized trophoblasts are not only independent of CD4, but also of envelope (Env) glycoproteins gp120 and gp41. Virus internalization, cytoplasmic release, reverse transcription, integration and HIV-1 gene expression occurred with both fusion-incompetent and Env-deficient viruses. Importantly, fusion-independent infection was observed when using viruses produced in a natural cellular reservoir, i.e. primary human cells. Finally, HIV-1 requires heparan sulfate proteoglycans for uptake in trophoblasts. Altogether our findings illustrate that HIV-1 utilizes an unusual pathway for entering into human polarized trophoblasts.

Keywords: HIV-1, trophoblast, endosome, polarization, heparan sulfate proteoglycans

INTRODUCTION

More than two million children are living with HIV-1 worldwide and 90% of these infections result from a transmission from the mother [1] occurring *in utero*, at birth, or via breastfeeding [2]. HIV-1 has been detected in newborns at delivery [3-5] and in aborted fetuses [6-9]. Importantly, women are becoming infected at a higher frequency than men [10] and access to antiretroviral treatments is limited in developing countries [11]. Hence, defining the mechanism(s) underlying vertical transmission is urgently needed.

For *in utero* HIV-1 transmission to occur, the virus must cross the selective placental barrier composed of a double layer of polarized epithelial-type cells: the cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. The postulated models include cell-to-cell transfer, a direct infection of the trophoblasts and transcytosis of viral particles across the trophoblasts (reviewed in [12]). The mechanism underlying infection with cell-free virus remains largely unknown. HIV-1 was shown to productively infect trophoblasts both *in vitro* [13-16] and *in vivo* [5, 17-19]. However, they exhibit a much lower susceptibility to productive HIV-1 infection than CD4⁺ T lymphocytes [14, 15, 20].

HIV-1 entry in CD4⁺ T cells is mediated by the virus-encoded envelope (Env) glycoproteins gp120 and gp41. These proteins interact with the primary cellular receptor CD4 and coreceptors (e.g. CXCR4 or CCR5), which leads to the formation of a fusion pore in the host cell membrane (reviewed in [21]). Contrary to this, we have established that upon contact with human trophoblasts, HIV-1 is rapidly and massively endocytosed, and virions are predominantly trapped within the endosomal compartments [22]. Noteworthy, this internalization event is crucial for HIV-1 infection to proceed in trophoblasts since drugs that inhibit the function of the endosomes block virus infection [22, 23].

Although HIV-1 infection in trophoblasts relies on endocytosis, the initial events of the virus life cycle in this cell type are ill defined. For instance, the expression of CD4 remains very low to absent in primary trophoblasts while the expression of coreceptors may vary in the course of pregnancy [15, 24, 25]. Some previous studies have addressed the contribution of CD4, CXCR4 and CCR5 in HIV-1 infection of trophoblasts and the published reports are contradictory, either involving gp120/CD4/co-receptor interactions [20, 26] or not [16, 25, 27]. Hence, the role of CD4 and coreceptors for HIV-1 entry into trophoblastic cells is still unclear but it is reasonable to assume that CD4, CXCR4 and CCR5 are unlikely to play a significant role because they are expressed at such low levels if present. In agreement with that statement, several groups have shown recently that CD4 is not required for HIV-1 infection in trophoblasts [27-30]. In this context, we made two hypotheses. First, other attachment receptors must be involved to compensate for the low level of CD4/CXCR4/CCR5 in these cells. Second, if HIV-1 infection of trophoblasts is independent of the known receptor/coreceptors for entry, the virus may not rely on the Env glycoproteins for such event. The central objective of the present work was to test the validity of these postulates.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cells. The human trophoblastic cell lines (JAR and JEG-3), embryonic kidney 293T cells, leukemic T cell line Jurkat (clone E6.1) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were maintained as previously described [14].

Preparation of virus stocks. The NL4-3 (X4), JR-CSF (R5), NL4-3-Luc E-R+, HXB2-env (X4), Ada-M- env (R5) and HCMV-G molecular constructs were previously described [23]. The NL4-3-Luc E-R+ expression vector was used to generate Env-deficient reporter viruses (called NL4-3 Δ Env). pHCMV-G codes for the broad-host-range vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G (VSV-G) [31]. The fusion-competent pSM-WT and fusion-incompetent pSM-570R Env expression vectors are derived from the HXB-2 backbone [32]. Viruses were produced by calcium phosphate transfection of 293T cells as described previously [14]. Viruses loaded with the β -lactamase-Vpr fusion protein were produced by co-transfection of 293T cells with pCMV- β laM-Vpr (W.C. Greene, Gladstone Institute of Virology and Immunology, San Francisco, CA) together with some of the expression vectors described above. Virus preparations were also generated through acute infection of PBMCs with NL4-3 or JR-CSF.

Infection assays. Cells were incubated at 37°C for 24 h with NL4-3 Δ Env particles or recombinant luciferase-encoding viruses pseudotyped with SM-WT or SM-570R (1×10^6 target cells with 0 to 500 ng of p24, or in some experiments 250 ng of p24 together with 10 μ M of zidovudine/AZT). Virus gene expression was induced with TNF- α (10 ng/ml) as described previously [14]. JAR cells were incubated for 30 min at 4°C with soluble CD4 (10 μ g/ml), an isotype-matched irrelevant control antibody (i.e., IgG2a at 10 μ g/ml), or a blocking anti-CD4 antibody (i.e., SIM.2 at 10 μ g/ml) following which Ada-M or HXB-2 pseudotyped reporter viruses (250 ng of p24) were added. For Jurkat, cells were exposed to the control antibody or SIM.2 for 30 min at 37°C before inoculation with pseudotyped

viruses (100-150 ng of p24). T-20 (Roche Bioscience, Palo Alto, CA) was added at various doses (0, 0.2, 1.0 and 5.0 $\mu\text{g/ml}$) at 4°C to JAR cells concomitantly with Ada-M or HXB-2 pseudotyped reporter viruses (250 ng of p24). Jurkat were treated with 1 $\mu\text{g/ml}$ of T-20 before exposure to HXB-2 pseudotypes or wild type NL4-3 viruses (100-150 ng of p24). Luciferase activity was measured in lysed cells. For Jurkat infected with wild type NL4-3, cell supernatants were harvested and frozen at -20°C until assayed with a homemade p24 test [33].

Virus absorption and internalization assays. Cells were exposed to SM-WT pseudotyped, SM-570R pseudotyped, wild type NL4-3, or NL4-3 ΔEnv (250 ng of p24 for 1×10^6 cells) for 0 to 4 h at 4°C (to test virus absorption) or 37°C (to test virus internalization). For kinetics of virus absorption, the cells were washed three times with ice-cold PBS. As for kinetics of virus internalization, the cells were acid-treated (0.5 M NaCl, 1% acetic acid) at 4°C for 1 min and washed three times with ice-cold PBS to remove all uninternalized viral particles. Cells were lysed in ice-cold lysis buffer as previously described [23]. Heparin sodium (0, 50, 250 and 500 IU/ml) (Leo-Pharma, Thornhill, ON) was added at 4°C together with NL4-3 ΔEnv , Ada-M or HXB-2 pseudotypes (250 ng of p24). JAR cells were pre-treated with 0, 2, 20, 200 and 400 mU/ml of heparinase (Sigma-Aldrich) for 1.5 h at 37°C.

$\beta\text{laM-Vpr}$ -mediated cleavage of CCF2/AM. This assay is based on an already established technique [34, 35]. Briefly, polarized JAR cells were exposed to pseudotyped SM-570R or NL4-3 ΔEnv viruses which were all loaded with $\beta\text{laM-Vpr}$ fusion protein (400 ng of p24 for 1×10^6 cells) for 2 h at 37°C. The virus-cell mixture was incubated with the CCF2/AM dye (Aurora Bioscience, San Diego, CA) for 1 h at room temperature and the βlaM reaction was maintained for 24 h at room temperature in CO₂-independent medium supplemented with 10% FCS and 2.5 mM probenecid (Sigma-Aldrich). Both the emission spectra of CCF2/AM (520 nm) and its cleaved product (447 nm), as well as the degree of βlaM -mediated cleavage were assessed as described previously [36].

Cell fractionation assays. Polarized JAR cells were exposed to pseudotyped viruses (i.e., SM-WT, SM-570R and VSV-G), wild type NL4-3, or NL4-3 Δ Env viruses (250 ng of p24 for 1 million cells) for 4 h at 37°C. The cellular membranes were disrupted and the two distinct fractions (i.e., cytosolic and endosomal) were isolated as described previously [37].

Real-time PCR. Polarized JAR cells (1×10^6) were either left untouched or exposed to pseudotyped (i.e., SM-WT, SM-570R and VSV-G) or NL4-3 Δ Env viruses (250 ng of p24) (a ratio of 1×10^6 cells for 100 ng of p24 was used for Jurkat) for 48 h at 37°C. For the experiment with the fusion inhibitor T-20, the drug was added (1.0 μ g/ml) at 4°C to polarized JAR cells (1×10^6) concomitantly with NL4-3 or JR-CSF viruses produced in PBMCs (110 ng of p24). Total cellular DNA was isolated using the DNeasy Tissue Kit as described by the manufacturer (QIAGEN Inc., Mississauga, ON). To quantify the amount of integrated viral DNA, we used the real-time PCR approach described by Suzuki and colleagues [38].

RESULTS

HIV-1 entry and infection of human trophoblasts is independent of CD4 and gp120/gp41. Given that HIV-1 infection of trophoblasts relies heavily on the cellular endocytic machinery [22], maintaining cell polarity when studying such process is of prime importance. If purification of primary human trophoblasts results in the loss of cell polarity [39], the human trophoblastic JAR cell line exhibits many characteristics of the early placenta [40]. Importantly, they can be cultivated into a polarized epithelium-like monolayer that closely resembles the *in vivo* trophoblastic barrier [22].

Initially, treatment of polarized JAR cells with soluble CD4 (sCD4) had no effect on virus internalization (Fig. 1A). Our next series of experiments was aimed at defining whether agents that block gp120/CD4 interactions can affect HIV-1 infection. It should be noted that virus gene expression in such cells is only detected following addition of physiologic doses of proinflammatory cytokines (TNF- α or IL-1 β) [14]. Pretreatment of polarized JAR cells with the blocking anti-CD4 antibody SIM.2 did not significantly modulate infection with R5 and X4 reporter viruses (Figs. 1B and 1C, respectively). As a control, infection of Jurkat T lymphoid cells with X4 pseudotyped reporter viruses was inhibited by 71% (Fig. 1D). Interestingly, virus gene expression was still efficiently inhibited in TNF- α -treated Jurkat cells (94% reduction). Expanding on these data, experiments were conducted with the fusion inhibitor T-20. The presence of up to 5 μ g/ml of T-20 did not reduce reporter gene activity of the two viral strains tested (Figs. 2A and 2B). In control studies, virus gene expression was inhibited by 76% in Jurkat cells in the absence of TNF- α and 87% in its presence (Fig. 2C).

Next, polarized JAR cells were exposed to SM-570R pseudotypes or NL4-3 Δ Env viruses for increasing time periods either at 4°C (used as a control/permits to estimate virus absorption) or 37°C to estimate the kinetics of virus internalization. The SM-570R

construct bears a mutation in gp41 that abolishes its fusogenic activity, whereas the NL4-3ΔEnv viruses completely lack Env due to a frameshift mutation near the env gene. The tested virus preparations were internalized with a high efficiency and in a timely fashion in polarized JAR cells (Figs. 3A and 3C). Importantly, they were also found to be internalized by JAR cells at a comparable level to wild type viruses (Figs. 3B and 3D). Intrigued by these data, we tested whether virus infection can be observed independently of gp120 and gp41. Polarized JAR cells were exposed to increasing doses of reporter viruses pseudotyped with SM-WT Env (wild type) and TNF- α was added to promote viral gene expression. As expected and in agreement with previous observations [14], we found that SM-WT viruses were able to infect the trophoblastic cell line JAR in a dose-dependent fashion (Fig. 4A). The TNF- α -mediated reporter gene activity was increased by 37- to 46-fold when compared to unstimulated infected polarized JAR cells, thus implying robust HIV-1 LTR-driven gene expression. This infection was significantly diminished by the anti-retroviral drug AZT therefore showing that reverse transcription occurred in trophoblasts. Next, polarized JAR cells were exposed to SM-570R pseudotyped and NL4-3ΔEnv viruses in escalating doses. Surprisingly, the Env-mutated and Env-deficient viruses were both found to infect JAR cells (Figs. 4B and 4C). Again, virus infection was markedly reduced by AZT, illustrating true viral infection. Experiments performed with another choriocarcinoma cell line, i.e. JEG-3, confirmed that virus infection in trophoblastic cells can be achieved in a gp120/gp41-independent manner (Fig. 4D). On the other hand, no LTR-driven luciferase activity could be detected in the absence or presence of TNF- α when Jurkat cells were inoculated with NL4-3ΔEnv virions in escalating doses (Fig. 4E).

Env-mutated and -deficient HIV-1 can access the cytoplasm of polarized JAR cells.

The distribution of HIV-1 within vesicular and cytosolic compartments was assessed in polarized JAR cells because productive HIV-1 infection has been reported to result from the release of p24 within the cytosol [41]. VSV-G pseudotypes were used as positive controls for the assay because although VSV-G pseudotypes enter cells through endocytosis, there is a rapid shift from the endocytic machinery to the cytoplasm [42].

VSV-G pseudotypes were indeed predominantly located within the cytosolic fraction of JAR cells (Fig. 5A). Next, we found that 37% and 58% of the total internalized p24 content were located in the cytoplasm of JAR cells upon infection with SM-WT pseudotyped and NL4-3 viruses, respectively. Importantly, fusion-incompetent and Env-deficient viruses were found to access the cytoplasm of polarized trophoblastic cells with efficiencies comparable to that of wild type.

An alternative strategy was used to confirm the capacity of HIV-1 to gain access to the cytoplasm through a gp120-/gp41-independent process. The fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based HIV-1 fusion assay exploits the incorporation of β -lactamase-Vpr chimeric proteins inside progeny viruses and their subsequent release into the cytoplasm of target cells as a marker of fusion. Infection with SM-570R and NL4-3 Δ Env viruses resulted in β laM-mediated cleavages ranging from 4.6 to 19.33% and 7.98% to 11.7%, respectively (table 1). It is important to specify that while HIV-1 is internalized primarily by endocytosis in trophoblasts [22], CCF2-AM is cytoplasmic and does not reach these compartments [34]. Therefore, in trophoblasts, β laM-mediated cleavage of CCF2-AM occurs when HIV-1 is gaining access to the cytoplasm upon escaping the endosomal compartments.

Fusion-incompetent and Env-deficient viruses can integrate within the genome of polarized trophoblasts. The presence of integrated viral DNA was next assessed in polarized trophoblastic cells upon infection with fusion-incompetent and Env-deficient viruses using a previously reported real-time PCR test [38]. As expected, we found that the number of integrated viral DNA copies obtained upon infection with VSV-G was much higher than when wild type HIV-1 was used (Fig. 5B). High quantities of integrated HIV-1 DNA copies were detected in trophoblasts upon infection with SM-WT, agreeing with the notion of true HIV-1 infection in these cells. Importantly, the number of viral DNA copies obtained upon infection with SM-570R and NL4-3 Δ Env viruses was comparable to the ones observed when using wild type HIV-1 particles. We next tested viral integration using

Jurkat cells as controls. Although integrated provirus was observed upon infection of Jurkat with SM-WT, none was detected upon infection with SM-570R or NL4-3 Δ Env viruses (data not shown).

The experiments conducted so far were done using viral preparations produced in human embryonic kidney 293T cells. Is the Env-independent virus infection of trophoblasts related to unique fusogenic properties derived from 293T cells (virus producer cells) that would be in turn acquired by HIV-1 upon budding, or could this phenomenon be also seen when using viruses produced in more physiological cell types? Fully competent R5 (i.e., JR-FL) and X4 (i.e., NL4-3) viruses were harvested upon infection of PBMCs and were used to infect trophoblasts in the presence or absence of T-20 before assessing the amount of integrated viral DNA copies. We found that T-20 had no impact on the levels of integrated viral DNA copies upon infection of trophoblasts with HIV-1 produced in PBMCs (Fig. 5C). In a control experiment, integration of NL4-3 particles in Jurkat cells was reduced by 75% upon a treatment with T-20 (data not shown).

HIV-1 internalization in polarized trophoblasts is mediated at least partly through HSPGs. Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) have been suggested as putative HIV-1 attachment/entry receptors based on the demonstration that heparinase treatment, which removes all cell surface heparan sulfate chains, diminishes HIV-1 infection of HeLa-CD4 epithelial cells and monocyte-derived macrophages [43, 44]. Heparin strongly decreased entry of the two HIV-1 strains tested (Figs. 6A and 6C). To verify whether the effect induced by heparin was indeed related to receptor inhibition and not due to a steric hindrance phenomenon related to heparin, JAR cells were treated with heparinase to remove heparan sulfate from the cell surface before the cells were exposed to Ada-M or HXB-2 pseudotypes. A decrease in virus internalization was observed upon treatment with heparinase (Figs. 6B and 6D). Moreover, internalization of NL4-3 Δ Env viruses was also diminished upon a pre-treatment either with heparin (Fig. 6E) or heparinase (Fig. 6F). To define if this diminution in viral internalization translated into reduced viral infection,

infection assays were conducted in JAR cells pre-treated with heparin. This treatment induced a 50% reduction in HIV-1 infection (Fig. 6G).

DISCUSSION

This paper addressed key aspects of HIV-1 replicative cycle in polarized human trophoblasts. We used different technical strategies to demonstrate that the process of virus infection proceeds through a gp120/CD4-independent mechanism: i) a blocking anti-CD4 antibody and soluble CD4; ii) the fusion inhibitor T-20; iii) fusion-incompetent viruses; and iv) viral particles lacking both gp120 and gp41 Env glycoproteins. Given that the cytoplasmic delivery of viral material, reverse transcription (controlled by AZT) and viral DNA integration are potent markers of true HIV-1 infection in CD4⁺ T cells, and considering that these various events are observed in polarized trophoblasts following exposure to Env-deficient viruses at levels comparable to wild type virions, we conclude that the process of HIV-1 internalization leading to infection of polarized trophoblastic cells is independent of the normal interactions between CD4/coreceptors with gp120. Importantly, integration was seen in the presence of T-20 when using fully competent viruses produced in natural cellular reservoirs such as PBMCs. This fact brings great credibility to the biological relevance of our findings. It is of interest to note that gp120-independent infection of CD4-negative epithelial cells and CD4⁺ T-cells by HIV-1 was previously documented [45]. Moreover, although our experiments were performed with cell-free viruses, it has been previously proposed that HIV-1 infection of trophoblastic cells occurs mainly via a cell-to-cell contact [27, 46]. The explanation for this discrepancy is currently unknown but could relate to differences in experimental methodologies such as the use of polarized trophoblastic cells in the present work.

We also provide evidence that HSPGs play an important role in mediating Env-independent internalization of HIV-1 within trophoblasts. Heparan sulfate within HSPGs are linear, polysulfated and, thereby, highly negatively charged glycosaminoglycan polysaccharides and their binding to a wide variety of ligands is largely dependent on ionic interactions [47]. This notion fully agrees with the observation that although HIV-1 internalization is extremely rapid, binding of HIV-1 to trophoblasts is weak [14]. Supporting the idea that

HSPGs may be involved in HIV-1 trophoblast infection *in vivo*, syndecan-1 is expressed throughout pregnancy by syncytiotrophoblasts, while syndecan-2, -4 and glypican-1 are expressed by villous and extravillous cytotrophoblasts as well as by syncytiotrophoblasts [48]. Neither heparin nor heparinase completely blocked viral uptake in trophoblasts, thus suggesting that other types of receptors may act concomitantly for HIV-1 internalization in trophoblasts. It has been shown that transcytosis of HIV-1 across the trophoblastic cell line BeWo can be blocked by antibodies to galactosyl ceramide [13]. In addition, several putative alternate HIV-1 receptors, recognized to act as such on other cell types, are present on the surface of trophoblasts (including C-type lectins such as the mannose receptor). It has also been hypothesized that vertical transmission of HIV-1 may be favored by the presence of DC-SIGN/DC-SIGNR-expressing cells within the placental environment [49]. However, this property would apply to transmission via microbreaches because these attachment receptors are expressed in maternal macrophages, placental capillaries and Hofbauer cells, but not in trophoblasts [49].

We have previously shown that endosome inhibitors abolish HIV-1 infection of trophoblastic cells [22, 23], implying that the process of virus infection is endocytic in nature. Based on our current data, we conclude that HIV-1 endosomal escape occurs in trophoblastic cells through a mechanism that is independent of the viral Env glycoproteins. The precise mechanism through which HIV-1 can reach the cytoplasm and integrate within the host chromatin of polarized trophoblasts is still undefined. However, it is well documented that HIV-1 carries a lipid membrane and acquires a wide array of host cell proteins upon budding (reviewed in [50]). HIV-1 may have evolved to exploit the endosomal hydrolases to escape into the cytoplasm. However, this hypothesis is not supported by some recent data [23]. Alternatively, HIV-1 might undergo fusion within the endosomes via interactions between virus-anchored host proteins and endosomal proteins within trophoblasts. Interestingly, it was recently shown that the nucleocapsid of VSV is exported into the cytoplasm after the back-fusion of internal vesicles with the limiting membrane of late endosomes [51]. Moreover, it is recognized that HIV-1 infection from the endosomes is possible in macrophages, lymphocytic cells and HeLa cells when viral

particles are spared from degradation [52, 53]. Finally, images of HIV-1 particles internalized in endocytic vesicles and undergoing fusion with endosomal membrane have been observed in macrophages and trophoblastic cells [16, 54].

In summary, the data presented in this study further support the idea that HIV-1 infection of trophoblasts is fundamentally different from what is known for CD4⁺ T lymphocytes. Our current model proposes that the initial interactions between HIV-1 and polarized trophoblasts occur partly through a HSPG-mediated absorption mechanism. This process leads to a rapid and massive endocytosis of virions. Infection ensues in the absence of the viral Env glycoproteins gp120 and gp41 through endosomal escape and access to the cytoplasm. Collectively, these data provide key information on the early events associated with HIV-1 life cycle in polarized human trophoblasts.

ACKNOWLEDGEMENTS

We express our appreciation to Sylvie Méthot for editorial assistance. This work was performed by G.V. in partial fulfillment of her Ph.D. Degree in the Program of Microbiology-Immunology, Faculty of Medicine, Laval University. G.V. and S.G. are the recipients of a CIHR Doctoral Research Award from the HIV/AIDS Research Program and M.J.T. holds the Canada Research Chair in Human Immuno-Retrovirology (Tier 1 level).

REFERENCES

1. UNAIDS. Paediatric HIV infection and AIDS. UNAIDS point of view.: Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, 2002
2. Rouzioux C, Costagliola D, Burgard M, et al. Estimated timing of mother-to-child human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission by use of a Markov model. The HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group. *Am J Epidemiol* 1995;142:1330-7
3. Laure F, Courgnaud V, Rouzioux C, et al. Detection of HIV1 DNA in infants and children by means of the polymerase chain reaction. *Lancet* 1988;2:538-41
4. Zachar V, Thomas RA, Jones T and Goustin AS. Vertical transmission of HIV: detection of proviral DNA in placental trophoblast. *Aids* 1994;8:129-30
5. Menu E, Mbopi-Keou FX, Lagaye S, et al. Selection of maternal human immunodeficiency virus type 1 variants in human placenta. European Network for In Utero Transmission of HIV-1. *J Infect Dis* 1999;179:44-51
6. Courgnaud V, Laure F, Brossard A, et al. Frequent and early in utero HIV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991;7:337-41
7. Lewis SH, Reynolds-Kohler C, Fox HE and Nelson JA. HIV-1 in trophoblastic and villous Hofbauer cells, and haematological precursors in eight-week fetuses. *Lancet* 1990;335:565-8
8. Mano H, Chermann JC. Replication of human immunodeficiency virus type 1 in primary cultured placental cells. *Res Virol* 1991;142:95-104
9. Soeiro R, Rubinstein A, Rashbaum WK and Lyman WD. Maternofetal transmission of AIDS: frequency of human immunodeficiency virus type 1 nucleic acid sequences in human fetal DNA. *J Infect Dis* 1992;166:699-703
10. UNAIDS. 2004 Report on the global AIDS epidemic: Joint United Nations Programme in HIV/AIDS, 2004

11. Mofenson LM, Munderi P. Safety of antiretroviral prophylaxis of perinatal transmission for HIV-infected pregnant women and their infants. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;30:200-15
12. Scarlatti G. Mother-to-child transmission of HIV-1: advances and controversies of the twentieth centuries. *AIDS Rev* 2004;6:67-78
13. Lagaye S, Derrien M, Menu E, 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;75:4780-91
14. Vidricaire G, Tardif MR and Tremblay MJ. 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;278:15832-41
15. Zachar V, Spire B, Hirsch I, Chermann JC and Ebbesen P. Human transformed trophoblast-derived cells lacking CD4 receptor exhibit restricted permissiveness for human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1991;65:2102-7
16. Phillips DM, Tan X. HIV-1 infection of the trophoblast cell line BeWo: a study of virus uptake. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992;8:1683-91
17. Dictor M, Lindgren S, Bont J, et al. HIV-1 in placentas of untreated HIV-1-infected women in relation to viral transmission, infectious HIV-1 and RNA load in plasma. *Scand J Infect Dis* 2001;33:27-32
18. Lee BN, Ordonez N, Popek EJ, et al. Inflammatory cytokine expression is correlated with the level of human immunodeficiency virus (HIV) transcripts in HIV-infected placental trophoblastic cells. *J Virol* 1997;71:3628-35
19. Zachar V, Zacharova V, Fink T, et al. Genetic analysis reveals ongoing HIV type 1 evolution in infected human placental trophoblast. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15:1673-83

20. David FJ, Autran B, Tran HC, et al. Human trophoblast cells express CD4 and are permissive for productive infection with HIV-1. *Clin Exp Immunol* 1992;88:10-6
21. Gallo SA, Finnegan CM, Viard M, et al. The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* 2003;1614:36-50
22. Vidricaire G, Imbeault M and Tremblay MJ. 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;78:11904-15
23. Vidricaire G, Tremblay MJ. Rab5 and Rab7, but not ARF6, govern the early events of HIV-1 infection in polarized human placental cells. *J Immunol* 2005;175:6517-30
24. Kumar A, Kumar S, Dinda AK and Luthra K. Differential expression of CXCR4 receptor in early and term human placenta. *Placenta* 2004;25:347-51
25. Mognetti B, Moussa M, Croitoru J, et al. HIV-1 co-receptor expression on trophoblastic cells from early placentas and permissivity to infection by several HIV-1 primary isolates. *Clin Exp Immunol* 2000;119:486-92
26. David FJ, Tran HC, Serpente N, et al. HIV infection of choriocarcinoma cell lines derived from human placenta: the role of membrane CD4 and Fc-Rs into HIV entry. *Virology* 1995;208:784-8
27. Arias RA, Munoz LD and Munoz-Fernandez MA. Transmission of HIV-1 infection between trophoblast placental cells and T-cells take place via an LFA-1-mediated cell to cell contact. *Virology* 2003;307:266-77
28. Al-Harhi L, Guilbert LJ, Hoxie JA and Landay A. Trophoblasts are productively infected by CD4-independent isolate of HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:13-7
29. Bacsı A, Ebbesen P, Szabo J, et al. Pseudotypes of vesicular stomatitis virus-bearing envelope antigens of certain HIV-1 strains permissively infect human syncytiotrophoblasts cultured in vitro: implications for in vivo infection of syncytiotrophoblasts by cell-free HIV-1. *J Med Virol* 2001;64:387-97

30. Bourinbaiar AS, Borkowsky W, Krasinski KM and Fruhstorfer EC. Failure of Neutralizing gp120 Monoclonal Antibodies to Prevent HIV Infection of Choriocarcinoma-Derived Trophoblasts. *J Biomed Sci* 1997;4:162-168
31. Yee JK, Miyanohara A, LaPorte P, Bouic K, Burns JC and Friedmann T. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9564-8
32. Weng Y, Weiss CD. Mutational analysis of residues in the coiled-coil domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41. *J Virol* 1998;72:9676-82
33. Bounou S, Leclerc JE and Tremblay MJ. 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;76:1004-14
34. Cavrois M, De Noronha C and Greene WC. A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat Biotechnol* 2002;20:1151-4
35. Cavrois M, Neidleman J, Bigos M and Greene WC. Fluorescence resonance energy transfer-based HIV-1 virion fusion assay. *Methods Mol Biol* 2004;263:333-44
36. Zlokarnik G, Negulescu PA, Knapp TE, et al. Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science* 1998;279:84-8
37. Tardif MR, Tremblay MJ. 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;77:12299-309
38. Suzuki Y, Misawa N, Sato C, et al. 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* 2003;27:177-88
39. Bomsel M, Alfsen A. Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:57-68

40. Ringler GE, Strauss JF, 3rd. In vitro systems for the study of human placental endocrine function. *Endocr Rev* 1990;11:105-23
41. Marechal V, Clavel F, Heard JM and Schwartz O. Cytosolic Gag p24 as an index of productive entry of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1998;72:2208-12
42. Roberts PC, Kipperman T and Compans RW. Vesicular stomatitis virus G protein acquires pH-independent fusion activity during transport in a polarized endometrial cell line. *J Virol* 1999;73:10447-57
43. Mondor I, Ugolini S and Sattentau QJ. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J Virol* 1998;72:3623-34
44. Saphire AC, Bobardt MD, Zhang Z, David G and Gallay PA. Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J Virol* 2001;75:9187-200
45. Chow YH, Yu D, Zhang JY, et al. gp120-Independent infection of CD4(-) epithelial cells and CD4(+) T-cells by HIV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;30:1-8
46. Parry S, Zhang J, Koi H, Arechavaleta-Velasco F and Elovitz MA. Transcytosis of Human immunodeficiency virus 1 across the placenta is enhanced by treatment with tumour necrosis factor alpha. *J Gen Virol* 2006;87:2269-78
47. Belting M. Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier. *Trends Biochem Sci* 2003;28:145-51
48. Crescimanno C, Marzioni D, Paradinas FJ, et al. Expression pattern alterations of syndecans and glypican-1 in normal and pathological trophoblast. *J Pathol* 1999;189:600-8
49. Soilleux EJ, Morris LS, Lee B, et al. Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV. *J Pathol* 2001;195:586-92

50. Cantin R, Methot S and Tremblay MJ. Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses. *J Virol* 2005;79:6577-87
51. Le Blanc I, Luyet PP, Pons V, et al. Endosome-to-cytosol transport of viral nucleocapsids. *Nat Cell Biol* 2005;7:653-64
52. Fackler OT, Peterlin BM. Endocytic entry of HIV-1. *Curr Biol* 2000;10:1005-8
53. Schaeffer E, Soros VB and Greene WC. Compensatory link between fusion and endocytosis of human immunodeficiency virus type 1 in human CD4 T lymphocytes. *J Virol* 2004;78:1375-83
54. Marechal V, Prevost MC, Petit C, Perret E, Heard JM and Schwartz O. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol* 2001;75:11166-77

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. HIV-1 infection of polarized trophoblasts is independent of CD4. Polarized JAR cells were exposed to Ada-M or HXB-2 pseudotyped viruses for 1 h at 37°C in the presence or absence of soluble CD4 (10 µg/ml) (panel A). The cells were then washed extensively and lysed. Viral entry was measured by evaluating the amount of p24 in each cell lysate. Data shown are expressed as the means ± S.D. of triplicate samples and are representative of three independent experiments. In some experiments, polarized JAR cells were first pretreated with PBS (vehicle), the control antibody, or SIM.2 and then exposed to Ada-M (panel B) or HXB-2 (panel C) pseudotyped reporter viruses for 24 h at 37°C. For Jurkat, the cells were pre-treated with PBS (vehicle), an isotype-matched irrelevant antibody (control antibody/IgG2a), or SIM.2 before exposure to reporter viruses pseudotyped with SM-WT Env (panel D) for 24 h at 37°C. The cells were then either left unstimulated or stimulated for 24 h with TNF-α (10 ng/ml). Viral infection was monitored by measuring luciferase activity in each cell lysate. Values from the luminometer are expressed as relative light units (RLU). Data shown are expressed as fold increase ± S.D. of treated cells over mock-infected cells without stimulation and are representative of three independent experiments.

Fig. 2. The fusion inhibitor T-20 does not inhibit HIV-1 infection of polarized JAR cells. Polarized JAR cells were exposed to Ada-M (panel A) or HXB-2 (panel B) pseudotyped reporter viruses in the presence of the indicated concentrations of T-20 for 24 h at 37°C. In some experiments, Jurkat cells were exposed to wild type NL4-3 viruses (panel C) in the absence or presence of 1.0 µg/ml of T-20 for 24 h at 37°C. Cells were then either left untreated or stimulated for 24 h with TNF-α (10 ng/ml) together with a second dose of T-20. For cells infected with reporter viruses, luciferase activity was monitored in each cell lysate. Values from the luminometer are expressed as relative light units (RLU). For Jurkat cells infected with fully competent viruses (i.e., NL4-3), infection was evaluated

by estimating the amount of p24 in each cell lysate. Data shown are expressed as the means \pm S.D. of quadruplicate samples and are representative of three independent experiments.

Fig. 3. Viral internalization in polarized trophoblasts occurs independently of gp120/gp41. Polarized JAR cells were exposed to SM-WT pseudotyped (panel A), wild type NL4-3 (panel B), SM-570R pseudotyped (panel C), or Env-deficient viruses (NL4-3 Δ Env) (panel D) for the indicated time periods either at 4°C (to estimate absorption) or 37°C (to estimate internalization). The cells were then treated as described in Materials and Methods. Viral absorption and internalization were measured by evaluating the amount of p24 in each cell lysate. Data shown are expressed as the means \pm S.D. of triplicate samples and are representative of three independent experiments.

Fig. 4. Viral infection in polarized trophoblasts occurs independently of gp120/gp41. Polarized JAR cells were exposed to increasing concentrations of SM-WT pseudotyped (panel A), SM-570R pseudotyped (panel B), or Env-deficient reporter viruses (NL4-3 Δ Env) (panel C) in the absence or presence of AZT (10 μ M) for 24 h at 37°C. JEG-3 cells were exposed to Ada-M pseudotyped, HXB-2 pseudotyped, Env-deficient (NL4-3 Δ Env), SM-WT pseudotyped, or SM-570R pseudotyped reporter viruses (panel D). In some experiments, Jurkat cells were exposed for 24 h at 37°C to SM-WT pseudotyped (500 ng of p24), SM-570R pseudotyped (500 ng of p24), or Env-deficient viruses (NL4-3 Δ Env) (1, 10, 50 and 150 ng of p24) (panel E). The cells were then stimulated for 24 h with TNF- α (10 ng/ml). Luciferase activity was monitored in each cell lysate. Values from the luminometer are expressed as relative light units (RLU). Data shown are expressed as the means \pm S.D. of quadruplicate samples and are representative of three independent experiments.

Fig. 5. Cytosolic release of p24 and integration in the genome of polarized trophoblasts is comparable between wild type, fusion-incompetent and Env-deficient

viruses. Polarized JAR cells were exposed to SM-WT pseudotyped, SM-570R pseudotyped, wild type NL4-3, Env-deficient pseudotyped (NL4-3 Δ Env), or VSV-G pseudotyped viruses for 4 h at 37°C (panel A). The cells were then washed, trypsinized and resuspended in a swelling buffer. The cells were next disrupted by Dounce homogenization and p24 levels were evaluated in each cellular fraction (i.e., cytosolic and vesicular). Data shown are representative of three independent experiments and are expressed as the means \pm S.D of the ratio of p24 present in the cytosol or vesicles over the sum of p24 present in the two fractions. In some studies, polarized JAR were either left untreated (mock) or exposed to VSV-G pseudotyped, SM-WT pseudotyped, SM-570R pseudotyped, or Env-deficient reporter viruses (NL4-3 Δ Env) for 48 h at 37°C (panel B). In some experiments, polarized JAR were either left uninfected (mock) or exposed to fully competent viruses (i.e., NL4-3 or JR-CSF) that were produced in PBMCs for 48 h at 37°C (panel C). Virus infection was performed either in the absence or presence of the fusion inhibitor T-20. Total cellular DNA was isolated and real-time PCR assays were conducted to quantify reverse transcribed and integrated HIV-1 specific DNA. Data shown are expressed as the means \pm S.D. of quadruplicate samples and are representative of three independent experiments.

Fig. 6. HIV-1 internalization in polarized trophoblasts is reduced by heparin and heparinase treatment. Polarized JAR cells were exposed to Ada-M pseudotyped (panel A), HXB-2 pseudotyped (panel B), or NL4-3 Δ Env viruses (panel E) for 1 h at 37°C in the absence or presence of increasing concentrations of heparin. In some experiments, polarized JAR cells were first pretreated with increasing doses of heparinase before exposure to Ada-M pseudotyped (panel C), HXB-2 pseudotyped (panel D), or NL4-3 Δ Env viruses (panel F) for 1 h at 37°C. Cells were finally washed and lysed and HIV-1 internalization was assessed by evaluating the amount of p24 in each cell lysate. In some experiments, JAR cell were pretreated with heparin and exposed to Env-deficient (NL4-3 Δ Env) reporter viruses and then stimulated with TNF- α (10 ng/ml) (panel G). Luciferase activity was monitored in each cell lysate. Values from the luminometer are expressed as the ratio of TNF- α stimulated-cells over unstimulated cells. Data shown are expressed as

the means \pm S.D. of quadruplicate samples and are representative of three independent experiments.

Table 1. Levels of β lam-Vpr-mediated CCF2/AM cleavage following infection with SM-570R and NL4-3 Δ Env viruses.

Virus	447/520 Ratio ^a			Change over ^b mock-infected cells (%)		
	Experiment no.			Experiment no.		
	1	2	3	1	2	3
Mock-infected	0.332	0.242	0.280	0	0	0
SM-570R	0.348	0.300	N.T.	4.60	19.33	N.T.
NL4-3 Δ Env	0.376	0.263	0.310	11.70	7.98	9.68

^aRatio of intensities at 447 and 520 nm.

^bThe change is the ratio of the infected cell population to the mock-infected.

N.T.: Not Tested

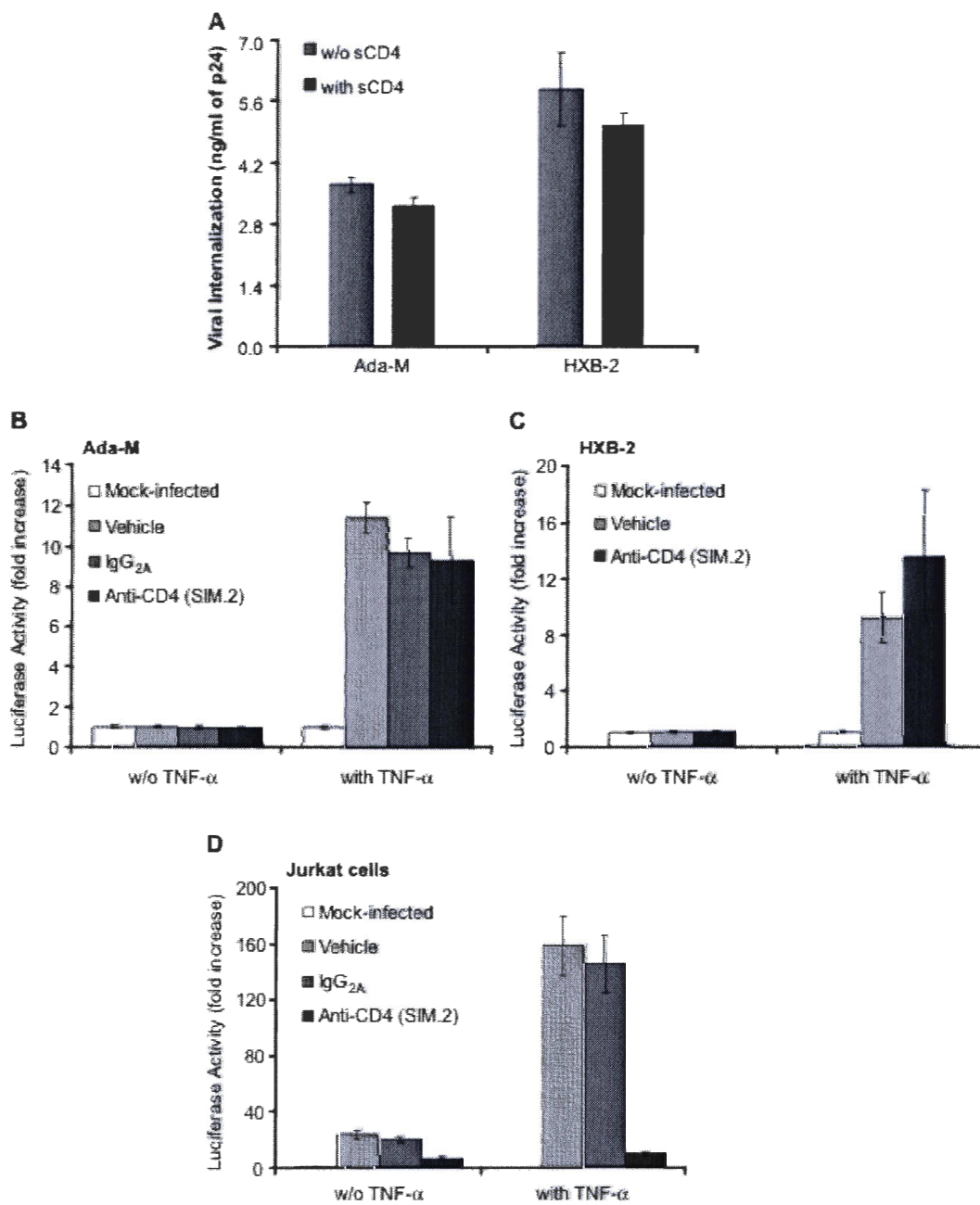


Figure no.1

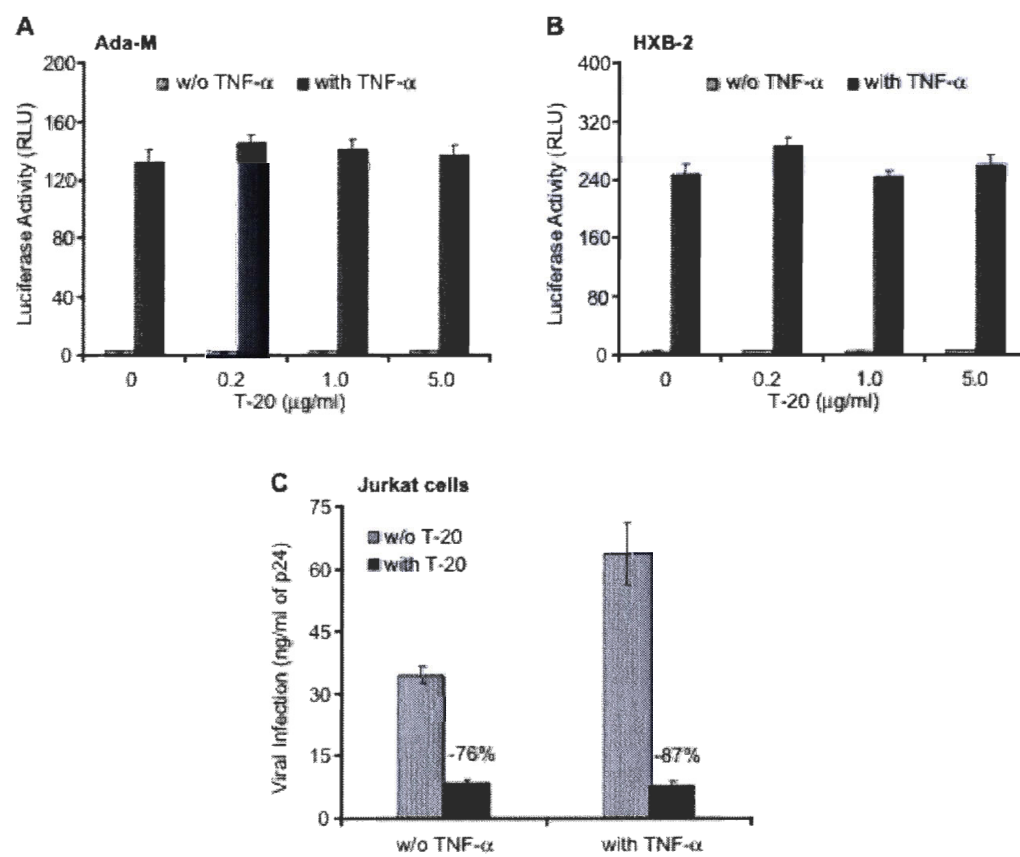


Figure no. 2

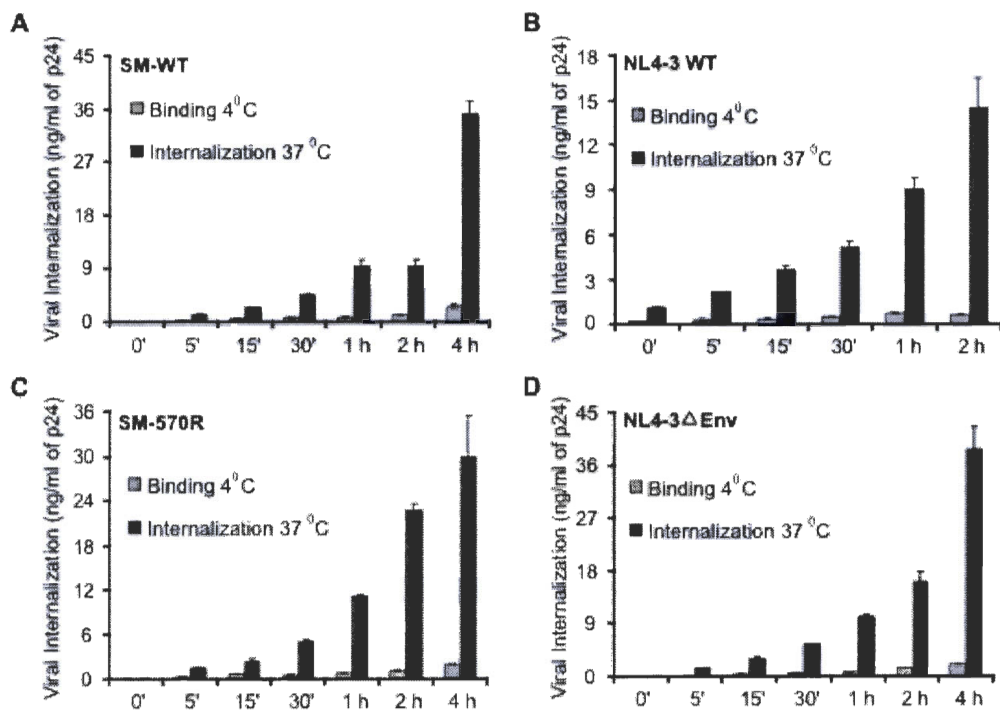


Figure no.3

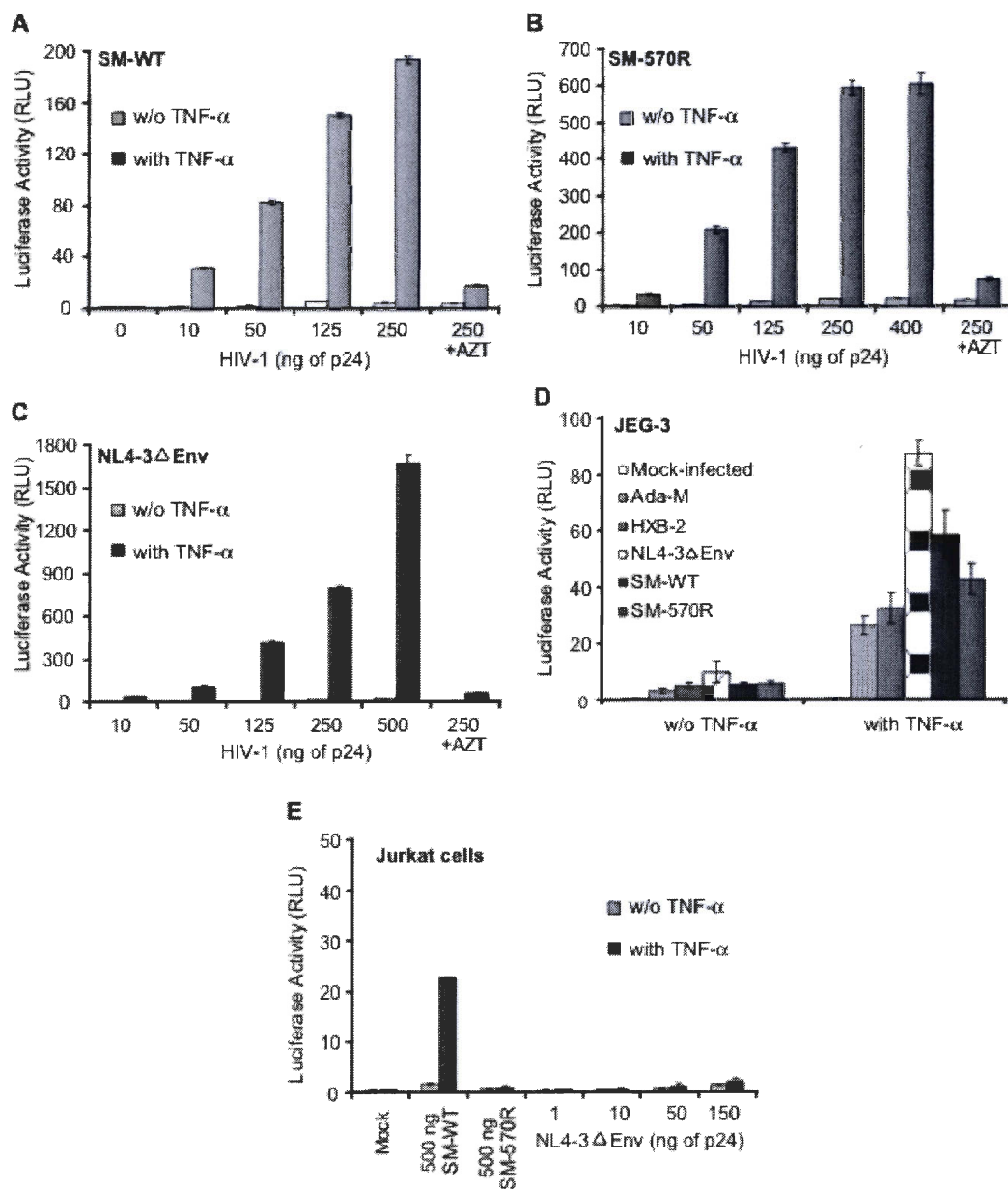


Figure no.4

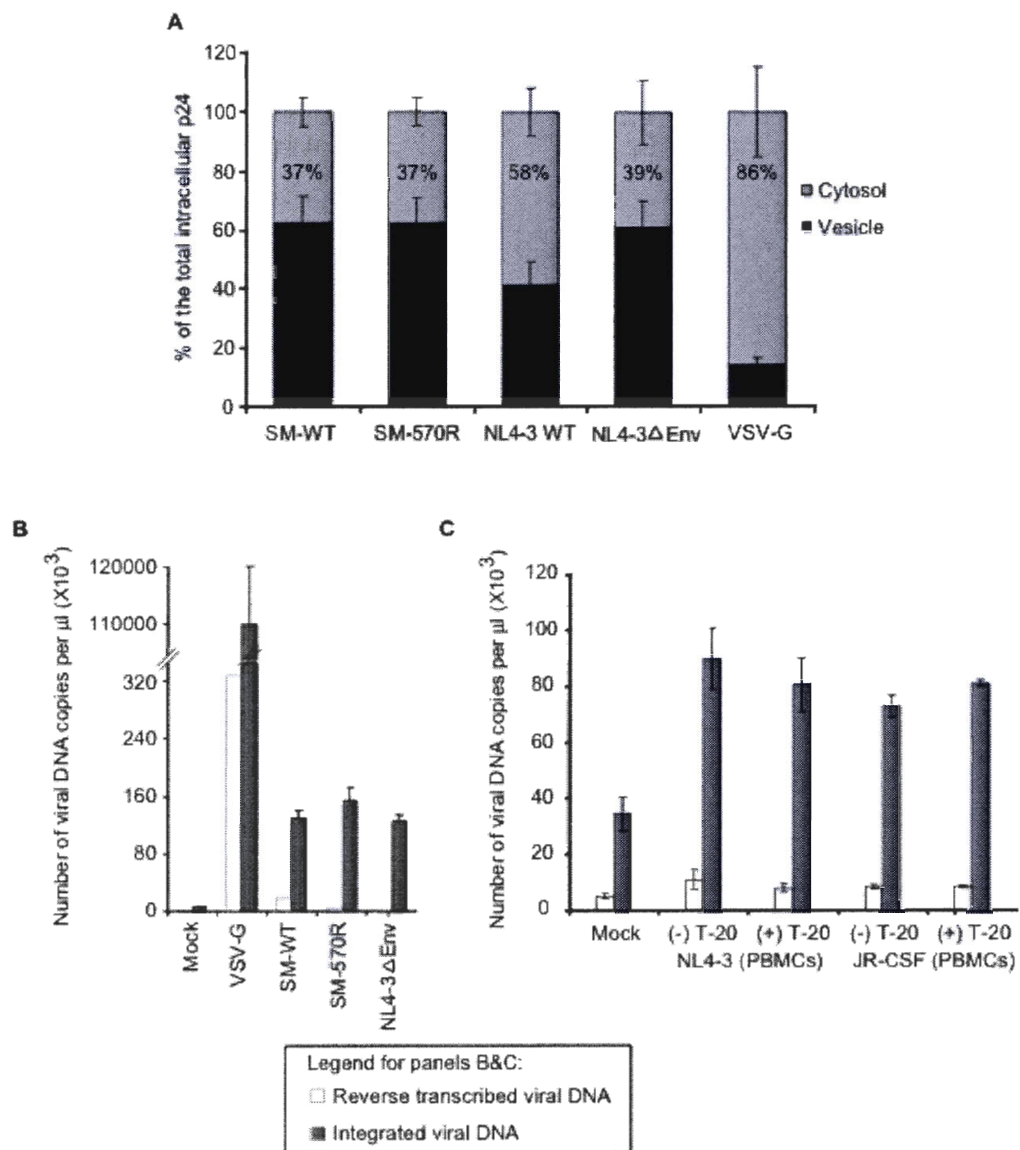


Figure no.5

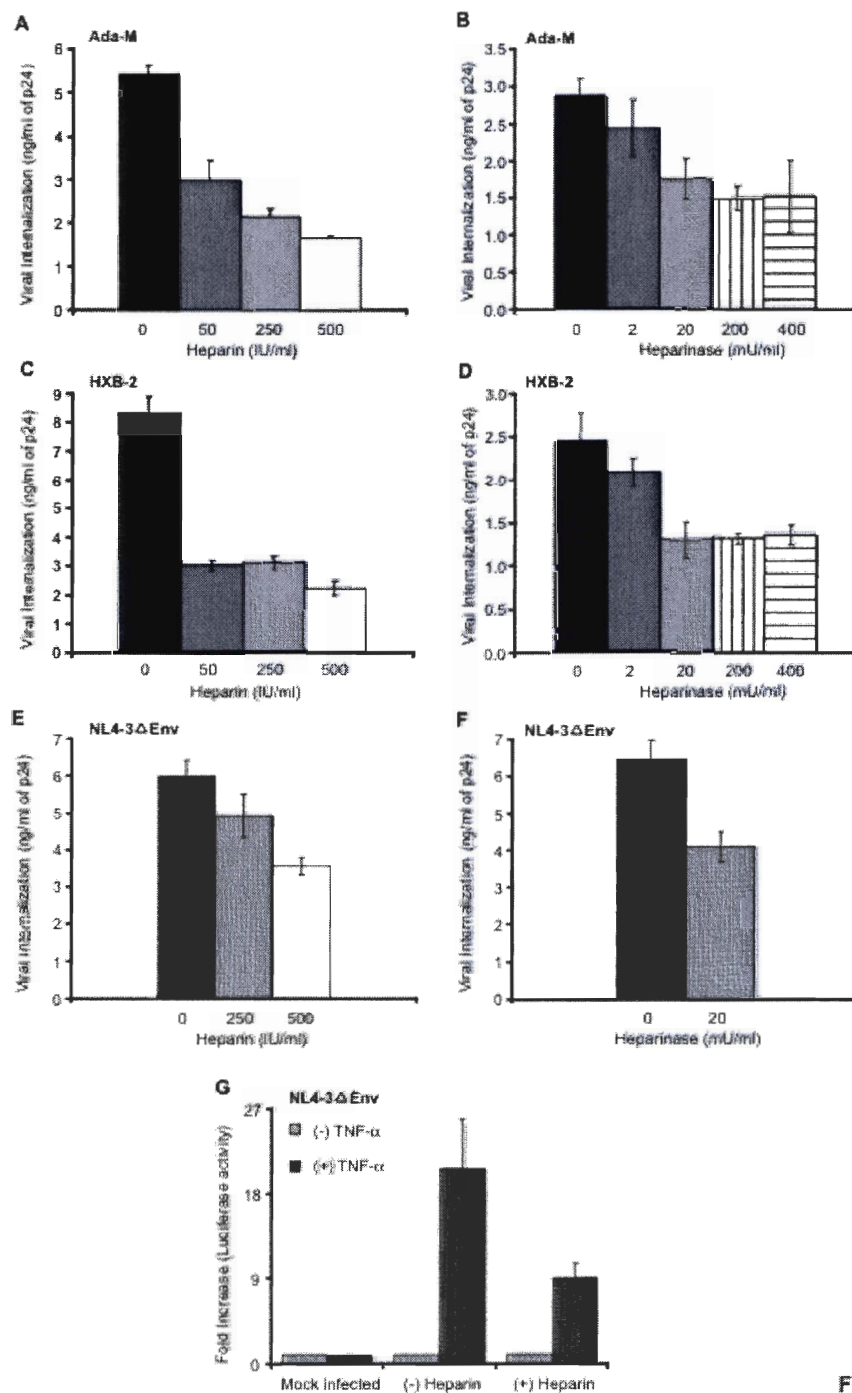


Figure no.6

Annexe 2 : Effets de l'hémozoïne sur l'infection des MDM humains par le VIH-1

Résumé :

Peu d'études ont analysé les mécanismes pathophysiologiques responsables de ce qui semble être une interaction synergique entre le *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), l'agent responsable de la malaria, et le VIH-1 chez les patients coinfectés. Des analyses approfondies des interactions potentielles entre *P. falciparum* et le VIH-1 dans les cellules primaires sont également manquantes. Il a été montré que les parasites *Plasmodium* détoxifient les molécules d'hème, qui sont générés par la dégradation de l'hémoglobine, en un pigment appelé hémozoïne (HZ). Quoiqu'il ait été initialement été pensé que l'HZ agissait comme un sous-produit inerte, des études récentes ont montré que les pigments de malaria modulent le système immunitaire. L'objectif primaire de cette étude était de déterminer si l'exposition de macrophages primaires humains dérivés de monocytes (MDMs) aux pigments de malaria influence le processus d'infection par le VIH-1. Nous montrons ici que la réplication du VIH-1 est significativement diminuée dans les MDMs ayant phagocyté de l'HZ. La réduction de la réplication du VIH-1 induite par l'HZ est causée par un blocage dans une étape du cycle viral entre la transcription inverse et l'intégration dans l'ADN chromosomique. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la coinfection entre *P. falciparum* et le VIH-1 est d'une haute importance étant donnée les possibles applications thérapeutiques.

Contribution :

Les expériences de la figure 4 ont été générés par Juliette Diou et analysés par microscopie confocale par Sonia Gauthier.

**Ingestion of the malaria pigment hemozoin renders human macrophages
less permissive to HIV-1 infection**

Juliette Diou¹, Sonia Gauthier¹, Mélanie R. Tardif¹, Rémi Fromentin¹,
Robert Lodge¹, David J. Sullivan Jr.², and Michel J. Tremblay^{1*}

¹ *Centre de Recherche en Infectiologie, Centre Hospitalier de l'Université Laval, and
Faculté de Médecine, Université Laval, Québec (Québec), Canada*

² *The Malaria Research Institute, Bloomberg School of Public Health, Johns Hopkins
University, Baltimore, Maryland, United States of America*

*Corresponding author, mailing address:

Laboratoire d'Immuno-Rétrovirologie Humaine

Centre de Recherche en Infectiologie, RC709

2705 Boul. Laurier, Québec (QC)

Canada, G1V 4G2.

Phone: 1 (418) 654-2705. Fax: 1 (418) 654-2212

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

Nonstandard abbreviations: hemozoin (HZ), synthetic hemozoin (sHZ), hemozoin isolated from *Plasmodium falciparum* cultures (PfHZ), human monocyte-derived macrophages (MDMs), murine heat-stable antigen (HSA), relative light units (RLU), reverse transcription complex (RTC).

Abstract

Very few studies have investigated the pathophysiologic mechanisms responsible for what seems to be a synergistic interaction between *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), the causative agent of malaria, and HIV-1 in dually infected patients. An in-depth analysis of potential interactions between *P. falciparum* and HIV-1 in primary human target cells is also lacking. It has been shown that *Plasmodium* parasites detoxify heme molecules, which are generated by hemoglobin degradation, into a pigment called hemozoin (HZ). Although it was initially thought that HZ acts as an inert waste byproduct, recent research has demonstrated that the malaria pigment modulates significantly the immune system. Therefore, the primary objective of this study was to determine whether exposure of primary human monocyte-derived macrophages (MDMs) to the malaria pigment influences the process of HIV-1 infection. We report here that HIV-1 replication is significantly diminished in Hz-loaded MDMs. The HZ-mediated reduction in virus replication is due to a block at a step in the virus life cycle occurring between the completion of full-length reverse transcripts and integration of viral DNA within the host chromosome. Understanding the pathological mechanisms involved in *P. falciparum* and HIV-1 co-infection is of high importance because of possible therapeutic ramifications.

Introduction

Malaria and acquired immune deficiency syndrome (AIDS) are responsible for major health problems in many regions of the world. By the end of 2007, an estimated 33.2 million people were living with human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1), of whom 2.5 million were newly infected (1). *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), the infectious agent of malaria, is thought to be responsible for 1.5-2.7 million deaths and 350-500 million acute illnesses annually (2, 3). Together, both infectious diseases cause more than 4 million deaths a year. To a substantial extent *P. falciparum* and HIV-1 infections are concentrated in the same geographical regions. The resulting co-infection and interactions between the two pathogens have major public health implications. Studies based on *P. falciparum* and HIV-1 co-infection, whether clinical or laboratory, have been inconclusive to fully understand the exact mechanisms by which those two microorganisms interact.

HIV-1 is a single-stranded RNA retrovirus which can infect a number of different target cells, including CD4-expressing macrophages and T-helper lymphocytes. The infection begins with the interaction of the virus-encoded external glycoprotein 120 (i.e. gp120) with cell surface CD4 molecule and chemokine co-receptor CCR5 or CXCR4. As the virus enters the cell, the conversion of the viral genomic RNA into double-stranded DNA is achieved by the virus-produced reverse transcriptase. Once reverse transcription has occurred, the pre-integration complex, promoted by HIV-1 DNA Flap formation, undergoes uncoating at the nuclear pore (4). Uncoating is an essential step in viral replication cycle and the exact mechanism(s) involved remains controversial to this day. Thereafter, the viral DNA migrates to and enters the host cell nucleus and becomes integrated into the cell DNA with the help of the integrase enzyme. The provirus can then remain latent or be active, generating new virions emerging from the host cell membrane.

At the end of the 20th century, malaria was diagnosed by the presence of a dark pigment in various organs of patients (5). Later, Brown began a long and continuing debate by suggesting that those pigments were involved in various physiopathological aspects of

malaria (6). The parasite multiplies by ingesting hemoglobin found in the host's cytosol. This process leads to hemoglobin degradation as a source of amino acids and the formation of free heme, which is a byproduct known to be highly toxic to the parasite. The principal and essential first step in detoxification of heme is its incorporation into an intracellular crystal called malarial pigment or hemozoin (HZ) (7). Results from *in vitro* and *in vivo* studies indicate that, after the parasite's schizont rupture in red blood cells, crude HZ and a variety of attached components of parasite and host origin (e.g. lipids and phospholipids, lipid derivatives and proteins) are avidly taken up by phagocytes (i.e. circulating neutrophils and monocytes and resident macrophages) (8, 9). Interestingly, it has been demonstrated that HZ can persist in macrophages of infected individuals for several months (7, 10, 11).

Blood-circulating monocytes when in tissues differentiate into macrophages and dendritic cells in response to danger stimuli (12). Due to their migratory behavior and their key functions in immune system responses, it is not surprising that cells of the monocyte-macrophage lineage are the preferential targets of both *P. falciparum* and HIV-1 infections (13, 14). Like with *P. falciparum*, macrophages have been described as being important in HIV-1 infection by contributing to the pathogenesis of the disease throughout the course of infection (15). Indeed, tissue macrophages can be infected with HIV-1 under both *in vitro* and *in vivo* conditions. Following infection with HIV-1, macrophages are resistant to the virus-mediated cytopathic effects and serve throughout the course of infection as long-term stable viral reservoirs capable of disseminating the virus to tissues.

Some of the diseases seen in the setting of *P. falciparum* and HIV-1 co-infection have been well described in a recent review paper (16). Although it is now appreciated that malaria and HIV-1 are causing bidirectional and synergistic infections, there is still a paucity of data with regard to the mechanism(s) by which each pathogen impacts the other. Therefore, given the overlapping geographic distribution of both diseases and the urgent need for basic research in this area, the aims of this study were articulated as follow: (1) investigating whether exposure to the purified malaria pigment HZ influences HIV-1 replication in

primary human macrophages and, if so, (2) understanding the mechanism(s) by which HZ can modulate virus infection.

Results

Chemical synthesis and phagocytosis of malaria pigments. Synthetic HZ, when prepared *in vitro* under acidic conditions, is spectroscopically identical and morphologically similar to the native HZ isolated directly from *P. falciparum* cultures (17). Moreover, both synthetic and native HZ undergo the same process when internalized by phagocytes (18-20). Consequently, most of our experiments were performed with synthetic HZ. Synthetic HZ (sHZ) was chemically produced in our laboratory as described in Materials and Methods. The quality of our newly produced sHZ was authenticated by measurement of nitric oxide levels following a brief exposure of the murine macrophage cell line J774 to sHZ as described previously (21, 22). Our sHZ preparations were found to be biologically active (data not shown).

The first set of experiments was aimed to evaluate the ability of primary human monocyte-derived macrophages (MDMs) to engulf sHZ. To this end, MDMs were exposed to sHZ and phagocytosis of the malaria pigment was monitored during 24 hours using a spinning disk confocal microscope. Acquisition was saved every four minutes and representative pictures (i.e. time-range from 0 to ~ 3 h) were chosen. As shown in Fig. 1, malaria pigments were phagocytosed efficiently by MDMs as a result of what seems to be filopodia extension (23). Phagocytosis was not only observed during the chosen time-range but also during the entire recording. For that reason, treatment of MDMs with sHZ was made 24 hours prior HIV-1 infection, unless otherwise specified. Furthermore, a single cell can phagocyte several crystals of malaria pigments, but the number of phagosomes containing sHZ was restricted (i.e. a maximum of 1 to 3 per individual cell).

sHZ inhibits HIV-1 infection in a dose-dependent manner regardless of the viral preparations. Next, we utilized sHZ to measure its putative impact on HIV-1 infection in MDMs (Fig. 2). First, MDMs were initially treated for 24 hours with different concentrations of sHZ (ranging from 0.1 to 25 $\mu\text{g/ml}$). Cells were then infected with four different R5-tropic HIV-1 virus preparations, i.e. fully infectious NL4-3Balenv and NL4-3Bal-HSA as well as single-cycle reporter virus (NL4-3Luc+Env-R+) pseudotyped

either with JR-FL envelope (NL4-3Luc+Env-R+/JR-FL) or single-cycle HIV-1 reporter virus pseudotyped with vesicular stomatitis virus G protein (VSV-G) envelope (NL4-3Luc+Env-R+/VSV-G). Unlike most of the previous reporter constructs, the NL4-3Bal-HSA molecular construct will lead to the production of fully competent viruses with no deletions in env, vpr, or nef. Moreover, NL4-3Bal-HSA virus codes for a cell surface reporter molecule, namely the murine heat-stable antigen (HSA) CD24 (24). Virus infection was estimated at 6 days post-infection for all virus stocks tested either by measuring the p24 content, luciferase activity, or percentage of HSA-expressing cells. Results from virus infection experiments revealed that HIV-1 infection of MDMs with NL4-3Balenv was inhibited in a dose-dependent fashion by sHZ (e.g. percentages of inhibition of 21 ± 4.1 at $0.1 \mu\text{g/ml}$, 29 ± 5.2 at $1 \mu\text{g/ml}$ and 46 ± 4.6 at $10 \mu\text{g/ml}$) (Fig. 2A). Infection of MDMs in the absence of sHZ led to a virus production of $115 \pm 24.5 \text{ ng/ml}$ of p24. Infection with HIV-1 reporter virus pseudotyped with JR-FL envelope was also reduced in a dose-dependent manner by sHZ (e.g. percentages of inhibition of 26 ± 2.7 at $0.1 \mu\text{g/ml}$, 45 ± 5.8 at $1 \mu\text{g/ml}$ and 85 ± 7.1 at $10 \mu\text{g/ml}$) (Fig. 2B). Luciferase activity detected in untreated control cells was equal to 64 ± 11.1 relative light units (RLU). Similar observations were made when we used reporter virus that can enter target cells through endocytosis and independently of CD4 and chemokine coreceptor (i.e. NL4-3Luc+Env-R+/VSV-G virus) (Fig. 2C). However, as expected, reporter gene activity detected in untreated and treated MDMs was more important than when infection was performed with JR-FL pseudotypes (e.g. $2,310 \pm 1,557$ RLU in untreated control cells). Again, a comparable sHZ-mediated reduction in virus production was seen when MDMs were inoculated with fully competent HIV-1 particles that can express, in addition to all virus proteins, the murine cell surface molecule HSA (Fig. 2D) (e.g. percentages of HAS-expressing cells were equal to 7.2 ± 1.3 in untreated control cells). Importantly, cell viability was not affected by the chosen concentrations of sHZ as monitored by the fluorescent cytotoxic MTS assay and annexin V/7AA-D test (data not shown).

The physiological significance of our findings was addressed by comparing side-by-side our sHZ preparation with natural HZ directly isolated from *P. falciparum* cultures (PfHZ). Details of the procedure for the isolation of natural malaria pigments isolation have already

been described previously (25). As illustrated in Fig. 3, infection of MDMs with single-cycle HIV-1 reporter virus pseudotyped with JR-FL envelope was inhibited at comparable significant levels in presence of sHZ and PfHZ (i.e. percentages of inhibition of 73 and 78, respectively). Given that isolation of malaria pigments from *P. falciparum* cultures is a complex and tedious process, the following series of investigations were carried out exclusively with sHZ.

sHZ-loaded MDMs are sensitive to HIV-1 infection. In view of the results shown above, we wanted to define whether the sHZ-dependent diminution of HIV-1 gene expression is only occurring in cells loaded with malaria pigments. Accordingly, we performed confocal microscopy analyses using MDMs pretreated for 24 hours with increasing concentrations of sHZ and then infected with fully competent HSA-encoding virus. Data from Fig. 4 demonstrated that the physical presence of sHZ in the cell does not prevent HIV-1 infection and virus gene expression. Indeed, through the use of classical confocal microscopy (upper panel) and confocal differential interference contrast microscopy (bottom panel), we were able to monitor at a single-cell level the frequency of sHZ-loaded MDMs and cells productively infected with HIV-1. Although it is clear that a single cell can harbor sHZ and allow HIV-1 production, virus gene expression was rarely seen in MDMs filled with high quantities of sHZ. Indeed, an in-depth analysis of several hundred cells indicated that when an estimated 75% of the cell's cytoplasm was filled with sHZ those MDMs were weakly infected or not at all (see bottom panel of the figure).

sHZ inhibits an early intracellular event in HIV-1 life cycle. In a previously published study aimed at studying HIV-1 dynamics in cells isolated from HIV-1-infected patients, the duration of the virus replicative cycle *in vivo* was evaluated at 1.2 days on average (26). Moreover, the average HIV-1 generation time from release of a virion until it infects another cell and causes the release of a new generation of viral particles was estimated to be 2.6 days (26). Consequently, to identify which step(s) in the virus life cycle is affected by the malaria pigment, MDMs were infected with NL4-3Luc+Env-R+/JR-FL virus and treated at different time points with two different concentrations of sHZ. When 5 µg/ml of sHZ was added at 0 and 4 hours post-infection, a significant decrease in virus-encoded

reporter gene activity was measured (i.e. percentages of inhibition of 48.2 % and 38.9 %, respectively) (Fig. 5). A similar diminution was seen when 10 $\mu\text{g/ml}$ of sHZ was added at 0, 4 and 24 hours post-infection (i.e. percentages of inhibition of 58.3, 45.8 and 38.7, respectively). Moreover, a more significant decrease in virus gene expression was detected when sHZ was added 24 hours before HIV-1 infection (i.e. percentages of inhibition of 70.6 with 5 $\mu\text{g/ml}$ and 79.4 with 10 $\mu\text{g/ml}$). Importantly, the addition of sHZ at 48 and 72 hours post-infection has no effect on HIV-1 expression, thus suggesting that malaria pigments are modulating an early event in the HIV-1 life cycle. Next, we attempted to identify more precisely how sHZ can limit HIV-1 replication in MDMs. We evaluated whether ingestion of sHZ could reduce entry of virions within the studied target cells. To this end, MDMs were infected for 1 hour either with fully infectious NL4-3Balenv or NL4-3Luc+Env-R+/JR-FL virus, trypsinized and extensively washed to remove uninternalized viral entities. Finally, MDMs were lysed and p24 concentrations were quantified. No significant changes in virus internalization were noted when MDMs were treated with two different concentrations of sHZ before HIV-1 infection (Fig. 6).

Knowing malaria pigments had no impact on HIV-1 entry, we then monitored HIV-1 reverse transcription by quantifying complete virus reverse transcripts at different time-points (i.e. at 0, 2, 4, 8, 24 and 48 hours post-infection) in MDMs pretreated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of sHZ. Results obtained by real-time PCR assays indicate that the number of full-length viral DNA copies is not reduced upon a pretreatment with sHZ (Fig. 7), therefore suggesting that the reverse transcription process is not a target of malaria pigments.

Thereafter, integrated viral DNA copies were estimated also by real-time PCR in MDMs pretreated with two different concentrations of sHZ and infected either with competent HIV-1 particles or reporter virus. Regardless to the viral stocks tested, HIV-1 integration was significantly inhibited by a pretreatment with sHZ (Fig. 8). For example, integrated proviral DNA copies were reduced by 39, 63 and 24% in sHZ-treated MDMs inoculated with NL4-3Balenv, NL4-3Bal-HSA and NL4-3Luc+Env-R+/JR-FL virus, respectively.

Discussion

Little is known about the possible impact of malaria pigments on HIV-1 replication in human primary cells known to harbor the virus under natural conditions. Indeed, most studies are clinical and relate to HZ and its influence on mother-to-child transmission of HIV-1 (27-29). We chose to focus our studies on malaria pigments because the presence of HZ in monocytes and neutrophils was described as a marker for disease severity (30). Furthermore, pigmented neutrophils were associated with cerebral malaria and death in children with severe malaria (31). Also, changes in the immune system make women particularly vulnerable to life threatening infections from malaria during pregnancy. In addition to the acute effects, malaria causes anemia in children and pregnant women and increases their vulnerability to other diseases. Repeated bouts of malarial fever in young children reduces their immunity and interferes with feeding, thus increasing their vulnerability to other diseases and death (32). Patients infected with *P. falciparum* will mount a proinflammatory cytokine response that may, in turn, influence their innate susceptibility to malaria infection, malaria-related morbidity, or death from malaria. Lastly, because of the morphological changes occurring in host cells after HZ phagocytosis, several studies have shown significant functional impairments in human cells caused by the malaria pigment (e.g. a defective generation of the oxidative burst, ability to repeat phagocytosis and protein kinase C activity) (7, 10, 11). As a result, the more important HIV-1 load observed in *Plasmodium*-infected individuals (33) may be the result of the incapacity of the immune system to appropriately control other microbial infections possibly due to HZ-mediated disorders of innate immune cells. As so, we were interested in studying the impact of malaria pigments on HIV-1 life cycle in human primary MDMs.

Because the majority of studies aimed at deciphering the possible HZ-modulated immune functional deficiencies were using transformed or immortalized cell lines, we firstly investigated whether co-infection results obtained with those cell lines were representative of results obtained with primary human cells such as MDMs. Preliminary studies showed an increase of HIV-1 infection in the human acute monocytic leukemia cell line, THP-1, upon a pretreatment with sHZ (data not shown). Surprisingly, when similar studies were

conducted with MDMs, sHZ was found to exert an opposite effect on HIV-1 replication. The explanation for this discrepancy is currently unknown and deserves to be more fully addressed. Nevertheless, primary human cells constitute a unique tool for researchers and should, when possible, be preferred over transformed or immortalized cell lines because they are more representative of the situation prevailing under *in vivo* conditions.

Here we confirm that MDMs rapidly ingest large amounts of sHZ and demonstrate for the first time that the malaria pigment causes a reduction in HIV-1 replication in this cell type. It has been demonstrated that the malaria pigment can induce a severe impairment of phagocytic cells functions. Therefore, we used a red-fluorescent dye to stain acidic compartments in live cells in order to appreciate interactions between sHZ and MDMs in an attempt to shed light on how sHZ can modulate virus replication. At a given point, fully functional cellular lysosomal compartments were interacting with sHZ-fed phagosomes but were incapable to induce its degradation (data not shown). Taken into account that last result and the possibility that the only presence of sHZ could preclude the uptake of HIV-1, we tested the ability of MDMs to phagocyte GFP-labeled zymosan particles. Again, no significant differences were noticed as compared to the untreated control cells (data not shown).

The entry process is the first critical step in the HIV-1 replicative cycle. It has been reported that HIV-1 is entering macrophages by endocytosis and viral receptor-mediated fusion (34, 35). Because of the massive uptake of sHZ in MDMs, we hypothesized that viral entry could be modulated in those cells explaining why the infection process is reduced. Unexpectedly, similar amount of viral particles was detected in both untreated and sHZ-loaded MDMs. With our approach we cannot discriminate between endocytosis-mediated versus fusion-mediated viral gateway. However, it is well known that endocytosis is mainly a dead-end for HIV-1 (36). Fusion at the plasma membrane remains the most efficient way used by HIV-1 to productively infect a given cell type. This process requires dynamic organization and high expression of CD4 and appropriate chemokine co-receptors (e.g. CCR5 or CXCR4). No variation in CD4 and CCR5 expression were detected in sHZ-treated MDMs compared to untreated control cells (data not shown).

Altogether, these data suggest that the reduction of viral infection observed in sHZ-loaded MDMs is not caused by a decrease in HIV-1 entry.

Following entry in the cytosol, incoming subviral complexes interact with the actin cytoskeleton and the microtubule network to reach the nuclear pore (37-39). Any factor interfering with the actin and/or the microtubule network may affect the transit of the reverse transcription complex (RTC) to the nucleus and consequently the completion of the virus replicative cycle. The impact of sHZ engulfment on actin and microtubule networks remains unknown. However, based on data reported by Moller and colleagues who showed that uptake of indigestible particles induces cellular stiffness, impairs phagocytic activity and delays intracellular transport in macrophages (40), it can be proposed that sHZ can interfere with the integrity of the cytoskeletal network. Although we cannot exclude that the intracellular transport is affected by the ingestion of sHZ, phagocytosis assays with opsonized-zymosan have clearly revealed that the ability of sHZ-fed MDMs to phagocytose these particles seems unaffected (data not shown). These results indicate that the cytoskeletal network remain functional in sHZ-loaded MDMs and can thus be used by HIV-1 to move toward the nucleus.

It is now accepted that reverse transcription (RT) is initiated within an integral capsid core during the transit toward the nucleus (4) and completed at the nuclear pore. Interestingly, it has been established that agents affecting cytoskeleton crystallization alter as well the RT process and viral infection (41). Accordingly, we investigated whether the ability of HIV-1 to complete RT was affected in sHZ-loaded MDMs compared to untreated control cells. Results from a sensitive RT-PCR test that can detect full-length reverse transcripts suggested that this event is not modulated by sHZ. However, when we have quantified the level of the integrated proviral DNA copies, we found that sHZ-loaded MDMs contain less proviral DNA inserted within the host chromosome than in untreated control cells. Therefore, sHZ is most likely impairing a step taking place between completion of the RT process and integration of viral genome into the host DNA. Events occurring between these two different steps include the formation of viral DNA Flap (42, 43) and a three-stranded DNA structure acting as a cis-determinant of the HIV-1 genome

nuclear import, which promotes uncoating at the nuclear pore and rapid translocation within the nucleus (4). It is possible that the stress generated by the engulfment of sHZ renders MDMs more refractory to virus infection by promoting degradation of the RTC and/or disturbing the uncoating and the nuclear import. It has been well recognized that some stressors exert a general control of the nuclear trafficking by affecting various components of the transport machinery (44). For example, heat shock and oxidative stress trigger nuclear accumulation of the importin- β in the nuclei of growing cells (44-46). Interestingly, it has been demonstrated that the HIV-1 RTC is translocated in the nucleus through a mechanism relying on the viral protein Vpr and the cellular importin- β in human macrophages (47-49). Considering that ingestion of malaria pigments induces oxidative stress in macrophages (50, 51), we hypothesized that it could explain why a treatment of MDMs with sHZ leads to a decrease in HIV-1 integration. Indeed, it is possible that the sHZ-mediated induction of oxidative stress causes a nuclear import block by anchoring the importin- β in the nucleus, a phenomenon preventing translocation of the HIV-1 genome and its subsequent integration in the host DNA genome. On the other hand, preliminary results have revealed that sHZ-loaded MDMs contain less intracellular ATP than untreated control cells (data not shown). Knowing that translocation of the HIV-1 pre-integration complex to the nucleus is an active transport process which requires ATP (52, 53), it can be postulated that ingestion of malaria pigments could inhibit HIV-1 infection also via an ATP-dependent pathway. Experiments are currently underway to address these scenarios.

Our observations that HIV-1 replication was reduced to the same extent when using similar concentrations of synthetic (i.e. sHZ) and native HZ (i.e. PfHZ) provide physiologic significance to this work. The clinical relevance of our results is further supported by the previous demonstration that, during infection, the amount of HZ following erythrocyte rupture can reach a concentration as high as 100 $\mu\text{g/ml}$ (54). Importantly, our findings were made using a maximal concentration of 25 $\mu\text{g/ml}$ of sHZ.

Although data from the most recent clinical and epidemiological studies suggest that malaria and HIV-1 infections act synergistically to increase parasite and viral load, we demonstrate here that the malaria-derived HZ molecule displays a negative impact on

HIV-1 replication in a cell type recognized as a major cellular reservoir for this retrovirus. It seems contradictory that a major constituent of *P. falciparum* would reduce virus gene expression when parasite proteins have been demonstrated to increase viral replication (55, 56). Our data are also opposite to that of the Perkins group who found that heme crystals increased viral load in simian monocytes first stimulated with TNF- α (57). The reason(s) for such a discrepancy probably stems from the fact that *P. falciparum* and HIV-1 interactions are multifaceted and complex. Moreover, emphasis should be made on the fact that the current work was centered on a single target of HIV-1 and ignored other cellular compartments known to play a key role in HIV-1 pathogenesis (e.g. CD4+ T cells and dendritic cells). *P. falciparum* displays a very complex life cycle and can cause dangerous complications in infected patients. Thus, understanding the relationships between *P. falciparum* and HIV-1 remain an important task.

In conclusion, we demonstrate that infection of primary human macrophages with four different HIV-1 constructs is significantly reduced by sHZ. This diminution is associated with a restriction at the level of integration of HIV-1 genome within host chromosome. Thus, it can be postulated that remnant HZ present in the reticuloendothelial cells after cure of malaria diseases or with chronic infection can diminish HIV-1 replication in tissue resident macrophages. Given that HIV-1 can reside within different cellular reservoirs, additional and more comprehensive basic studies are needed to fully understand the consequences of *P. falciparum*/HIV-1 interactions. This is vital to discover promising drug combinations and promote new prevention strategies to treat worldwide co-infected individuals.

Materials and Methods

Antibodies. The anti-HIV-1 p24 hybridomas 31-90-25 and 183-H12-5C were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and NIH AIDS Repository Reagent Program (Germantown, MD). Antibodies were purified by using MAbTrap protein affinity columns according to the manufacturer's instructions (Pharmacia Technology AB, Uppsala, Sweden). Alexa Fluor® 488 phalloidin (Molecular Probes, Eugene, OR) is a high-affinity probe for F-actin conjugated with green-fluorescent Alexa Fluor® 488 dye. The Vybrant® DiD cell-labeling solution (Molecular Probes) is a dye delivery solution that can be added directly to normal culture media to uniformly label suspended or attached culture cells for use in cell-cell fusion, cellular adhesion and migration applications. The rat M1/69 monoclonal antibody reacts with the mouse CD24 molecule (BD Pharmingen, Mississauga, ON), also known as Heat Stable Antigen (HSA). This antibody was used in combination with Alexa Fluor® 555 goat anti-rat IgG (Molecular Probes).

Cells. Human embryonic kidney 293T cells were obtained from the ATCC and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% foetal bovine serum. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors were isolated by Ficoll-Hypaque gradient and plated in 75 cm² flasks (1×10^7 cells/mL) for 2 hours in order to separate, by adherence to plastic, monocytes from the other non-adherent cells. After several washes with endotoxin-free phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON), monocytes were cultured in complete RPMI-1640 medium supplemented with 5% heat-inactivated autologous serum in the presence of M-CSF (100 ng/mL) for a minimum of six days. Finally, MDMs were recovered by scraping with a soft cell scraper following incubation with Accutase and plated in 48-well plates at a final concentration of 5×10^4 cells per well in complete RPMI-1640 medium supplemented with 5% autologous serum. Flow cytometry analyses revealed that the studied MDMs preparations were constituted mostly of CD14⁺ cells (i.e. ≥ 99 %) and very few contaminating CD3⁺ T cells (i.e. about 0.1 %) (data not shown).

Plasmids. The full-length R5-tropic infectious molecular clone of HIV-1 pNL4-3Balenv was generated by replacing the X4-tropic NL4-3 env gene with Bal strain (kindly provided by R. Pomerantz, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA) (58). The NL4-3Luc+Env-R⁺ vector produces envelope-deficient HIV-1 particles coding for the luciferase reporter gene. Single-cycle reporter viruses were pseudotyped with JR-FL and VSV-G envelope leading to NL4-3Luc+Env-R⁺/JR-FL and NL4-3Luc+Env-R⁺/VSV-G virus, respectively. The R5-tropic envelope-encoding JR-FLenv vector was kindly supplied by N. R. Landau (The Salk Institute for Biological Studies, San Diego, CA), whereas pHCMV-G was obtained from the AIDS Repository Reagent Program. The latter molecular construct codes for the broad host-range vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G (VSV-G) and is placed under the control of the human cytomegalovirus promoter. The pNLHSA-IRES molecular construct was obtained by replacing the eGFP gene in the NLENG1-IRES vector (NL4-3 backbone) (59) with the coding sequence for mouse HSA (24). Furthermore, the Bal envelope from the pNL4.3Balenv plasmid was inserted in the pNLHSA-IRES to produce fully infectious R5-using virus coding for cell surface murine HSA (a vector called NL4-3Bal-HSA).

sHZ preparation. Production of sHZ was achieved using a previously described methodology with slight modifications (22). Briefly, 90 mg of hemin chloride (Sigma-Aldrich) was solubilized in DMSO (crystallization solvent) and added to a 4 M acetate solution at pH 5.0. The suspension was stirred with a magnet for 6 hours at 65°C. After adding a volume of 10 % SDS, the suspension was centrifuged at 12,500 g for 25 minutes. The pellet was then sonicated twice at the lowest setting in a solution made of 100 mM sodium bicarbonate (pH 9.0) and 0.5% SDS and centrifuged again. The pellet was then washed three times in SDS 2%, at least five times in sterile H₂O and once in endotoxin-free PBS to eliminate residual SDS. The final pellet was resuspended in endotoxin-free PBS and aliquoted to obtain a solution of 652 µg/ml sHZ. Natural HZ directly isolated from *P. falciparum* cultures (PfHZ) was prepared using an established technique of serial washes in SDS, protease K digestion, 6 M urea washes and further SDS and water washes (20).

HZ quantitation. Total heme content of HZ was determined as described by Sullivan and co-workers (54). Parasite HZ or crystallized heme was incubated for 1 hour in 2% SDS / 20 mM NaOH to solublize crystal into monomeric heme, which has a molar extinction coefficient of 1×10^5 at 400 nm.

Virus production. Viruses were produced by the calcium phosphate co-precipitation method in 293T cells as described previously (60). Briefly, 293T cells were transfected with pNL4-3Balenv or NL4-3Bal-HSA to produce fully infectious R5-tropic HIV-1 particles. In addition, 293T cells were co-transfected with pNL4-3Luc+Env-R+ and pJR-FLenv or pHCMV-G to obtain pseudotyped HIV-1-based reporter viruses. 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 (61).

Measurements of HSA-expressing cells, luciferase activity and p24 content. Following infection of MDMs with NL4-3Bal-HSA virus, the percentage of HSA-expressing cells was estimated by flow cytometry. In brief, cells were stained either with an isotype-matched irrelevant control antibody (i.e. IgG1) or M1/69 followed by an Alexa Fluor® 555 goat anti-rat IgG antibody, washed and fixed with paraformaldehyde. Further on, all cells were resuspended in a solution of PBS and measurements were made with an Epics® XL FACS (Beckman Coulter; Fullerton, CA) (excitation, 490 nm; emission, 525 nm). Single stained cells were also used as controls for compensation adjustments. For MDMs infected with luciferase-encoding virus, reporter gene activity was monitored in cell lysates as previously described (62). Replication of NL4-3Balenv virus was assessed by quantifying the accumulation of p24 protein in cell-free supernatant recovered from infected MDMs and loaded on an ELISA plate to perform our in house sensitive double-antibody sandwich ELISA test (61).

Live cell microscopy. Images illustrated in Fig. 1 were obtained using time lapse imaging, performed on a WAVE/FX spinning disk confocal microscope (Quorum Technologies, Guelph, ON) equipped with a cell culture incubation chamber, a 60X glycerol objective and

using the appropriate lasers and emission filters for fluorescent sources or white light for differential interference contrast. Images were processed using Velocity Software (Improvision, Waltham, MA). Briefly, MDMs were plated in an eight chamber Lab-Tek™ slide (1x10⁵ cells per well). Prior to cell culture incubation in the spinning disk, cells were treated with the DiD cell-labeling solution (1:500 dilution) and left in the chamber for 2 hours to stabilize CO₂ and temperature levels. Later, sHZ (10 µg/ml) was added directly onto the cells. Recording was made during 24 hours. Digital images were processed with ImageJ (version 1.36b) and Velocity (version 4.2.1, Improvision). All the images were taken under similar experimental conditions (i.e. exposure time, 60 X magnification and intensification).

Confocal microscopy. MDMs were seeded on coverslips, exposed to sHZ for 24 hours and infected with NL4.3Bal-HSA virus for 7 days. The cells were then fixed with 2% paraformaldehyde and permeabilized using 0.1% Triton X-100. Nonspecific binding was blocked with 1% bovine serum albumin, 20% goat serum and 10% human serum in PBS. Cells were stained for actin cytoskeleton with Alexa Fluor 488® phalloidin and virus-infected cells were revealed with the rat anti-HSA monoclonal antibody used in combination with Alexa fluor 555®-conjugated anti-rat. After several washes, slides were mounted in SlowFade medium (Molecular Probes, Eugene, OR). Stained cells were visualized by confocal laser scanning microscopy (Fluoview FV300; Olympus, Melville, NY). Digital images were processed with Velocity (version 4.2.1, Improvision). All the images were taken under similar experimental conditions (i.e. exposure time, 60 X magnification and intensification).

Kinetics of HIV-1 infection. MDMs were infected with a fixed amount of virus (i.e. 5 ng of p24 per 5x10⁴ cells). In the case of infection with HIV-1 pseudotypes, viruses were left in the medium throughout the experiment while during infection with fully competent HIV-1 particles, half of the supernatant was collected and fresh medium was added every 3 days. In most studies, cells were treated with different concentrations of sHZ at 24 hours before infection. Concerning post-infection assay, MDMs were firstly infected with HIV-1 and then treated with sHZ at 0, 4, 24, 48, or 72 hours.

Virus entry assay. MDMs (5×10^4 cells) were first treated with different concentrations of sHZ for 24 hours and next incubated either with NL4-3Balenv or NL4-3Luc+Env-R+/JR-FL virus (5 ng of p24) for 60 min at 37°C. Cells were then washed once with PBS, treated with trypsin for 5 min at 37°C to remove all uninternalized virions, washed three times and then immediately lysed in ice-cold lysis buffer (20 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM sodium chloride, and 0.5% Triton X 100). Finally, the p24 contents were evaluated by ELISA.

Real-time PCR. For detection and quantification of full-length reverse transcripts and integrated viral DNA copies, genomic DNA from a total of 1×10^6 MDMs either left unexposed or treated for 24 hours with Hz (10 µg/ml) and infected for up to 48 hours with different virus preparations (i.e. NL4-3Balenv, NL4-3Bal-HSA, or NL4-3Luc+Env-R+/JR-FL) was extracted using the DNeasy Blood & Tissue Kit from QIAGEN (Mississauga, ON).

Quantification of full length reverse transcripts was achieved by subjecting 25 ng of DNA to a real-time PCR test in 25 µL reaction containing 2 X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 1 µM of the HIV-1-specific sense primer M667, 1 µM of the HIV-1-specific antisense primer M661, and 0.3 µM of the TaqMan probe HIV-5'-carboxyfluorescein (Biosearch Technologies, Novato, CA) (63). HIV-1 standards consisted of 25 ng of DNA from uninfected cells.

Monitoring integrated viral DNA copies. DNA was quantified and subjected to a combined Alu-HIV-1 PCR and real-time PCR as described by Suzuki and co-workers (64). Briefly, genomic DNA (100 ng) from MDMs either left untreated or treated with sHZ (5 and 10 µg/ml) and infected for 48 hours with different HIV-1 stocks (i.e. NL4-3Balenv, NL4-3Bal-HSA, or NL4-3Luc+Env-R+/JR-FL) was first amplified with an Alu-sequence-specific sense primer (65) and HIV-1-specific antisense primer (i.e. M661). Next, 5 µL of 25-fold diluted PCR products were subjected to a real-time PCR assay in 25 µL reaction containing 2 X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 µM of the HIV-1-specific sense primer M667, 2 µM of the HIV-1-specific antisense

primer AA55, and 0.3 μ M of the TaqMan probe HIV-5'-carboxyfluorescein (Biosearch Technologies) (64). The cycling conditions used for the Applied Biosystems 7500 sequence detection system included a hot start (50°C for 2 min and 95°C for 10 min), followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 1 min) and extension (63°C for 1 min) with end point acquisition. NL4-3Balenv DNA was used for the standard curve (i.e. from 469 to 30,000 copies). All HIV-1 standards contained 1 ng of DNA from uninfected cells as carrier.

Statistical analysis. Results presented are expressed as means \pm standard error of the mean (SEM) of at least triplicate samples. All of the experiments were repeated at least two times and each figure combines the results obtained with all the different donors. Because there might be some donor-to-donor variations, most figures are expressed as percentages of inhibition calculated with Prism version 3.03. Statistical significance between groups was determined by analysis of variance. Calculations were made with Prism version 3.03. P values < 0.05 were considered statistically significant. The statistical significance of the results was defined by performing a one-way analysis of variance with Dunnett's post tests to compare treated and untreated control samples. In some cases, t tests analysis were made on raw data.

Acknowledgments

The authors appreciate the excellent technical contribution of Odette Simard, Caroline Côté and Marc-André Roy. We express our gratitude to Caroline Gilbert for critical and constructive comments for this study.

J.D. holds a Doctoral Award from the CIHR HIV/AIDS research program and M.J.T. holds the Canada Research Chair in Human Immuno-Retrovirology (Tier 1 level).

The authors have no conflicting financial interests.

References

1. WHO. 2007. Global HIV prevalence has levelled off.
2. Breman, J.G. 2001. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. *Am J Trop Med Hyg* 64:1-11.
3. WHO. 2002. World Malaria report 2005.
4. Arhel, N.J., S. Souquere-Besse, S. Munier, P. Souque, S. Guadagnini, S. Rutherford, M.C. Prevost, T.D. Allen, and P. Charneau. 2007. HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *Embo J* 26:3025-3037.
5. Hempelmann, E. 2007. Hemozoin biocrystallization in *Plasmodium falciparum* and the antimalarial activity of crystallization inhibitors. *Parasitol Res* 100:671-676.
6. Brown, W. 1911. Malarial pigment (so-called melanin): its nature and mode of production. *The Journal of Experimental Medicine* 13:290-300.
7. Pisciotta, J.M., and D. Sullivan. 2008. Hemozoin: oil versus water. *Parasitol Int* 57:89-96.
8. Coban, C., K.J. Ishii, D.J. Sullivan, and N. Kumar. 2002. Purified malaria pigment (hemozoin) enhances dendritic cell maturation and modulates the isotype of antibodies induced by a DNA vaccine. *Infect Immun* 70:3939-3943.
9. Arese, P., and E. Schwarzzer. 1997. Malarial pigment (haemozoin): a very active 'inert' substance. *Ann Trop Med Parasitol* 91:501-516.
10. Millington, O.R., V.B. Gibson, C.M. Rush, B.H. Zinselmeyer, R.S. Phillips, P. Garside, and J.M. Brewer. 2007. Malaria impairs T cell clustering and immune priming despite normal signal 1 from dendritic cells. *PLoS Pathog* 3:1380-1387.
11. Schwarzzer, E., M. Alessio, D. Ulliers, and P. Arese. 1998. Phagocytosis of the malarial pigment, hemozoin, impairs expression of major histocompatibility complex class II antigen, CD54, and CD11c in human monocytes. *Infect Immun* 66:1601-1606.
12. Mantovani, A., A. Sica, and M. Locati. 2005. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23:344-346.

13. Arfi, V., L. Riviere, L. Jarrosson-Wuilleme, C. Goujon, D. Rigal, J.L. Darlix, and A. Cimarelli. 2008. Characterization of the early steps of infection of primary blood monocytes by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 82:6557-6565.
14. McGilvray, I.D., L. Serghides, A. Kapus, O.D. Rotstein, and K.C. Kain. 2000. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. *Blood* 96:3231-3240.
15. Kedzierska, K., and S.M. Crowe. 2002. The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr Med Chem* 9:1893-1903.
16. Skinner-Adams, T.S., J.S. McCarthy, D.L. Gardiner, and K.T. Andrews. 2008. HIV and malaria co-infection: interactions and consequences of chemotherapy. *Trends Parasitol* 24:264-271.
17. Taramelli, D., D. Monti, F. Omodeo-Sale, N. Basilico, S. Parapini, E. Pasini, L. Lombardi, and O. Olliaro. 2001. Ultrastructural characteristics, biological activity and pharmacological relevance of synthetic malaria pigment (beta-haematin). *Parassitologia* 43 Suppl 1:45-49.
18. Olliaro, P., L. Lombardi, S. Frigerio, N. Basilico, D. Taramelli, and D. Monti. 2000. Phagocytosis of hemozoin (native and synthetic malaria pigment), and *Plasmodium falciparum* intraerythrocyte-stage parasites by human and mouse phagocytes. *Ultrastruct Pathol* 24:9-13.
19. Pagola, S., P.W. Stephens, D.S. Bohle, A.D. Kosar, and S.K. Madsen. 2000. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature* 404:307-310.
20. Noland, G.S., N. Briones, and D.J. Sullivan, Jr. 2003. The shape and size of hemozoin crystals distinguishes diverse *Plasmodium* species. *Mol Biochem Parasitol* 130:91-99.
21. Bergeron, M., and M. Olivier. 2006. Trypanosoma cruzi-mediated IFN-gamma-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability. *J Immunol* 177:6271-6280.
22. Jaramillo, M., D.C. Gowda, D. Radzioch, and M. Olivier. 2003. Hemozoin increases IFN-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation through

- extracellular signal-regulated kinase- and NF-kappa B-dependent pathways. *J Immunol* 171:4243-4253.
23. Kress, H., E.H. Stelzer, D. Holzer, F. Buss, G. Griffiths, and A. Rohrbach. 2007. Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:11633-11638.
 24. Barat, C., C. Gilbert, M. Imbeault, and M.J. Tremblay. 2008. Extracellular ATP reduces HIV-1 transfer from immature dendritic cells to CD4+ T lymphocytes. *Retrovirology* 5:30.
 25. Pisciotta, J.M., I. Coppens, A.K. Tripathi, P.F. Scholl, J. Shuman, S. Bajad, V. Shulaev, and D.J. Sullivan, Jr. 2007. The role of neutral lipid nanospheres in *Plasmodium falciparum* haem crystallization. *Biochem J* 402:197-204.
 26. Perelson, A.S., A.U. Neumann, M. Markowitz, J.M. Leonard, and D.D. Ho. 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 271:1582-1586.
 27. Moore, J.M., S. Chaisavaneeyakorn, D.J. Perkins, C. Othoro, J. Otieno, B.L. Nahlen, Y.P. Shi, and V. Udhayakumar. 2004. Hemozoin differentially regulates proinflammatory cytokine production in human immunodeficiency virus-seropositive and -seronegative women with placental malaria. *Infect Immun* 72:7022-7029.
 28. Chaisavaneeyakorn, S., J.M. Moore, L. Mirel, C. Othoro, J. Otieno, S.C. Chaiyaroj, Y.P. Shi, B.L. Nahlen, A.A. Lal, and V. Udhayakumar. 2003. Levels of macrophage inflammatory protein 1 alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta in intervillous blood plasma samples from women with placental malaria and human immunodeficiency virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:631-636.
 29. Moormann, A.M., A.D. Sullivan, R.A. Rochford, S.W. Chensue, P.J. Bock, T. Nyirenda, and S.R. Meshnick. 1999. Malaria and pregnancy: placental cytokine expression and its relationship to intrauterine growth retardation. *J Infect Dis* 180:1987-1993.
 30. Huy, N.T., D.T. Trang, T. Kariu, M. Sasai, K. Saida, S. Harada, and K. Kamei. 2006. Leukocyte activation by malarial pigment. *Parasitol Int* 55:75-81.

31. Lyke, K.E., D.A. Diallo, A. Dicko, A. Kone, D. Coulibaly, A. Guindo, Y. Cissoko, L. Sangare, S. Coulibaly, B. Dakouo, T.E. Taylor, O.K. Doumbo, and C.V. Plowe. 2003. Association of intraleukocytic *Plasmodium falciparum* malaria pigment with disease severity, clinical manifestations, and prognosis in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg* 69:253-259.
32. IDRC. 1996. Malaria: A deadly disease. International Development Research Centre report
33. Kublin, J.G., P. Patnaik, C.S. Jere, W.C. Miller, I.F. Hoffman, N. Chimbiya, R. Pendame, T.E. Taylor, and M.E. Molyneux. 2005. Effect of *Plasmodium falciparum* malaria on concentration of HIV-1-RNA in the blood of adults in rural Malawi: a prospective cohort study. *Lancet* 365:233-240.
34. Marechal, V., M.C. Prevost, C. Petit, E. Perret, J.M. Heard, and O. Schwartz. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *J Virol* 75:11166-11177.
35. Yi, Y., L. Loftin, L. Wang, S.J. Ratcliffe, J. Isaacman-Beck, and R.G. Collman. 2008. Entry coreceptor use and fusion inhibitor T20 sensitivity of dual-tropic R5X4 HIV-1 in primary macrophage infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 47:285-292.
36. Daecke, J., O.T. Fackler, M.T. Dittmar, and H.G. Krausslich. 2005. Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol* 79:1581-1594.
37. Campbell, E.M., R. Nunez, and T.J. Hope. 2004. Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity. *J Virol* 78:5745-5755.
38. McDonald, D., M.A. Vodicka, G. Lucero, T.M. Svitkina, G.G. Borisy, M. Emerman, and T.J. Hope. 2002. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* 159:441-452.
39. Arhel, N., A. Genovesio, K.A. Kim, S. Miko, E. Perret, J.C. Olivo-Marin, S. Shorte, and P. Charneau. 2006. Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes. *Nat Methods* 3:817-824.

40. Moller, W., T. Hofer, A. Ziesenis, E. Karg, and J. Heyder. 2002. Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* 182:197-207.
41. Bukrinskaya, A., B. Brichacek, A. Mann, and M. Stevenson. 1998. Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *J Exp Med* 188:2113-2125.
42. Hameau, L., J. Jeusset, S. Lafosse, D. Coulaud, E. Delain, T. Unge, T. Restle, E. Le Cam, and G. Mirambeau. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 central DNA flap: dynamic terminal product of plus-strand displacement dna synthesis catalyzed by reverse transcriptase assisted by nucleocapsid protein. *J Virol* 75:3301-3313.
43. Arhel, N., S. Munier, P. Souque, K. Mollier, and P. Charneau. 2006. Nuclear import defect of human immunodeficiency virus type 1 DNA flap mutants is not dependent on the viral strain or target cell type. *J Virol* 80:10262-10269.
44. Kodiha, M., P. Banski, D. Ho-Wo-Cheong, and U. Stochaj. 2008. Dissection of the molecular mechanisms that control the nuclear accumulation of transport factors importin-alpha and CAS in stressed cells. *Cell Mol Life Sci* 65:1756-1767.
45. Miyamoto, Y., T. Saiwaki, J. Yamashita, Y. Yasuda, I. Kotera, S. Shibata, M. Shigeta, Y. Hiraoka, T. Haraguchi, and Y. Yoneda. 2004. Cellular stresses induce the nuclear accumulation of importin alpha and cause a conventional nuclear import block. *J Cell Biol* 165:617-623.
46. Kodiha, M., D. Tran, C. Qian, A. Morogan, J.F. Presley, C.M. Brown, and U. Stochaj. 2008. Oxidative stress mislocalizes and retains transport factor importin-alpha and nucleoporins Nup153 and Nup88 in nuclei where they generate high molecular mass complexes. *Biochim Biophys Acta* 1783:405-418.
47. Vodicka, M.A., D.M. Koepp, P.A. Silver, and M. Emerman. 1998. HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection. *Genes Dev* 12:175-185.
48. Kamata, M., Y. Nitahara-Kasahara, Y. Miyamoto, Y. Yoneda, and Y. Aida. 2005. Importin-alpha promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 79:3557-3564.

49. Nitahara-Kasahara, Y., M. Kamata, T. Yamamoto, X. Zhang, Y. Miyamoto, K. Muneta, S. Iijima, Y. Yoneda, Y. Tsunetsugu-Yokota, and Y. Aida. 2007. Novel nuclear import of Vpr promoted by importin alpha is crucial for human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages. *J Virol* 81:5284-5293.
50. Schwarzer, E., F. Turrini, D. Ulliers, G. Giribaldi, H. Ginsburg, and P. Arese. 1992. Impairment of macrophage functions after ingestion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes or isolated malarial pigment. *J Exp Med* 176:1033-1041.
51. Taramelli, D., S. Recalcati, N. Basilico, P. Olliaro, and G. Cairo. 2000. Macrophage preconditioning with synthetic malaria pigment reduces cytokine production via heme iron-dependent oxidative stress. *Lab Invest* 80:1781-1788.
52. Bukrinsky, M.I., N. Sharova, T.L. McDonald, T. Pushkarskaya, W.G. Tarpley, and M. Stevenson. 1993. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6125-6129.
53. Bukrinsky, M.I., N. Sharova, M.P. Dempsey, T.L. Stanwick, A.G. Bukrinskaya, S. Haggerty, and M. Stevenson. 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6580-6584.
54. Sullivan, D.J., Jr., I.Y. Gluzman, D.G. Russell, and D.E. Goldberg. 1996. On the molecular mechanism of chloroquine's antimalarial action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11865-11870.
55. Ayouba, A., C. Badaut, A. Kfutwah, C. Cannou, A. Juillerat, S. Gangnard, C. Behr, O. Mercereau-Puijalon, G.A. Bentley, F. Barre-Sinoussi, and E. Menu. 2008. Specific stimulation of HIV-1 replication in human placental trophoblasts by an antigen of *Plasmodium falciparum*. *Aids* 22:785-787.
56. Froebel, K., W. Howard, J.R. Schafer, F. Howie, J. Whitworth, P. Kaleebu, A.L. Brown, and E. Riley. 2004. Activation by malaria antigens renders mononuclear cells susceptible to HIV infection and re-activates replication of endogenous HIV in cells from HIV-infected adults. *Parasite Immunol* 26:213-217.
57. Nti, B.K., J.L. Slingluff, C.C. Keller, J.B. Hittner, J.M. Ong'echa, M. Murphey-Corb, and D.J. Perkins. 2005. Stage-specific effects of *Plasmodium falciparum*-

- derived hemozoin on blood mononuclear cell TNF- α regulation and viral replication. *Aids* 19:1771-1780.
58. Dornadula, G., H. Zhang, S. Shetty, and R.J. Pomerantz. 1999. HIV-1 virions produced from replicating peripheral blood lymphocytes are more infectious than those from nonproliferating macrophages due to higher levels of intravirion reverse transcripts: implications for pathogenesis and transmission. *Virology* 253:10-16.
 59. Levy, D.N., G.M. Aldrovandi, O. Kutsch, and G.M. Shaw. 2004. Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4204-4209.
 60. Fortin, J.F., R. Cantin, G. Lamontagne, and M. Tremblay. 1997. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* 71:3588-3596.
 61. Bounou, S., J.E. Leclerc, and M.J. Tremblay. 2002. Presence of host ICAM-1 in laboratory and clinical strains of human immunodeficiency virus type 1 increases virus infectivity and CD4(+)-T-cell depletion in human lymphoid tissue, a major site of replication in vivo. *J Virol* 76:1004-1014.
 62. Ouellet, M., J. Roy, B. Barbeau, R. Geleziunas, and M.J. Tremblay. 2003. NF- κ B induction by bisperoxovanadium compounds requires CD45, p36(LAT), PKC, and IKK activity and exhibits kinetics of activation comparable to those of TCR/CD28 coengagement. *Biochemistry* 42:8260-8271.
 63. Zack, J.A., S.J. Arrigo, S.R. Weitsman, A.S. Go, A. Haislip, and I.S. Chen. 1990. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 61:213-222.
 64. Suzuki, Y., N. Misawa, C. Sato, H. Ebina, T. Masuda, N. Yamamoto, and Y. Koyanagi. 2003. Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1 DNA dynamics by real-time PCR: integration efficiency in stimulated and unstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virus Genes* 27:177-188.
 65. Chun, T.W., L. Stuyver, S.B. Mizell, L.A. Ehler, J.A. Mican, M. Baseler, A.L. Lloyd, M.A. Nowak, and A.S. Fauci. 1997. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13193-13197.

Figure legends

Figure 1. Phagocytosis of sHZ by MDMs. Cells were first plated at a concentration of 1×10^5 cells per well and treated next with DiD cell-labelling solution. Thereafter, MDMs were exposed to sHZ (10 $\mu\text{g/ml}$). Images were obtained using time lapse imaging, performed on a WAVE/FX spinning disk confocal microscope. Similar experimental conditions were maintained for all images throughout a 24 hours recording (i.e. exposure time every 4 minutes, 60 X magnification and intensification levels). Representative images of sHZ phagocytosis by MDMs selected here illustrate the fluorescence imaging of stained cells (**A**) and the differential interference contrast images of unstained cells (**B**). Digital images were processed with ImageJ (version 1.36b) and Velocity (version 4.2.1, Improvion).

Figure 2. sHZ inhibits HIV-1 replication in MDMs in a dose-dependent manner. MDMs were either left untreated (ctrl) or treated with increasing concentrations of sHZ (0.1 to 25 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours. Next, cells were infected for 6 days with fully infectious virus (i.e. NL4-3Balenv) (**A**), single-cycle HIV-1 reporter virus pseudotyped either with JR-FL (**B**) or VSV-G envelope (**C**) and fully competent virus coding for the cell surface reporter murine HSA molecule (**D**). The extent of virus infection was measured by estimating p24 contents (A), luciferase activity (B and C), or percentage of HSA-positive cells by flow cytometry (D). Data shown correspond to percentages of inhibition of HIV-1 infection. Those results were calculated by comparing MDMs which have been treated with sHZ and later infected versus untreated MDMs only infected with HIV-1. Results are mean \pm SEM of data from triplicate samples of several independent experiments (i.e. 2, 5, 6 and 4 respectively to the illustrated order). Statistical analysis was performed on the results from all experiments. Asterisks denote statistically significant data (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

Figure 3. HIV-1 replication is similarly reduced by sHZ and PfHZ. MDMs were either left untreated (ctrl) or treated with sHZ and PfHZ (10 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours. Thereafter, cells were infected for 6 days with single-cycle HIV-1 reporter virus pseudotyped with JR-FL envelope. Finally, luciferase activity was measured using a luminometer and converted in

percentages of inhibition as described in Fig. 2. Statistical analysis was performed on the results. Asterisks denote statistically significant data (**, $P < 0.01$).

Figure 4. HIV-1 replication can occur in sHZ-loaded MDMs. Cells were either left untreated (0) or treated with increasing concentrations of sHZ (1 to 25 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours. Thereafter, cells were infected for 6 days with fully infectious reporter virus coding for murine HSA. Finally, cells were mounted and processed for confocal microscopy analysis. MDMs were stained with Alexa Fluor 488-labelled phalloidin to reveal the F-actin cytoskeleton (red) and a conjugated antibody specific for HSA to reveal HIV-1-infected cells (green). Red arrows on the bottom panel illustrate example of cells with at least 75% of sHZ accumulation in their cytoplasm. Micrographs are representative of 3 independent donors.

Figure 5. sHZ inhibits an early event in HIV-1 life cycle. MDMs were infected for 6 days with single-cycle HIV-1 reporter virus pseudotyped with JR-FL envelope. Next, cells were either left untreated (ctrl) or treated with the indicated concentrations of sHZ at different time points after (i.e. 0, 4, 24, 48 and 72 hours) and 24 hours before HIV-1 infection (PRE). Luciferase activity was measured using a luminometer. Virus infection is illustrated in percentages of inhibition as described in Fig. 2. Results are mean \pm SEM of data from triplicate samples of four independent experiments. Statistical analysis was performed on the results from all experiments. Asterisks denote statistically significant data (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

Figure 6. Virus entry is not affected by sHZ. MDMs were either left untreated (ctrl) or treated with sHZ (i.e. 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hours. Next, cells were incubated for 1 hour at 37°C with fully competent NL4-3Balenv (A) and single-cycle HIV-1 reporter virus pseudotyped with JR-FL envelope (B). The virus-cell mixture was extensively washed and treated with trypsin (5 min at 37°C), washed again, and finally lysed. The viral content was measured using the p24 assay. In some instance, MDMs were put in contact with HIV-1 for less than a minute (called mock). Results are mean \pm SEM of data from triplicate samples of five independent experiments. Statistical analysis was performed on the results from all

experiments and no significant variations were measured.

Figure 7. sHZ has no impact on HIV-1 reverse transcription. MDMs were either left untreated (ctrl) or treated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of sHZ for 24 hours. Thereafter, cells were maintained in absence of HIV-1 (mock) or infected for the indicated time periods (i.e. 0, 2, 4, 8, 24 and 48 hours) with fully competent NL4-3Balenv. Finally, for each specific time point, genomic DNA was extracted to quantify full-length HIV-1 reverse transcripts. Results are mean \pm SEM of data from duplicate samples of three independent experiments (from A to C). Statistical analysis was performed on the results from all experiments and no significant variations were measured.

Figure 8. sHZ is affecting viral integration in MDMs. MDMs were either left untreated (ctrl) or treated with 5 $\mu\text{g/ml}$ (A and C) or 10 $\mu\text{g/ml}$ (B) of sHZ for 24 hours. Next, cells were infected for 48 hours with fully competent NL4-3Balenv (A), fully infectious reporter virus coding for murine HSA (B) and single-cycle HIV-1 reporter virus pseudotyped with JR-FL (C). Genomic DNA was extracted and quantification of integration events was achieved using a real-time PCR protocol described in Materials and Methods. Results are mean \pm SEM of data from triplicate samples of several independent experiments (i.e. 6 for panel A, 3 for panel B and 1 for panel C). Asterisks denote statistically significant data (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

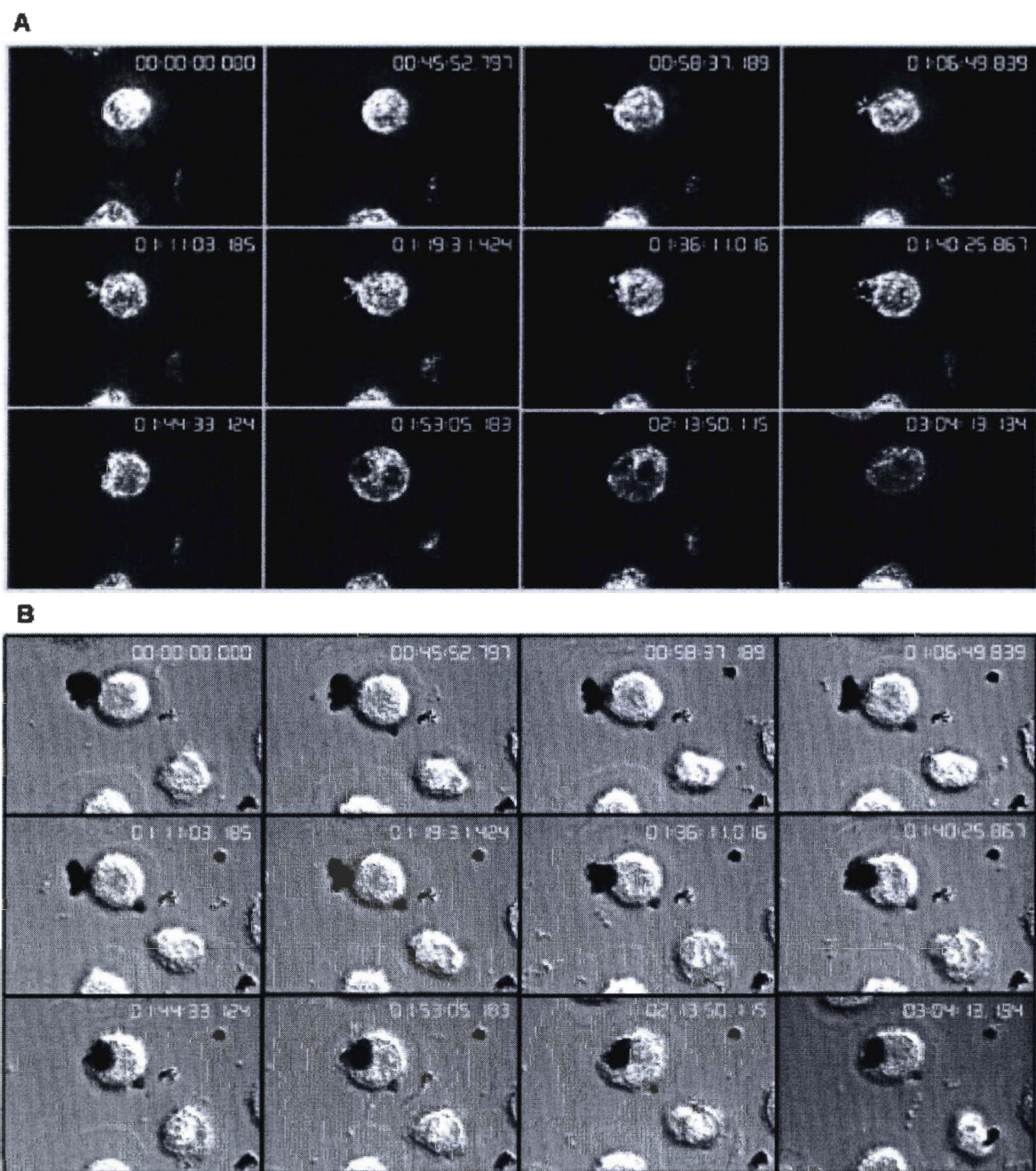


Figure 1

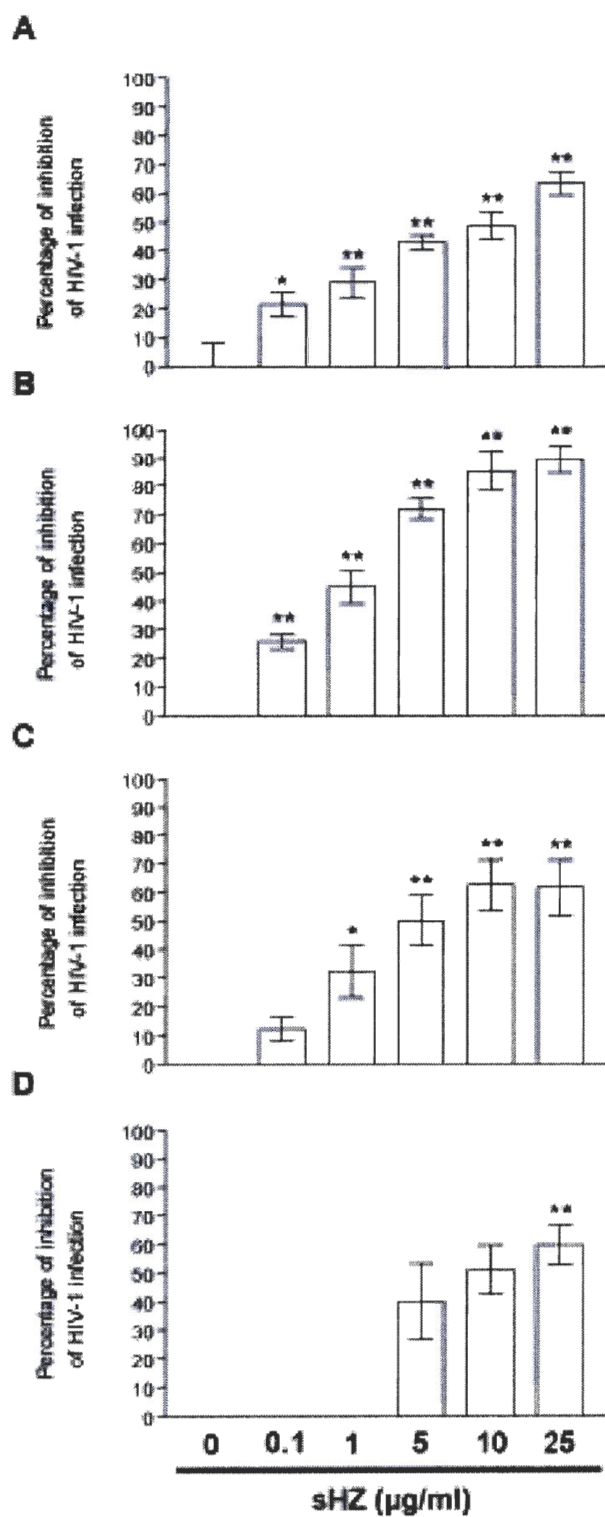


Figure 2

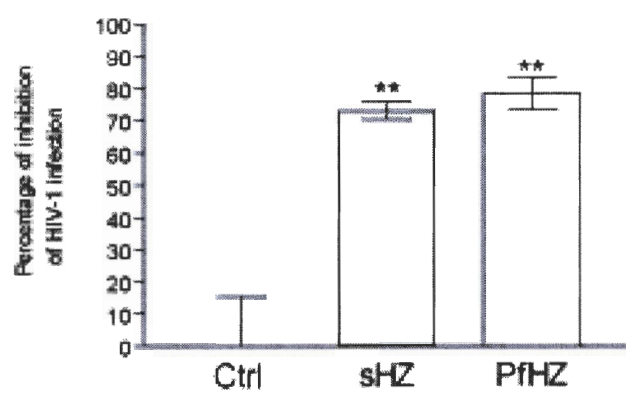


Figure 3

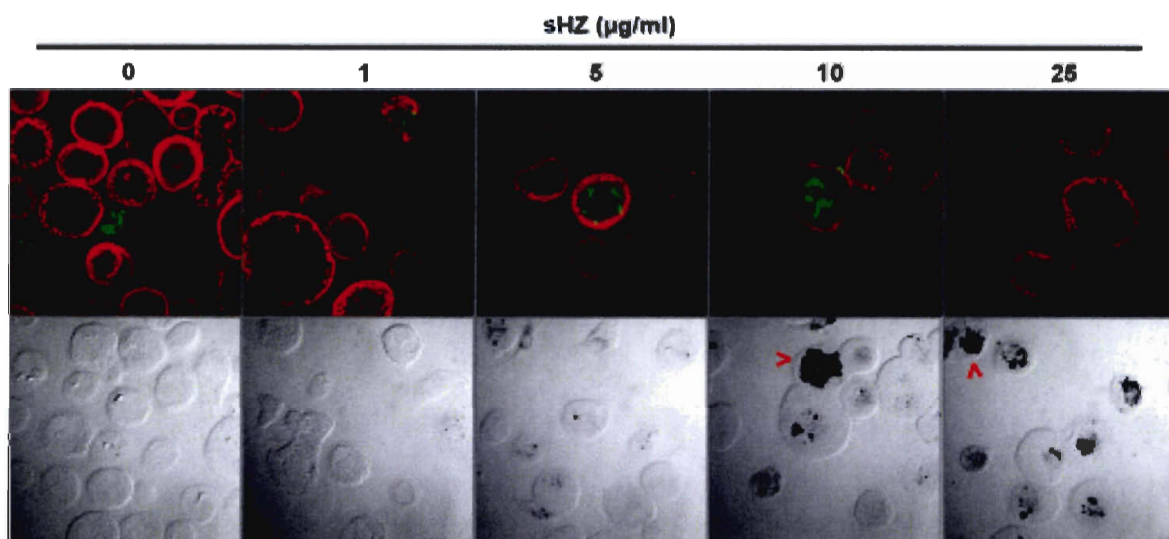


Figure 4

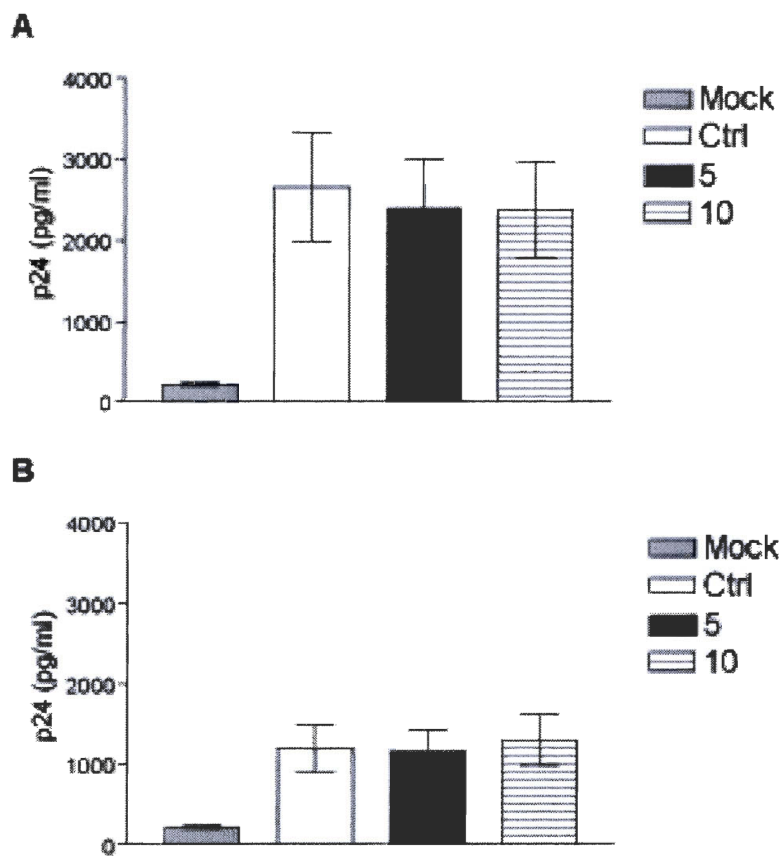


Figure 6

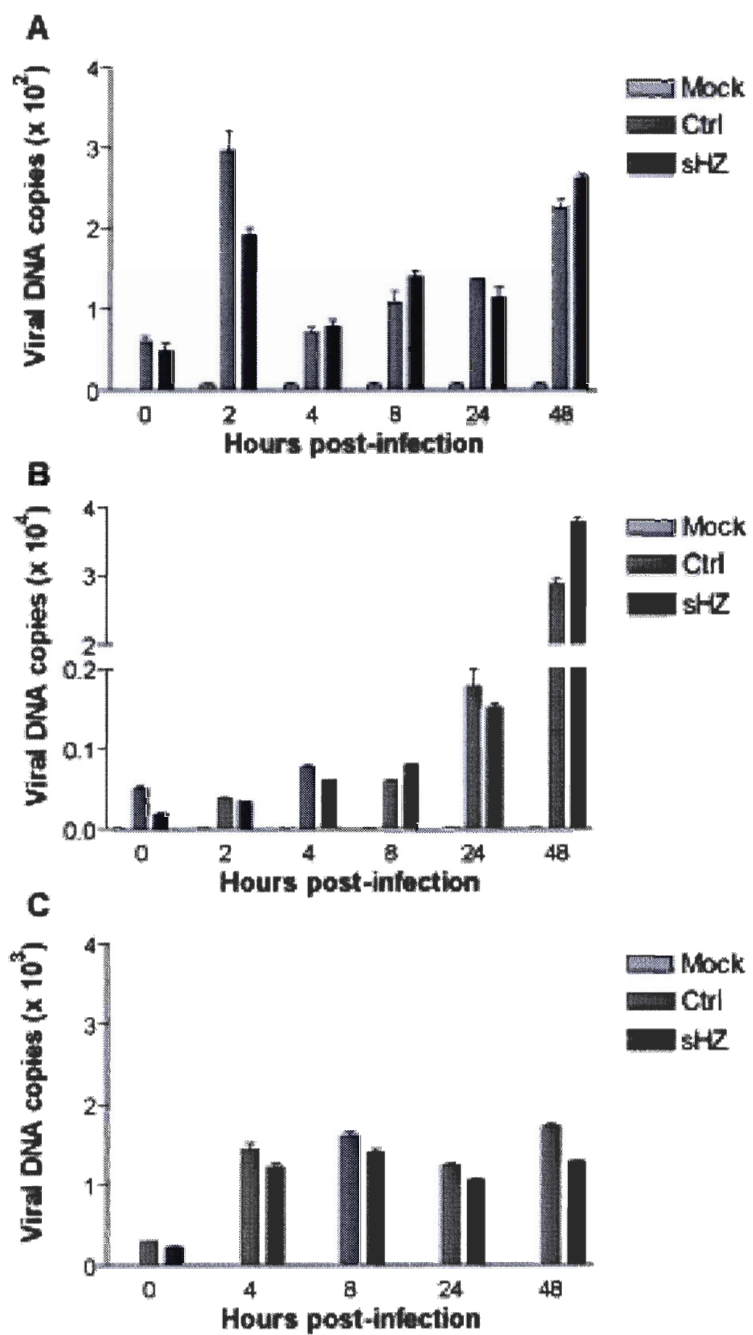


Figure 7

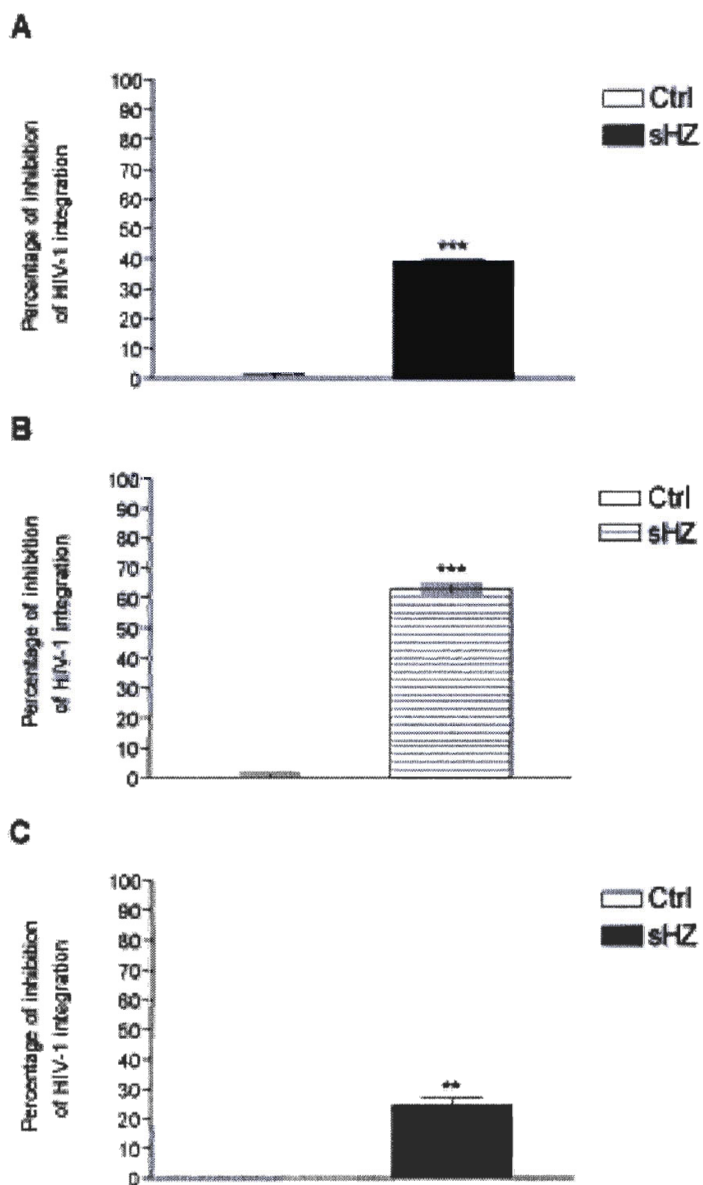


Figure 8