



HAL
open science

Influence du polymorphisme du promoteur des sous-types du VIH-1 sur la dynamique de la réplication virale *in vivo*

Mireille Centlivre

► **To cite this version:**

Mireille Centlivre. Influence du polymorphisme du promoteur des sous-types du VIH-1 sur la dynamique de la réplication virale *in vivo*. Biochimie [q-bio.BM]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2005. Français. NNT : . tel-00010008v1

HAL Id: tel-00010008

<https://theses.hal.science/tel-00010008v1>

Submitted on 30 Aug 2005 (v1), last revised 3 Jan 2013 (v2)

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UFR de Biochimie
Ecole Doctorale B2M
Tour 42
2, place Jussieu
75005 Paris

Unité de Rétrovirologie Moléculaire
URA CNRS 1930
Département de Virologie
Institut Pasteur
28, rue du Dr Roux
75015 Paris

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS VI – PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Virologie Fondamentale

Présentée par :

Mireille CENTLIVRE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris VI

Sujet de la thèse :

**Influence du polymorphisme
du promoteur des sous-types du VIH-1
sur la dynamique de la réplication virale *in vivo***

Soutenue le 9 juin 2005 devant le jury composé de :

Monsieur Jean-Claude NICOLAS	<i>Président</i>
Madame Anne-Marie AUBERTIN	<i>Rapporteur</i>
Monsieur Esteban DOMINGO	<i>Rapporteur</i>
Monsieur Simon WAIN-HOBSON	<i>Directeur de Thèse</i>
Madame Monica SALA	<i>Co-Directeur de Thèse</i>

Je tiens en premier lieu à remercier tous les membres du jury pour avoir accepté d'y participer. Je remercie Monsieur Jean-Claude Nicolas de présider le jury lors de ma soutenance de thèse, je remercie également Madame Anne-Marie Aubertin et Monsieur Esteban Domingo d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse malgré leurs emplois du temps bien remplis.

Je remercie Simon pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et conseillée dans la réalisation de mon travail de doctorat, tout en me laissant une grande liberté.

Un grand merci à Monica qui a guidé mes premiers pas dans le monde de la recherche. Je la remercie tout particulièrement pour son encadrement, son enthousiasme, sa patience et sa disponibilité durant ces années en espérant qu'elle me transmette un jour la recette de son tiramisu légendaire !

Merci à Peter pour ses conseils avisés et les nombreuses discussions scientifiques.

Je remercie également tous les membres de l'unité pour leur sympathie et leur aide, scientifique ou non : Marie élément indispensable du très sélect MMM club, Céline, Denise, Nicole, Jean-Pierre, Rodolphe, Michael et Michèle. Je remercie également Leila et Idalina pour leur aide discrète mais efficace.

Je tiens également à remercier toutes les personnes avec qui j'ai collaboré et sans qui ce travail ne serait pas ce qu'il est. Je remercie plus particulièrement Françoise Thierry, Sandrine Gofflo, Jenny Valladeau et Colette Dezutter, avec qui j'ai eu plaisir à travailler.

Je remercie également les organismes qui m'ont financée : l'Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA (ANRS) et la Caisse Nationale d'Assurance Maladie et Maternité des Travailleurs Non Salariés des Professions Non Agricoles (CANAM).

Un grand merci aux personnes, scientifiques ou non, qui, par leur soutien et leur amitié, m'ont beaucoup aidé : Marie et JB, Litha et Fred, Cécile, Emilie, Alix, les deux Olivier, Cédric, ainsi que d'autres, notamment les stapatistes, qui me pardonneront de ne pas les citer mais que je n'oublie pas.

Merci à toute ma famille pour leur soutien sans faille, particulièrement Marie-O pour ses précieuses corrections de ce charabia scientifique, et une spéciale dédicace de la "catabox" à Francois ! Mes derniers remerciements vont à Nicolas, pour ses encouragements et son soutien inconditionnel durant tous ces moments et malgré la distance.

TABLE DES MATIERES

Table des Matieres	3
Résumé	6
Liste des Figures	7
Liste des Abréviations	8
Introduction	10
I. LE PROMOTEUR VIRAL ET SON INFLUENCE SUR LA REPLICATION DU VIH-1	11
A. Le VIH-1	11
1) Le VIH-1 : structure et organisation génomique	11
2) Le cycle de réplication du VIH-1	12
a) entrée virale.....	12
b) transcription inverse et intégration	13
c) transcription du génome viral	14
d) traduction et bourgeonnement.....	15
3) Le modèle animal du VIH-1	15
4) Variabilité génétique du VIH-1.....	16
a) mécanismes engendrant la variabilité	16
b) conséquences de la variabilité.....	17
c) impact du polymorphisme des sous-types du VIH-1 sur la réplication virale.....	17
d) mesure de l'impact de la variabilité sur la réplication virale	18
B. Le LTR : Structure	20
1) La région unique 3'	22
a) le domaine promoteur minimal	22
i) la boîte CATA.....	22
ii) l'élément initiateur.....	23
iii) les sites de fixation de Sp1	23
b) le domaine activateur.....	24
c) le domaine modulateur	26
2) La région répétée R	27
3) La région unique 5'	29
4) Les spécificités du LTR du VIS	30
C. Influence du Polymorphisme du LTR sur la Réplication Virale.....	31
1) Le polymorphisme des sous-types du VIH-1 et son impact sur la réplication virale	31
a) configuration des LTR sous-types-spécifiques.....	32
i) le domaine promoteur minimal	32

ii) le domaine activateur -----	32
iii) le domaine modulateur -----	33
iv) le TAR -----	34
b) impact du polymorphisme sur la réplication virale-----	34
i) la force promotrice-----	34
ii) une réplication différentielle-----	36
2) Le LTR, la lignée monocyttaire/macrophagique et le système nerveux central-----	37
a) régulation de l'activité du LTR dans les monocytes/macrophages infectés -----	37
b) régulation de l'activité du LTR dans le système nerveux -----	38
3) Modification des promoteurs viraux, atténuation et tropisme -----	39
a) atténuation de la réplication virale-----	39
b) changement du tropisme viral -----	40
II. PATHOGENESE DE L'INFECTION PAR LE VIH-1 ET LE VIS -----	41
A. Dynamique de l'infection par le VIH-1 et le VIS -----	41
1) Les différentes phases de l'infection par le VIH-1 et le VIS -----	41
a) la primo-infection -----	41
b) la phase asymptomatique -----	42
c) la phase symptomatique ou SIDA -----	43
d) des évolutions particulières-----	43
2) Mise en place de la réponse à l'infection-----	44
a) la réponse à médiation cellulaire-----	44
i) la réponse CD8-----	44
ii) la réponse CD4 -----	46
b) la réponse à médiation humorale -----	46
3) La dynamique des populations lymphocytaires -----	47
a) la phase aiguë de l'infection -----	47
i) installation de l'infection -----	47
ii) impact du corécepteur sur la dynamique de déplétion -----	48
iii) la dynamique d'activation et déplétion des lymphocytes T-----	48
b) la phase chronique de l'infection -----	50
i) activation chronique des LT CD4 ⁺ et CD8 ⁺ naïfs et mémoires -----	50
ii) l'activation chronique : cause ou conséquence de la déplétion des LT CD4 ⁺ ? -----	50
iii) déplétion et trafic lymphocytaire-----	51
iv) un dérèglement global de l'homéostasie des LT -----	52
c) lors d'un traitement anti-rétroviral-----	52
i) une dynamique en deux temps -----	52
ii) diminution de l'activation et restauration d'une réponse immunitaire généralisée-----	53
4) L'échappement au système immunitaire -----	54
a) l'existence de réservoirs viraux -----	54
b) la régulation négative du CMH -----	55

c) la surexpression du ligand de Fas-----	56
B. L'intestin : un rôle central dans la pathogenèse-----	57
1) La muqueuse intestinale : organisation et système immunitaire -----	57
a) les sites inducteurs du GALT-----	58
b) les sites effecteurs du GALT -----	59
i) les lymphocytes intra-épithéliaux-----	59
ii) les lymphocytes de la lamina propria-----	59
c) la circulation des lymphocytes -----	60
2) Le système immunitaire intestinal : cible pour l'infection par le VIH-1 et le VIS -----	61
a) passage de la barrière mucoale par le VIH-1 -----	61
b) une déplétion intestinale rapide et précoce des LT CD4 ⁺ -----	62
i) mise en évidence de la déplétion intestinale-----	62
ii) une déplétion préférentielle au niveau des sites effecteurs -----	63
iii) les mécanismes potentiels de la déplétion intestinale-----	65
c) une déplétion persistante des LT CD4 ⁺ lors de la phase asymptomatique et du SIDA -----	66
Résultats -----	69
PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE -----	70
ARTICLE 1 -----	73
ARTICLE 2 -----	92
Discussion -----	130
A. Une réplication différentielle dépendante de l'environnement cellulaire -----	132
1) Un impact marqué du polymorphisme du promoteur in vitro -----	132
2) In vivo, une multitude d'environnements juxtaposés, une dynamique complexe-----	134
3) Implication des cytokines sur la réplication virale via l'activation des facteurs de transcription cellulaires-----	136
B. Influence du polymorphisme sur la dynamique spatiale et temporelle -----	138
C. Perspectives : implications sur la vaccination et la thérapie anti-VIH-1 -----	140
1) Implications sur la vaccination anti-VIH-1 -----	140
2) Implications sur l'utilisation de cytokines dans la thérapie anti-VIH-1 -----	141
Bibliographie -----	143

RESUME

Bien que le mécanisme premier du tropisme cellulaire soit l'interaction de l'enveloppe virale avec les récepteurs cellulaires, d'autres éléments viraux peuvent moduler de manière significative la réplication du VIH-1 *in vivo*. Le promoteur du VIH-1 pourrait être un de ces éléments en déterminant le niveau de transcription virale, et par conséquent le taux de la réplication virale. En effet, le polymorphisme du promoteur du VIH-1, lié aux sites de fixation de facteurs de transcription, pourrait avoir un impact sur la réplication virale *in vivo*.

Pour étudier cette problématique *in vivo*, nous avons construit des virus chimères isogéniques, basés sur le génome du VISmac239 et qui portent le promoteur minimal des sous-types B, C, et E du VIH-1. Ces chimères ont été caractérisées *in vitro* et *ex vivo* à travers des expériences de cinétiques de réplication et de compétitions virales. Puis nous avons co-infecté deux macaques rhésus avec les trois virus chimères. En utilisant le polymorphisme du promoteur comme marqueur du phénotype viral, il a été possible de démontrer une discordance entre le génotype des virus associés aux rPBMCs et celui des virions présents dans le sérum lors de la primo-infection. Un changement dans le génotype viral est également visible entre la primo-infection et la phase asymptomatique. Ces résultats montrent que le polymorphisme du promoteur des sous-types du VIH-1 constitue un déterminant majeur pour la réplication et la dissémination virale *in vivo*.

Nous avons ensuite déterminé quel compartiment soutient majoritairement la virémie lors de la primo-infection. Après co-infection de deux nouveaux macaques rhésus par les trois chimères, la discordance sur 18 jours d'infection entre les génotypes des virus associés aux rPBMCs et ceux présents dans le sérum a été confirmée. Au sacrifice des singes au jour 18, le STR-C prédomine dans les organes lymphoïdes secondaires et dans certaines fractions cellulaires de l'intestin. L'analyse des selles des animaux montrent que la virémie en primo-infection est majoritairement due à une intense réplication virale dans l'intestin. De plus, dans des histocultures thymiques, nous avons montré que l'IL-7 influence la réplication des chimères STR et en particulier augmente sélectivement celle du STR-C. Ainsi, l'utilisation de l'IL-7 dans le cadre d'une immunothérapie pourrait activer la réplication de souches virales spécifiques sur la base du polymorphisme associé au promoteur des sous-types du VIH-1.

Mots Clef : VIH-1, LTR, sous-type, macaque rhésus, primo-infection, IL-7

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1 Structure du virion et organisation génomique du VIH-1
- FIGURE 2 Cycle de réplication du VIH-1
- FIGURE 3 Transcription inverse du génome du VIH-1
- FIGURE 4 Transcription du génome du VIH-1
- FIGURE 5 Phylogénie du gène *env* des principaux virus de l'immunodéficience humaine et simienne
- FIGURE 6 Répartition à travers le monde des sous-types du VIH-1 du groupe M
- FIGURE 7 LTR du VIH-1 B
- FIGURE 8 Activation de la transcription virale par le facteur de transcription NF- κ B
- FIGURE 9 Tat et la transcription virale
- FIGURE 10 Polymorphisme du promoteur et du TAR des sous-types du VIH-1 du groupe M
- FIGURE 11 Evolution des différents paramètres de l'infection par le VIH-1
- FIGURE 12 Modèle de la dynamique lymphocytaire T lors de l'infection par le VIH-1
- FIGURE 13 Organisation du tissu lymphoïde associé à l'intestin
- FIGURE 14 Différentes voies d'entrée du VIH-1 à travers l'épithélium intestinal
- FIGURE 15 Expression des marqueurs CD45RA et CCR5 parmi les lymphocytes T CD4⁺ au niveau de différents compartiments et mise en évidence de la déplétion des LT CD4⁺ CD45RA⁻ CCR5⁺ lors de l'infection par le VIH-1
- FIGURE 16 Modèle de la réplication du VIH-1 dans l'intestin
- FIGURE 17 Modèle de la dynamique de la réplication virale

LISTE DES ABREVIATIONS

<i>ATF/CREB</i>	<i>Activating Transcription Factor/Cyclic AMP Response Element</i>
<i>AP-1</i>	<i>Activator Protein 1</i>
<i>CAF</i>	<i>CD8 Antiviral Factor</i>
<i>C/EBP</i>	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein</i>
<i>CMH</i>	<i>Complexe Majeur d'Histocompatibilité (système HLA chez l'Homme)</i>
<i>COUP-TF</i>	<i>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor</i>
<i>CRE</i>	<i>cAMP Responsive Element</i>
<i>CTL</i>	<i>Lymphocytes T Cytotoxiques</i>
<i>FDC</i>	<i>Cellules Dendritiques Folliculaires</i>
<i>GABP</i>	<i>GA Binding Protein</i>
<i>GALT</i>	<i>Tissu Lymphoïde Associé à l'Intestin</i>
<i>HAART</i>	<i>Highly Active Antiviral Therapy</i>
<i>IEL</i>	<i>Lymphocytes Intra-Epithéliaux</i>
<i>LEF-1</i>	<i>Lymphocyte Enhancer Factor</i>
<i>LPL</i>	<i>Lymphocytes de la Lamina Propria</i>
<i>LN</i>	<i>Lymphocyte B</i>
<i>LT</i>	<i>Lymphocyte T</i>
<i>LTR</i>	<i>Long Terminal Repeat</i>
<i>LT DP</i>	<i>Lymphocyte T Double Positif</i>
<i>LT SP</i>	<i>Lymphocyte T Simple Positif</i>
<i>MADCAM1</i>	<i>Mucosal ADdressin Cell Adhesion Molecule-1</i>
<i>NFAT</i>	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
<i>NF-κB</i>	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
<i>NRE</i>	<i>Negative Regulatory Element</i>
<i>PBMC</i>	<i>Cellules Mononucléées du Sang Périphérique</i>
<i>PHA</i>	<i>Phyto-hémagglutinine</i>
<i>PIC</i>	<i>Complexe de Pré-Initiation de la transcription</i>
<i>PP</i>	<i>Plaqué de Peyer</i>
<i>PPT</i>	<i>polypurine tract</i>
<i>P-TEFb</i>	<i>Positive Transcription Elongation Factor b</i>
<i>pb</i>	<i>paire de bases</i>

<i>R</i>	<i>région Répétée</i>
<i>Rev</i>	<i>Regulateur de l'expression virale</i>
<i>RBEIII</i>	<i>RBF Binding Element III</i>
<i>SHIV</i>	<i>Virus de l'Immunodéficience Simienne portant une enveloppe du VIH-1</i>
<i>STR</i>	<i>Short Terminal Repeat</i>
<i>TAF</i>	<i>TBP Associated Factor</i>
<i>TAR</i>	<i>Tat Responsive Element</i>
<i>Tat</i>	<i>Transactivateur de la transcription</i>
<i>TBP</i>	<i>TATAA Binding Protein</i>
<i>TCR</i>	<i>Récepteur des Cellules T</i>
<i>TNFα</i>	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
<i>TRE</i>	<i>TPA/PMA Responsive Element</i>
<i>Ub</i>	<i>Uracile box</i>
<i>U3</i>	<i>région Unique 3'</i>
<i>U5</i>	<i>région Unique 5'</i>
<i>USF</i>	<i>Upstream Stimulating Factor</i>
<i>VIH-1</i>	<i>Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1</i>
<i>VIH-2</i>	<i>Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 2</i>
<i>VIS</i>	<i>Virus de l'Immunodéficience Simienne</i>

INTRODUCTION

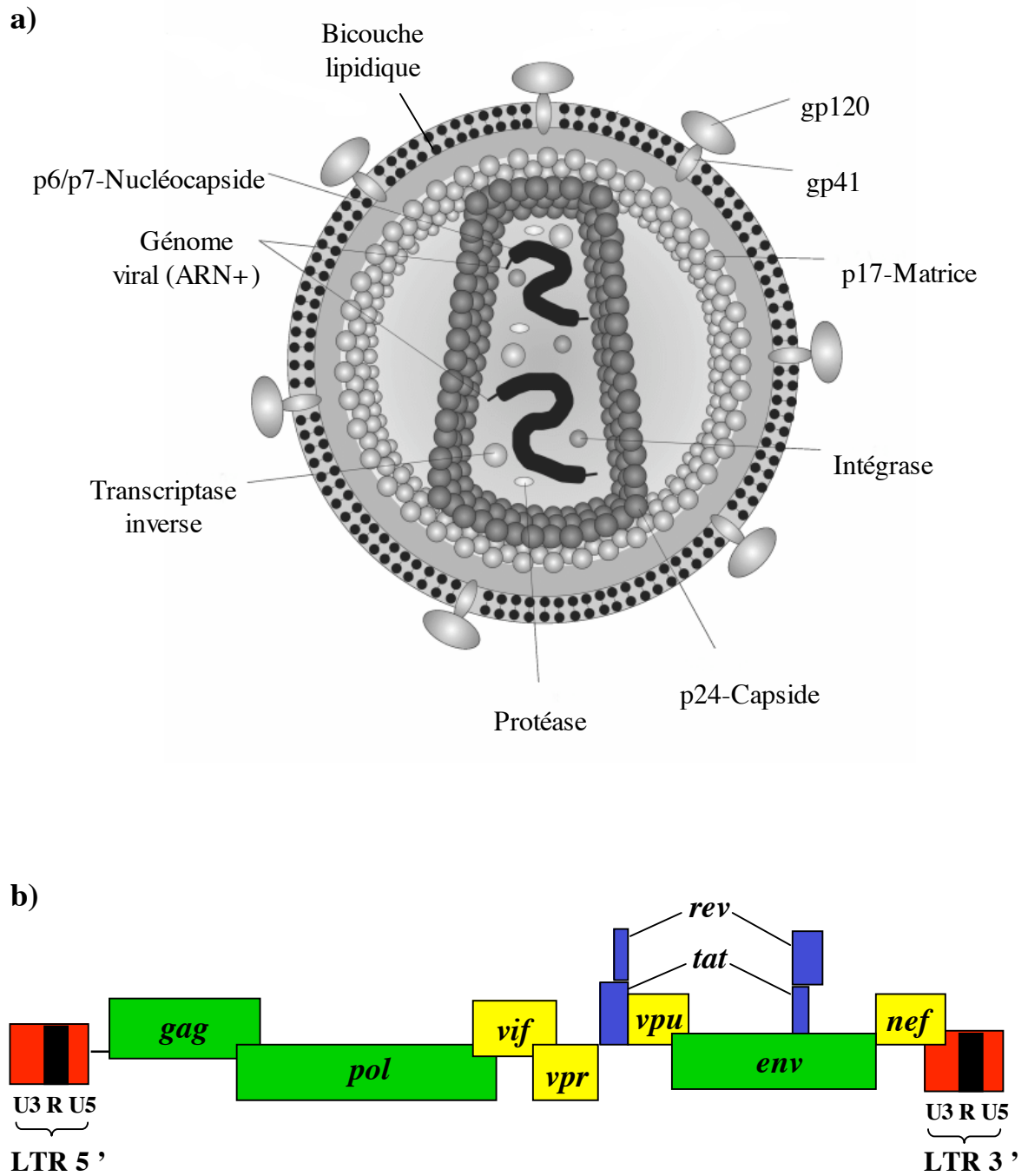


Figure 1 : Structure du virion (a), et organisation génomique du VIH-1 (b)

Légende b: En vert sont représentés les gènes de structure, en bleu ceux codant pour les protéines régulatrices et en jaune ceux codant pour les protéines accessoires.

I. LE PROMOTEUR VIRAL ET SON INFLUENCE SUR LA REPLICATION DU VIH-1

A. Le VIH-1

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH-1) est responsable du Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA), se traduisant par une perte des lymphocytes T (LT) CD4⁺. Bien qu'une réponse immunitaire anti-VIH-1 se mette en place, le VIH-1 établit une infection persistante dans laquelle le virus se réplique de façon continue dans de nouvelles cellules infectées.

Avec près d'un mort toutes les dix secondes à travers le monde, le SIDA reste un problème majeur de santé publique. D'après les données épidémiologiques de UNAIDS (www.unaids.org), environ 42 millions de personnes étaient infectées par le VIH à la fin de l'année 2004, et plus de 95% de ces personnes vivent dans des pays en voie de développement. Dans ces pays, l'espérance de vie moyenne se réduit profondément et la pandémie a un impact désastreux sur leur économie. La mise au point d'une thérapie antivirale efficace (HAART) dans les années 1995-2000 a été une avancée considérable, mais ce traitement ne permet pas l'éradication de la maladie. De plus, l'écart entre les pays en voie de développement et les pays industrialisés quant à l'accès aux traitements anti-rétroviraux est saisissant. Il est donc primordial que la recherche sur le SIDA se poursuive, notamment en vue de l'élaboration d'un vaccin préventif ou thérapeutique.

1) Le VIH-1 : structure et organisation génomique

Le VIH-1 est un rétrovirus humain, isolé pour la première fois en 1983 (Barre-Sinoussi et al., 1983). Ce virus enveloppé est apparenté à d'autres lentivirus, trouvés chez des animaux, comme le Virus de l'Immunodéficience Simienne (VIS) ou le Virus de l'Immunodéficience Féline. Chaque particule virale, ou virion, contient deux copies du génome viral (**Figure 1**). Ce génome viral est sous forme d'ARN de polarité positive, et sa taille est d'environ 9,2 kilobases (Wain-Hobson et al., 1985).

Le génome du VIH-1 est constitué de 9 gènes. Comme les autres rétrovirus, le VIH-1 possède trois gènes majeurs :

- *gag* (groupe spécifique d'antigène) code pour l'expression des protéines structurales du virion (protéines de matrice MA, capsid CA, nucléocapside NC, et p6).

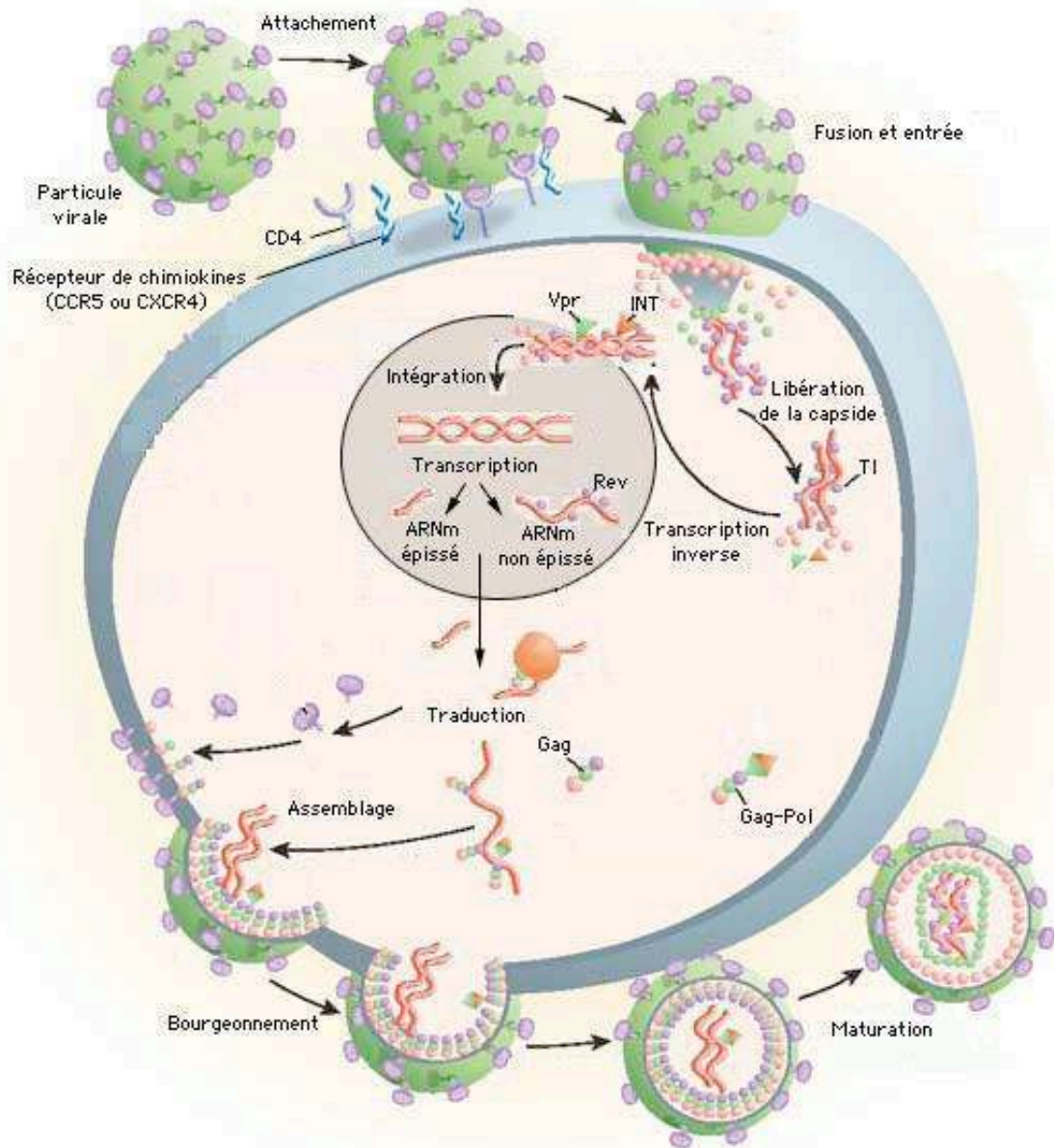


Figure 2 : Cycle de réplication du VIH-1
 (d'après Pomerantz et al, Nature Medicine, 2003)
 Légende: INT: Intégrase, TI: Transcriptase Inverse

- *pol* (polymérase) code pour l'expression des enzymes impliquées dans la réplication, l'intégration virale et la maturation du virion (protéase PRO, transcriptase inverse RT et intégrase INT).
- *env* (enveloppe) code pour l'expression des glycoprotéines d'enveloppe de surface (gp120) et transmembranaire (gp41).

En addition, le génome du VIH-1 code pour l'expression de deux protéines régulatrices, le transactivateur de la transcription (Tat) et le régulateur de l'expression des gènes du virion (Rev). Ces deux protéines sont indispensables à la réplication virale. Par ailleurs, le virus contient quatre gènes qui codent pour l'expression de protéines dites accessoires : Nef, Vif, Vpr et Vpu. Ces protéines sont dites accessoires car elles ne sont pas essentielles à la réplication virale dans les lignées cellulaires.

2) Le cycle de réplication du VIH-1

Le cycle de réplication virale commun à tous les rétrovirus est caractérisé par des événements clés : (a) la fixation du virus et son entrée dans la cellule cible, (b) la transcription inverse de son génome d'ARN simple brin en une molécule d'ADN double brin et l'intégration de l'ADN proviral résultant dans le génome de la cellule hôte, (c) l'expression des gènes viraux et l'assemblage du virus, et (d) le bourgeonnement du virion et sa maturation (**Figure 2**).

a) entrée virale

Le VIH-1 s'attache à la surface de la cellule hôte par le biais d'une interaction de haute affinité entre la glycoprotéine virale d'enveloppe gp120 et la molécule cellulaire CD4. Cette liaison est renforcée par l'interaction de la gp120 avec un co-récepteur. Il existe deux co-récepteurs majeurs :

- le récepteur aux β chimiokines, CCR5, est critique dans l'établissement initial de l'infection chronique par le VIH-1 *in vivo*, et est exprimé à la surface de LT CD4⁺ mémoires (CD45R0⁺), des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules de Langerhans. Les souches virales utilisant ce récepteur sont dites de tropisme R5.
- le récepteur aux α chimiokines, CXCR4, est exprimé notamment par les LT CD4⁺ naïfs (CD45RA⁺) et les thymocytes. Les souches virales utilisant ce récepteur sont dites de tropisme X4.

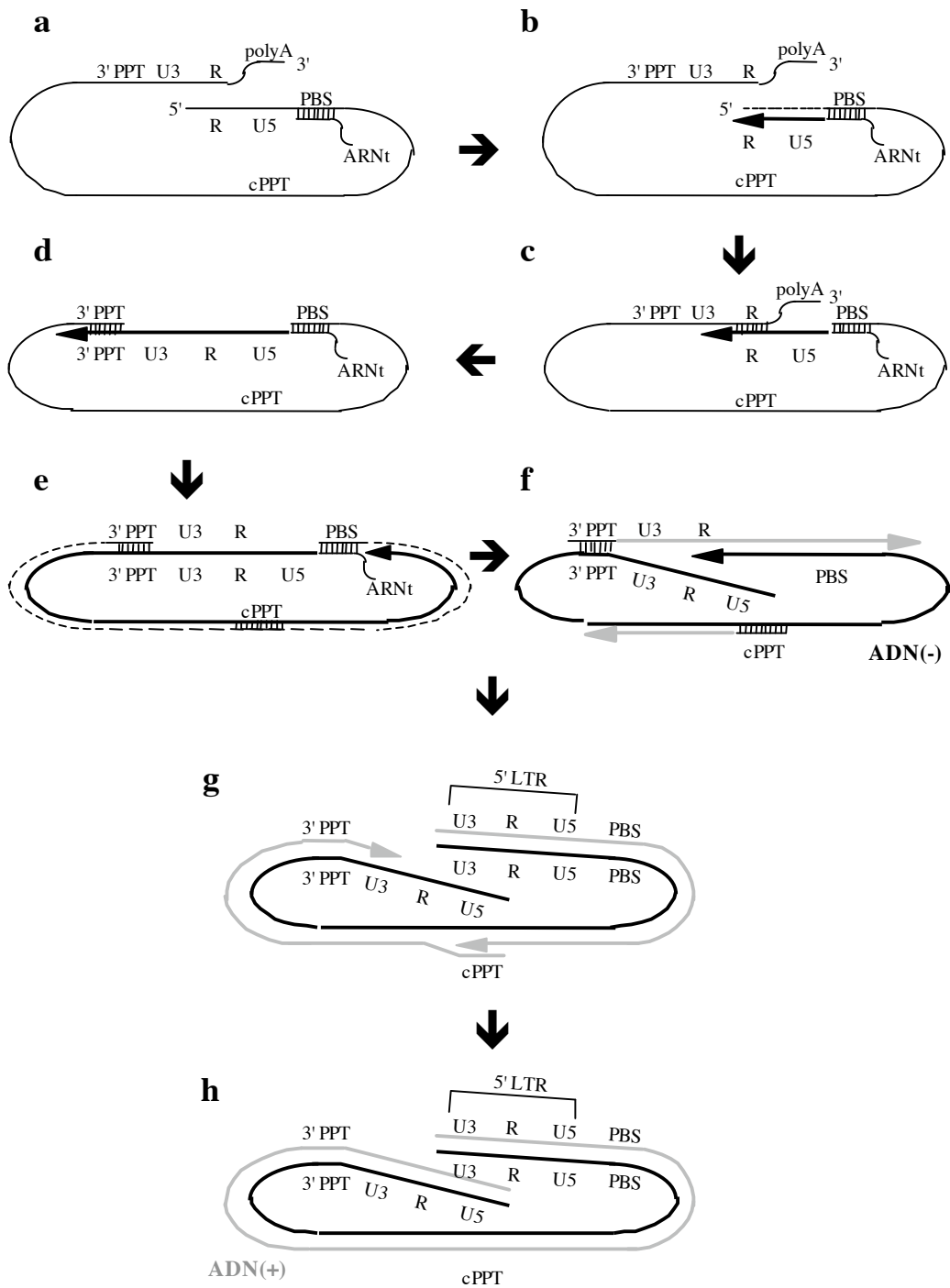


Figure 3 : Transcription inverse du génome du VIH-1

Le VIH-1 peut également entrer dans la cellule cible par le biais d'autres co-récepteurs mineurs (CCR3, CCR2b...), ou dans les cellules dendritiques par le biais de la lectine DC-SIGN.

L'interaction de la gp120 avec ses récepteurs et co-récepteurs va induire un changement conformationnel de la gp120 permettant le démasquage du peptide de fusion de la gp41 et ainsi la fusion entre la membrane du virion et celle de la cellule hôte. L'entrée du VIH-1 dans la cellule est un processus indépendant du pH, et s'opère par la fusion des membranes virales et cellulaires, puis la libération de la capside virale dans le cytoplasme.

b) transcription inverse et intégration

La transcription inverse a lieu dans le cytoplasme de la cellule infectée après pénétration du virus. L'ARN viral génomique monocaténaire est alors rétro-transcrit par la transcriptase inverse en ADN complémentaire double brin linéaire, qui, associé à l'intégrase dans le complexe de préintégration, va être importé dans le noyau de la cellule, où il va s'intégrer dans le génome cellulaire.

La transcription inverse démarre au niveau de l'extrémité 5' de la matrice d'ARN(+), (**Figure 3**) : un ARN de transfert lysine 3 (ARN^{t^{lys}}), qui a été incorporé dans le virion au cycle de réplication précédent, va se fixer au primer binding site (PBS), situé dans la région U5 en 5' du génome viral ARN (**Figure 3a**). Il sert d'amorce et les régions U5 et R, situées à l'extrémité 5' du génome viral, sont transcrites à partir de l'extrémité 3' de cet ARN^{t^{lys}} (**Figure 3b**). Il y a ensuite appariement du brin d'ADN(-) néo-synthétisé au niveau de la région R de l'extrémité 3' de la matrice d'ARN(+), ce qui conduit à un transfert intra ou intermoléculaire (**Figure 3c**). L'ADN(-) sert alors d'amorce pour poursuivre sa propre synthèse (**Figure 3d**). L'ARN viral déjà transcrit, situé 15 à 20 nucléotides en amont du site catalytique de polymérisation, est dégradé par l'activité ARNaseH de la transcriptase inverse (**Figure 3e**). Les régions 3'PPT et cPPT échappent en revanche à cette dégradation. Ces deux régions vont servir d'amorce lors de la synthèse de l'ADN(+) (**Figure 3f**). La synthèse du deuxième brin d'ADN nécessite un deuxième saut de brin et conduit à la formation de deux segments de taille identique, se chevauchant partiellement (**Figure 3g**). Ce court chevauchement de brins nommé triplex central ou "DNA flap" est un élément essentiel de l'étape d'import nucléaire.

Après l'étape de transcription inverse, le génome viral d'ADN est bordé à ses deux extrémités par les LTR (long terminal repeat, cf chapitre I.B), qui portent des signaux d'intégration (**Figure 3h**). Le LTR contient le promoteur qui contrôle l'expression du génome

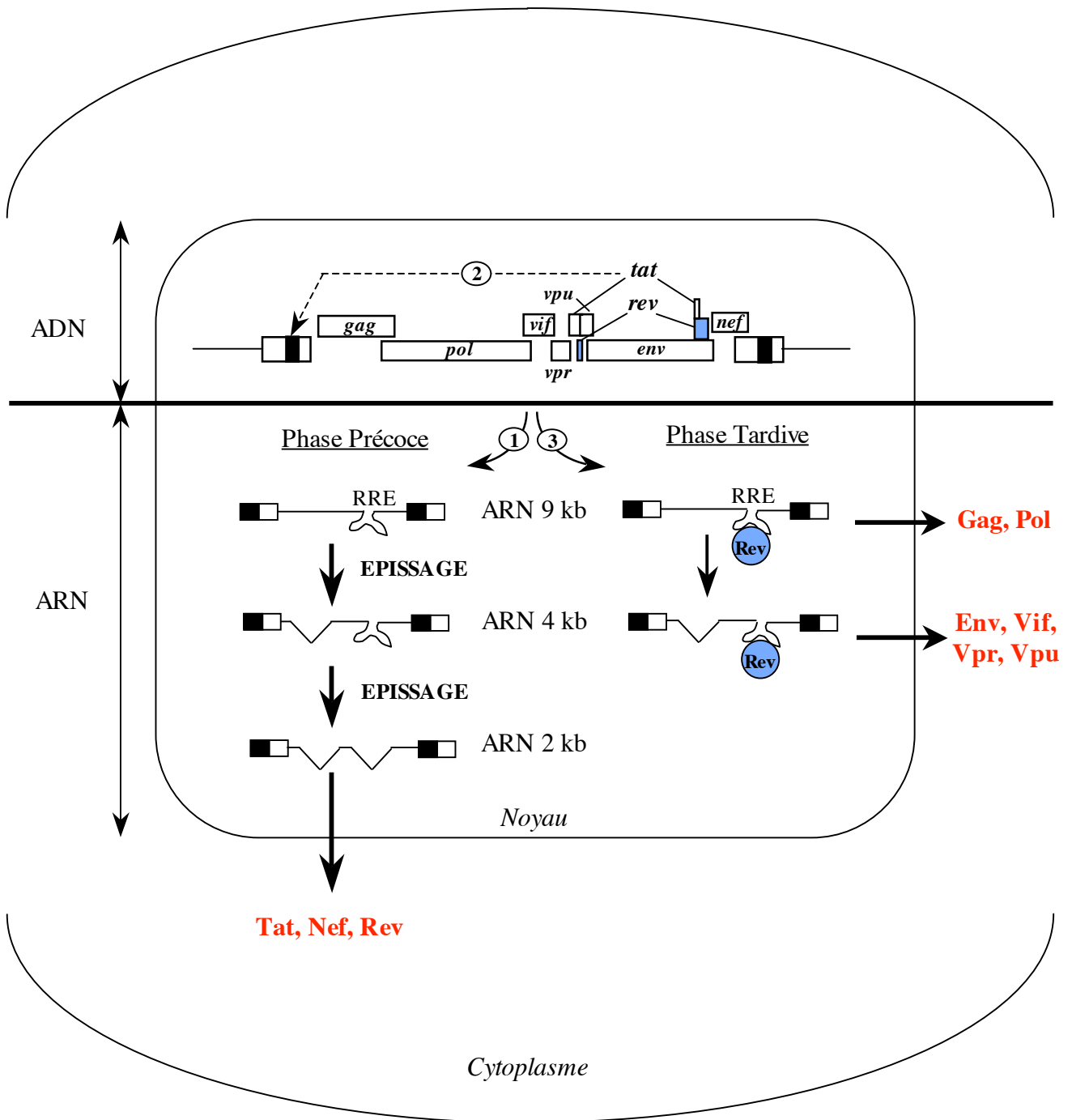


Figure 4 : Transcription du génome du VIH-1

Légende: RRE: Rev Responsive Element

viral. Il est composé de trois régions : U3 (pour Unique 3'), R (pour Répétée) et U5 (pour Unique 5') ainsi nommées du fait de leur origine dans le génome ARN monocaténaire (cf. chapitre I.B). En amont du LTR en 3' se trouvent des éléments agissant en *cis*, nécessaires au génome viral pour sa transcription inverse et son intégration dans le génome cellulaire. La "Uracile box" (Ub) est une région riche en uraciles, conservée parmi les lentivirus et qui est essentielle lors des premières étapes de synthèse de l'ADN proviral. Le "polypurine tract" en 3' (3' PPT) est une région riche en purines. La position de cette région détermine l'extrémité 5' précise de la région U3 du LTR en 3'. Les deux premiers nucléotides de U3, et donc du LTR, sont nommés IR (Inverted Repeat). Cette séquence est liée à l'ADN chromosomique par l'intégrase virale, qui reconnaît le site IN dans la région U3 juste en aval du motif IR.

Sous l'action de l'intégrase, le provirus va s'intégrer au génome de la cellule hôte et ce de façon aléatoire, les régions transcriptionnellement actives du génome hôte étant cependant privilégiées.

c) transcription du génome viral

La transcription du provirus intégré dans le génome cellulaire dépend du niveau d'activation de la cellule hôte. Dans les cellules quiescentes, il n'y a pas transcription du génome viral. A l'opposé, toute stimulation conduisant à l'activation de la cellule va induire la transcription du génome viral par l'ARN polymérase II de la cellule hôte. Lors de l'activation de la cellule, les facteurs de transcription cellulaires nécessaires (tels que NF- κ B) vont être disponibles et pourront être recrutés au niveau du promoteur viral (cf chapitre I.B). La machinerie de la cellule hôte et celle du virus sont toutes les deux nécessaires pour la transcription des gènes viraux. La transcription commence au niveau de la région R du LTR en 5' et se termine après la région R du LTR en 3' par un signal de polyadénylation. La région R encadre ainsi le génome viral sous sa forme ARN. Les transcrits viraux ont donc la même structure que tout ARN messenger eucaryote (ARNm), avec une coiffe à l'extrémité 5' et une queue de polyadénines (poly A) à l'extrémité 3', et ils sont épissés par les enzymes cellulaires.

La transcription s'effectue en deux temps (**Figure 4**) :

- une phase précoce (**Figure 4** ①), caractérisée par la synthèse d'ARNm doublement épissés codant pour Tat, Rev et Nef. La protéine Tat s'accumule lors de cette phase, ce qui conduit à une forte augmentation de la transcription du provirus (**Figure 4** ②). Tat trans-activer la transcription par fixation à un motif ARN en épingle à cheveux, TAR (Tat Responsive Element), formé à l'extrémité 5' de la région R du LTR (cf. chapitre I.B).

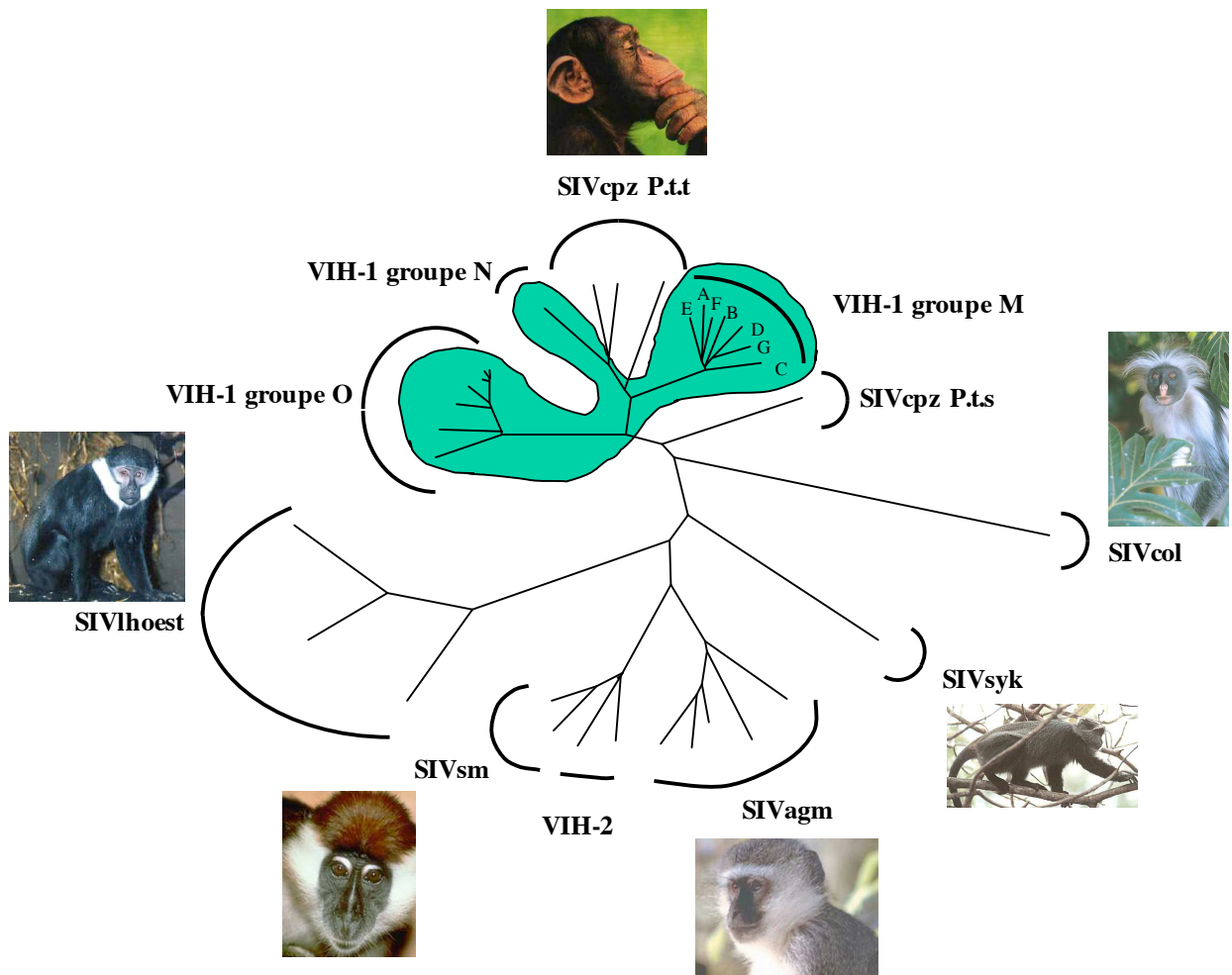


Figure 5 : Phylogénie du gène *env* des principaux virus de l'immunodéficience humaine et simienne

- une phase tardive (**Figure 4 ③**), où les ARNm mono-épissés (Vpu, Env, Vif et Vpr) et non épissés (Gag, Gag-Pol) sont transcrits et exportés du noyau grâce à la protéine virale Rev qui interagit avec le motif RRE (Rev Responsive Element) situé dans le gène *env*.

Les transcrits d'ARN produits à partir de l'ADN proviral servent à la fois d'ARN messenger pour permettre la synthèse des protéines virales mais aussi de génomes ARN pour de nouvelles particules virales.

d) traduction et bourgeonnement

Après transcription, les ARNm viraux épissés et non épissés sont traduits, permettant la production des protéines de l'enveloppe et des éléments structurels du virion, ainsi que celle des enzymes virales (transcriptase inverse, protéase et intégrase). Après traduction, les protéines virales s'assemblent à la membrane cellulaire pour former une particule virale immature qui bourgeonne à partir de la cellule infectée. Cette particule contient deux molécules d'ARN viral issues de la transcription du provirus intégré. Lors du bourgeonnement, le virion entraîne la bicouche lipidique de la membrane cellulaire, dans laquelle sont encastrés les trimères de gp120 et gp41. Puis, la protéase, incorporée dans le virion, conduit au réarrangement structural du virion et permet ainsi la génération d'une particule virale mature.

3) Le modèle animal du VIH-1

L'hypothèse la plus couramment admise concernant l'origine de la pandémie actuelle du VIH est celle d'une transmission singe-homme (Hahn et al., 2000). En effet, des lentivirus simiens apparentés au VIH, appelés VIS, ont été identifiés et sont capables d'infecter de nombreuses espèces de primates africains (**Figure 5**). Le VIH-1 est apparenté au VIS isolé chez le chimpanzé, alors que le VIS_{mac} et le VIS_{sm} isolé chez les mangabey noirs sont proches génétiquement du VIH-2. Les VIS sont le plus souvent non pathogènes pour leur hôte naturel.

Toutefois, si des souches du VIS sont injectées chez des singes qui ne sont pas leur hôte naturel, comme des macaques d'origine asiatique, il en résulte une immunodéficience similaire à la maladie associée à une infection par le VIH-1 chez l'Homme, (Hirsch and Lifson, 2000; Kestler et al., 1990). La cinétique de l'infection par le VIS inclut une phase aiguë, une phase asymptomatique, et une phase terminale de la maladie comme dans l'infection par le VIH-1, mais dans un délai, plus court, rendant possible l'investigation en laboratoire (cf. chapitre II. A). La relevance du VIS/macaque comme modèle animal d'étude

du VIH-1 est soutenue par les similitudes importantes entre les deux virus, incluant l'organisation génomique, les mécanismes d'expression des gènes viraux, et le tropisme pour les LT CD4⁺ et les macrophages (Hirsch and Lifson, 2000). Ainsi, la combinaison du VIS et du macaque en fait un modèle très utile pour l'étude de la pathologie associée à l'infection par le VIH-1, pour le développement et les essais de vaccins potentiels pour le VIH-1, et pour l'évaluation d'approches pharmaco-thérapeutiques pour traiter les patients infectés par le VIH-1.

L'infection de macaques rhésus par le VISmac conduit à une pathologie comparable à celle du VIH-1, mais il faut dissocier deux familles de macaques rhésus : ceux d'origine chinoise et ceux d'origine indienne. Comparativement aux macaques rhésus d'origine indienne, la pathogenèse VISmac dans les macaques rhésus d'origine chinoise est plus proche de l'infection par le VIH-1 de personnes adultes non traitées par HAART. La sous-espèce chinoise de macaques rhésus est donc un meilleur modèle d'étude du SIDA (Ling et al., 2002).

4) Variabilité génétique du VIH-1

a) mécanismes engendrant la variabilité

Le VIH-1 se caractérise par une très grande variabilité génétique qui se traduit par une variabilité antigénique élevée du virus. Cette variabilité est liée à plusieurs mécanismes :

- l'absence d'activité correctrice de la transcriptase inverse (activité exonucléasique 3'-5'), permettant la génération d'erreurs à un taux d'environ $3,5 \cdot 10^{-5}$ erreurs par base et par cycle répliatif (Mansky and Temin, 1995). Ainsi, toute erreur d'incorporation de nucléotides dans la synthèse du brin d'ADN(-) est fixée de manière définitive (Sala et al., 1995).
- la recombinaison entre les génomes de deux virus distincts (Hu and Temin, 1990). Les cellules pouvant être infectées par plusieurs virus, les génomes ARN des différents virus peuvent s'associer dans la même particule au moment du bourgeonnement (Jung et al., 2002). Après infection d'une nouvelle cellule, ils peuvent alors recombiner au moment de la transcription inverse.
- l'APOBEC 3G, une cytidine désaminase cellulaire, qui entraîne, en l'absence de la protéine virale Vif, des hypermutations extensives et monotones de type G→A dans le génome du VIH-1 (Vartanian et al., 2003).

Tous les gènes du VIH-1 sont variables, néanmoins les gènes *gag* et *pol* sont les plus conservés.

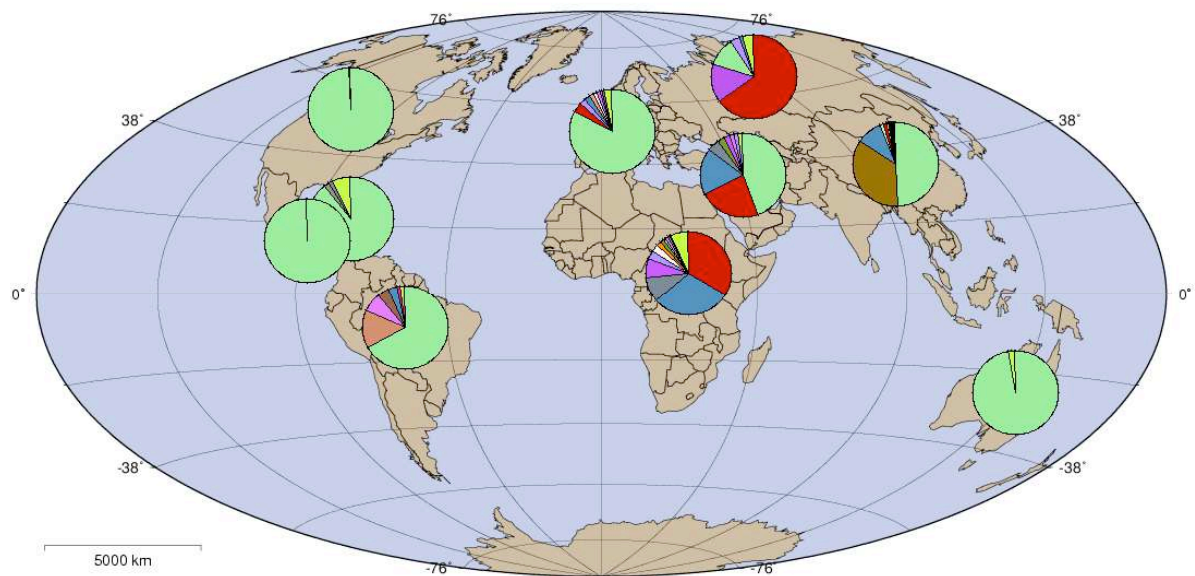


Figure 6 : Répartition à travers le monde des sous-types du VIH-1 du groupe M d'après Los Alamos HIV Sequence Database (www.hiv.lanl.org)



b) conséquences de la variabilité

Suite à l'infection par le VIH-1, des essais de nouveaux virus contenant des séquences génomiques différentes sont continuellement produits à l'intérieur d'un même patient (Meyerhans et al., 1989). Beaucoup de ces virus ont un large spectre de tropisme viral et une augmentation de leur capacité cytotoxique. La population virale globale, chez une personne infectée par le VIH-1, sera dominée par les souches qui seront les plus compétitives à un instant donné. La complexité de ces essais de variants du VIH-1 a amené à parler de quasi-espèces virales (Goodenow et al., 1989).

La variabilité contribue à la génération de variants viraux intra-individuels, mais également de variants viraux inter-individuels, plus éloignés génétiquement. Ainsi, les souches du VIH-1, isolées à travers le monde, sont continuellement caractérisées quant à leur identité de séquence (www.hiv.lanl.gov). Le degré de divergence entre les génomes des différents isolats a conduit à une classification de ces souches : la variabilité intergroupe est comprise entre 30 et 40%, celle inter-sous-type comprise entre 10 et 20 % et celle intra-sous-type inférieure à 10%. Ainsi, parmi les virus VIH-1, il est possible de différencier trois groupes apparentés sur la base de leur séquence génétique : les isolats du groupe M (pour majoritaire) sont retrouvés à travers le monde alors que les virus des groupes O ("outlier") et N (non M non O) sont restreints à l'Afrique centrale et de l'Ouest. Dans le groupe M, à ce jour, 11 sous-types du VIH-1 (A à K) ont été répertoriés, ce sont les responsables majeurs de la pandémie de SIDA, (**Figure 6**). Par ailleurs, de multiples formes dites recombinantes de virus ont également été identifiées.

La plupart des connaissances sur l'infection par le VIH-1 dérivent d'études sur le sous-type B, majoritaire dans les pays occidentaux. De nombreuses études se focalisent désormais sur le sous-type C, prédominant en Afrique et en Inde, et le sous-type E, présent en Asie du Sud-Est. Les sous-types C et E sont actuellement les responsables majeurs de la pandémie.

c) impact du polymorphisme des sous-types du VIH-1 sur la réplication virale

L'impact du polymorphisme des sous-types du VIH-1 sur la dynamique de l'infection n'est toujours pas élucidé. Quelques études semblent néanmoins indiquer que le polymorphisme jouerait un rôle important.

Deux études ont montré qu'une progression plus lente vers la maladie est associée au sous-type A (Kaleebu et al., 2001; Kanki et al., 1999), et des différences de charge virale au pic de virémie peuvent être observées entre les sous-types B et C d'une part (Rinke de Wit et al., 2002), et les sous-types B et E d'autre part (Hu et al., 2001). Des différences dans

l'efficacité de transmission ont été aussi rapportées par différentes études, les sous-types A et C étant plus transmis *in utero* que le sous-type D (Blackard et al., 2001; Renjifo et al., 2003; Renjifo et al., 2001). De plus, d'autres études semblent confirmer le fait qu'il existe des différences de transmission liées aux sous-types : le sous-type B est associé de manière prédominante à une épidémie liée à l'injection de drogues et au contact homosexuel dans les pays occidentaux, alors que les sous-types C et E se sont répandus par contact hétérosexuel en Thaïlande, en Inde et en Afrique Sub-Saharienne. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le VIH-1 E se réplique plus efficacement que les virus des autres sous-types dans les cellules de Langerhans, cibles potentielles dans la transmission hétérosexuelle (Soto-Ramirez et al., 1996), mais ces données restent encore controversées (Dittmar et al., 1997; Pope et al., 1997). Des expériences de compétition entre différents sous-types du VIH-1 *ex vivo* ont montré que le VIH-1 B domine sur le VIH-1 C dans les LT CD4⁺ et les macrophages, mais que ces deux sous-types ont la même capacité à infecter les cellules de Langerhans (Ball et al., 2003).

Toutefois, au vu des paramètres divers agissant sur la réplication du VIH-1, des études multiparamétriques doivent être réalisées afin d'élucider si les sous-types du VIH-1 ont des propriétés biologiques différentes conduisant à des variations dans la progression vers la maladie ou dans des réponses différentes à un éventuel vaccin.

d) mesure de l'impact de la variabilité sur la réplication virale

Le "fitness" viral est un terme définissant l'adaptation répliquative d'un organisme à son environnement, c'est-à-dire la capacité d'une souche de VIH-1 donnée à se multiplier dans son environnement (voir pour revue (Domingo and Holland, 1997; Quinones-Mateu and Arts, 2001)). Le "fitness" est la résultante de plusieurs facteurs : non seulement la capacité du virus à se répliquer, mais aussi son adaptation à l'hôte, ses capacités à échapper au système immunitaire et à se maintenir chez l'individu. Au sein d'un même individu, la population virale est constituée de multiples souches génétiquement proches, formant des quasi-espèces virales. Au sein d'une quasi-espèce virale donnée, chaque souche est définie par son "fitness", représentatif de ses propriétés virales (par exemple activité, stabilité...). Ces souches sont en constante compétition pour croître dans un environnement complexe. Les souches, dont l'activité et la stabilité sont maximales dans le contexte du moment, sont sélectionnées et vont devenir majoritaires dans la population virale. Ainsi, durant la réplication virale, un ou plusieurs membres d'une quasi-espèce virale vont être plus adaptés à un micro environnement particulier (sélection positive), alors que dans un autre contexte environnemental, ils seront éliminés (sélection négative). En résumé, la population virale est

donc en évolution dynamique permanente sous l'effet de la croissance virale, de la compétition entre les souches et des pressions de sélection diverses (système immunitaire, traitement anti-rétroviral...).

Il existe différentes façons de mesurer le “ fitness ” viral. *In vitro* ou *ex vivo*, dans le cadre de mono-infections, les cinétiques de réplication virale permettent de mesurer le niveau de production virale au cours du temps et de le comparer entre deux ou plusieurs virus. Toutefois, dans la plupart des cas, ce type d'expérience ne permet de discerner que des changements majeurs dans les capacités répliquatives des virus. Des différences phénotypiques subtiles entre des variants proches peuvent être masquées lors de ces expériences. La compétition virale est une méthode plus fine et plus sensible. Il s'agit d'infecter des cultures cellulaires ou tissulaires avec deux ou plusieurs souches virales, qui vont entrer en compétition pour les mêmes ressources vitales, dans le même environnement. La souche la mieux adaptée va alors rapidement dominer sur les autres souches. Cette procédure expérimentale est la méthode la plus couramment employée pour déterminer le “ fitness ”. On peut bien sûr critiquer le fait que la complexité et la multitude de micro-environnements, dans lesquels ces souches se répliquent *in vivo*, ne soient pas forcément reproductibles *in vitro*. Par ailleurs, un risque majeur dans les expériences de compétition est la recombinaison entre les génomes des deux souches dont on veut déterminer le “ fitness ” viral. Néanmoins, dans ces expériences, la mixité virale entre souches plus ou moins proches génétiquement, caractérisant l'infection *in vivo*, est reproduite *in vitro*.

La détermination du “ fitness ” viral *in vivo* est beaucoup plus complexe, du fait de la multitude d'environnements au sein de l'organisme, où le virus peut se répliquer. On retrouve en littérature deux études de compétition *in vivo* entre différentes souches du VIH-1 qui analysent l'impact du tropisme lié au polymorphisme de l'enveloppe virale sur la pathogénèse du VIH-1 (Harouse et al., 2003; Wolinsky et al., 2004). D'une part, l'infection de macaque rhésus, en intraveineux ou intravaginal, avec un mélange de SIV portant une enveloppe du VIH-1 (SHIV) conférant un tropisme R5 et de SHIV de tropisme X4, a permis de déterminer les événements conduisant à la prédominance du virus de tropisme R5 dans la cinétique de l'infection (Harouse et al., 2003). Ainsi, l'apparition d'une immunité spécifique du virus conduit à la prédominance du virus de tropisme R5, et lors de la déplétion des LT CD8⁺, le virus de tropisme X4 ré-émerge. D'autre part, une autre étude sur l'utilisation d'une molécule inhibitrice spécifique de CCR5 a mis en évidence dans des macaques rhésus infectés par un mélange de SHIV de tropisme R5 et X4 que l'administration de cette molécule inhibitrice bloque la réplication du virus de tropisme R5. En parallèle, la charge virale X4 dans ces

singes augmente mais de façon transitoire les 5 premiers jours suivant le traitement, puis revient à son niveau d'avant traitement et persiste sur un mois d'étude (Wolinsky et al., 2004). Cette molécule pourrait ainsi être intéressante à utiliser dans des traitements HAART, car les traitements HAART sont plus efficaces contre des virus de tropisme X4 que R5 (Philpott et al., 2001).

L'infection par le VIH-1 est la cause du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Cette infection représente de nos jours une des premières causes de mortalité à travers le monde et continue à se répandre rapidement, principalement à travers des contacts hétérosexuels dans les pays en voie de développement. Le VIH-1 est un rétrovirus qui se réplique dans différents types cellulaires du système immunitaire. L'entrée virale requiert la présence, à la surface de la cellule cible, de la molécule CD4 et d'un récepteur aux chimiokines, définissant le tropisme viral lié à l'enveloppe (R5 ou X4). Le niveau de réplication du virus dépend de l'état d'activation de la cellule qu'il infecte et des facteurs de transcription disponibles à l'intérieur de cette cellule. Le VIH-1 est extrêmement variable génétiquement. L'impact de cette variabilité sur les capacités de réplication du virus dans un contexte environnemental donné, ou "fitness", n'est pas clair à ce jour et peut-être évalué par des expériences de compétition virale *ex vivo* et *in vivo*.

B. Le LTR : Structure

Le LTR est un des éléments clefs des différentes étapes du cycle viral : transcription inverse, intégration, et transcription du génome proviral. Lors de toutes ces étapes, le LTR sert de point de convergence pour les facteurs de transcription et les éléments de la machinerie transcriptionnelle de la cellule hôte, ainsi que pour des protéines codées par le virus. Ces éléments vont augmenter ou moduler l'activité du LTR, et par conséquent l'expression de l'ARN et des protéines du virus. Les éléments qui interagissent avec le LTR vont différer par leur concentration selon le type cellulaire infecté, selon l'état de différenciation, d'activation et de progression à travers le cycle cellulaire de la cellule hôte infectée (voir pour revue

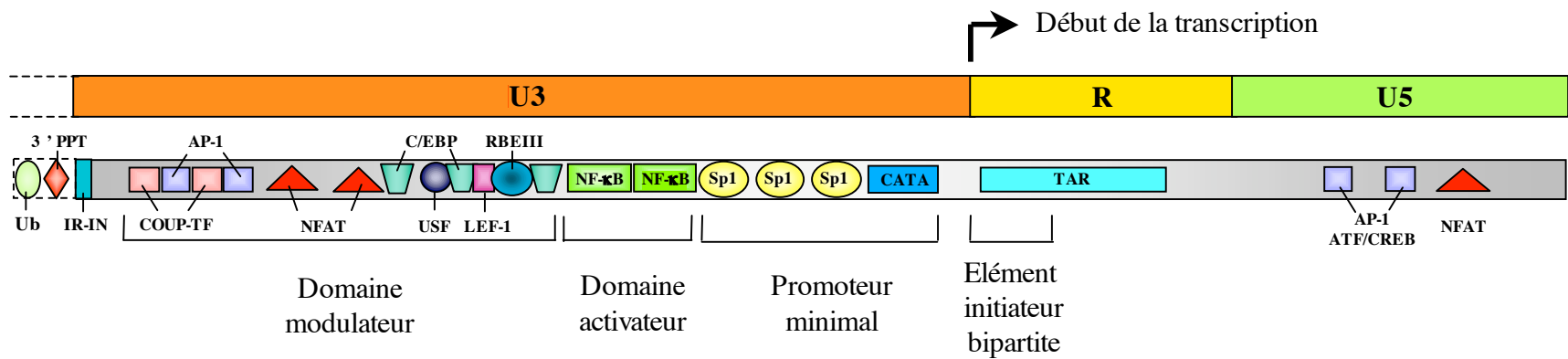


Figure 7 : Représentation schématique du LTR du VIH-1 B

Légende: Ub: Uracile box, 3' PPT: Polypurine tract en 3', IR: Inverted repeat, IN: signal d'intégration

(Cullen, 1991; Gaynor, 1992; Jones and Peterlin, 1994; Kingsman and Kingsman, 1996; Krebs et al., 1999; Pereira et al., 2000)).

Les événements physiopathologiques associés à une infection par le VIH, ou tout autre lentivirus, requièrent une propagation efficace du virus dans tous les types cellulaires supportant l'infection. Les LT CD4⁺, les macrophages, les cellules dendritiques, les monocytes et la microglie sont susceptibles à l'infection par le VIH-1 et le VIS. Une progression productive à travers le cycle de réplication virale requiert une expression suffisante des gènes de structure et de régulation virale, ce qui en définitive nécessite une activation adéquate du LTR dans les cellules infectées. Les interactions multiples entre le LTR viral et les facteurs de transcription cellulaires, exprimés à des niveaux variables suivant la nature et l'état du compartiment cellulaire infecté, vont moduler la latence et la virulence du VIH-1.

L'état d'activation du promoteur du LTR a un impact direct sur (a) l'infection productive de la cellule hôte, (b) l'expression virale et l'assemblage des virions suffisant pour induire une charge virale associée à la pathogenèse et à la progression vers la maladie, (c) la transition d'un état de latence de l'expression virale à une infection hautement productive, et (d) la production de virus à un niveau suffisant pour permettre une dissémination dans l'organisme, incluant la circulation périphérique, le système lymphatique, le cerveau et les poumons.

A partir du génome d'ARN simple brin, le processus de transcription inverse conduit à la formation, à chaque extrémité de l'ADN proviral, de deux LTR identiques, chacun comprenant une région U3, R et U5 (**Figure 7**). Les extrémités de chaque LTR participent par la suite à l'intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte. Une fois le provirus intégré, le LTR en 5' sert de promoteur pour l'intégralité du génome viral, tandis que le LTR en 3' fournit le site de polyadénylation pour le nouveau transcrit d'ARN viral. A la différence du LTR en 5' séparé de toute phase codante, l'extrémité 5' de la région U3 du LTR en 3' chevauche la phase ouverte de lecture du gène *nef*. La description de la structure du LTR sera basée sur celle du VIH-1 de sous-type B (VIH-1 B), virus majoritaire en Europe et en Amérique du Nord et le mieux décrit. Les polymorphismes du LTR d'autres sous-types d'intérêt du VIH-1 du groupe M feront l'objet du chapitre I.C.

Le LTR du VIH-1 B a une taille de 634 pb (U3 (nt -453 à -1), R (nt +1 à +98) et U5 (nt +99 à +180)) (Starcich et al., 1985; Wain-Hobson et al., 1985).

1) La région unique 3'

La région U3 est riche en sites de fixation de facteurs de transcription. De nombreuses revues détaillent la liste (croissante) des facteurs de transcription qui interagissent avec le LTR, leurs sites respectifs de fixation, et d'autres facteurs cellulaires et viraux impliqués dans la régulation de l'activité du LTR du VIH-1 (Cullen, 1991; Gaynor, 1992; Jones and Peterlin, 1994; Kingsman and Kingsman, 1996; Pereira et al., 2000).

La région U3 est sous-divisée en trois domaines en fonction de l'impact des sites de fixation de facteurs de transcription sur l'activité du LTR et sur l'expression des gènes viraux. Ces domaines sont désignés de 3' vers 5' en promoteur minimal (nt -78 à -1), activateur (nt -105 à -79) et modulateur (nt -453 à -105) (Roebuck and Saifuddin, 1999).

a) le domaine promoteur minimal

La région promotrice minimale est composée d'une boîte CATA, d'un élément initiateur et de trois sites de fixation de Sp1. Ces éléments agissent de concert pour générer la transcription basale du virus. Ce domaine représente également la séquence minimale requise pour la trans-activation par la protéine virale Tat.

i) la boîte CATA

Le LTR du VIH-1 contient une boîte TATA, localisée 25 pb en amont du site d'initiation de la transcription. Il apparaît maintenant que la position de la boîte TATA soit controversée. En effet, une étude récente de van Opijnen et collègues démontre que la boîte TATA est localisée deux nucléotides en amont ce qui conduit à une boîte CATA (van Opijnen et al., 2004b). La plupart des études menées sur cette boîte ont toujours englobé la région CATATAA. Par la suite, nous utiliserons donc la nomenclature boîte CATA.

La boîte CATA joue un rôle critique dans l'activation de l'expression des gènes du VIH-1 comme l'ont montré différentes études de mutagenèse. Des délétions ou des mutations dans la boîte CATA réduisent de manière drastique l'activité basale du LTR et altèrent la réplication virale dans des cultures cellulaires de tissus (Berkhout and Jeang, 1992; Garcia et al., 1989; Lu et al., 1989; Nabel et al., 1988; Olsen and Rosen, 1992).

La fonction de la boîte CATA est de recruter l'ARN polymérase II et des facteurs de transcription pour constituer un complexe de pré-initiation de la transcription (PIC). La première étape dans la formation du PIC est la fixation du facteur de transcription TBP (TATA Binding Protein) sur la boîte CATA, qui va ensuite recruter l'ARN polymérase II. C'est souvent l'étape critique limitante dans la transcription du génome viral par l'ARN

polymérase II cellulaire (Jones and Peterlin, 1994; Majello et al., 1998a). Cette fixation est essentielle pour la formation du PIC et l'activation de la transcription virale, et elle permet l'initiation de la transcription basale (Pendergrast et al., 1996; Xiao et al., 1997). Elle va entraîner une cascade d'interactions avec de nombreux autres facteurs dits associés à la TBP (TAFs). Les TAFs fonctionnent comme des protéines adaptatrices à travers des interactions protéine-protéine et sont requises pour médier la réponse à des protéines activant ou réprimant la transcription (Verrijzer and Tjian, 1996). Le complexe formé par TBP et les TAFs constitue le facteur de transcription général TFIID. Une fois TFIID formé, d'autres composants sont recrutés : ainsi, TFIIB et TFIIF s'associent à la polymérase, puis les facteurs d'élongation TFIIE et TFIIH sont recrutés. TBP interagit également avec Tat et sa coopération avec cette protéine virale est essentielle pour la trans-activation du LTR du VIH-1 (Kashanchi et al., 1996; Kashanchi et al., 1994; Majello et al., 1998b; Veschambre et al., 1995). C'est la balance entre la formation de complexes TBP/ARN polymérase II et TFIID/ARN polymérase II qui dicte le niveau de transcription, basale versus activée.

La boîte CATA joue donc un rôle clef dans la régulation de l'expression des gènes du VIH-1.

ii) l'élément initiateur

En aval de la boîte CATA se trouve un initiateur bipartite, qui détermine le site d'initiation de la transcription (Bielska et al., 1989; Rittner et al., 1995; Zenie-Gregory et al., 1993). L'initiateur du VIH-1 est composé de deux éléments localisés entre les nucléotides -6 et +30, ces deux éléments étant nécessaires pour une initiation correcte de la transcription (Zenie-Gregory et al., 1993). Cet initiateur diffère d'autres éléments initiateurs aussi bien viraux que cellulaires, car il est strictement dépendant de la présence et du positionnement correct de la boîte CATA, ce qui suggère que l'interaction entre l'initiateur et la boîte CATA est critique pour une initiation correcte de la transcription. De plus, d'autres boîtes CATA et d'autres éléments initiateurs ne peuvent pas fonctionnellement se substituer aux éléments du VIH-1, ce qui montre ainsi que les éléments du VIH-1 ont évolué pour promouvoir de manière spécifique la transcription virale, probablement en coopération avec la trans-activation par Tat (Berkhout and Jeang, 1992; Olsen and Rosen, 1992).

iii) les sites de fixation de Sp1

Immédiatement en amont de la boîte CATA, se trouve un segment du promoteur riche en bases G et C, qui contient trois sites de fixation pour le facteur de transcription ubiquitaire

Sp1 (Garcia et al., 1987; Jones et al., 1986). Sp1 est un facteur de transcription qui contient trois motifs de type “doigts de zinc” qui sont critiques pour sa fixation à l’ADN, ainsi que des motifs de dimérisation et de multimérisation (voir pour revue (Cook et al., 1999; Kaczynski et al., 2003)). La fixation de Sp1 sur son site induit sa phosphorylation par des kinases cellulaires associées à l’ADN. Les trois sites de fixation de Sp1 dans le LTR du VIH-1 permettent l’interaction des facteurs Sp1 entre eux et avec d’autres facteurs de transcription pour activer l’expression des gènes du VIH-1.

Sp1 est critique pour la transcription basale et activée par Tat du LTR viral (Kamine and Chinnadurai, 1992; Kamine et al., 1991; Sune and Garcia-Blanco, 1995; Yedavalli et al., 2003). La mutation d’un ou deux sites de fixation de Sp1 dans le LTR entraîne une diminution modérée de l’expression basale et médiée par Tat des gènes viraux, alors que la mutation des trois sites de fixation élimine la capacité des protéines Sp1 à stimuler la transcription *in vitro* du LTR du VIH-1. Ainsi, la mutation des sites Sp1 diminue aussi bien l’activité promotrice basale que la réplication virale dans certains types cellulaires (Harrich et al., 1989; Parrott et al., 1991; Ross et al., 1991). De plus, il existe une corrélation entre le nombre de copies de sites de fixation de facteurs de transcription agissant en *cis* et une activation accrue du LTR. Ainsi, des études montrent que la duplication des sites de fixation de Sp1 conduit à un accroissement de l’activité du LTR, et ainsi à un meilleur taux de réplication du virus (Berkhout et al., 1999; Koken et al., 1992; Rousseau et al., 1997).

Par ailleurs, Sp1 agit de concert avec des facteurs viraux. D’une part, il coopère avec la boîte CATA, car un accroissement de la distance entre les sites Sp1 et la boîte CATA conduit à une abolition de la réplication du VIH-1 (Huang and Jeang, 1993). D’autre part, Sp1 coopère également avec Tat durant la trans-activation (Jeang et al., 1993; Williams et al., 1996), cette interaction augmentant la phosphorylation de Sp1 par des kinases dépendantes de l’ADN. Ces interactions coopératives entre Sp1, TFIID et Tat indiquent que l’arrangement topologique des trois facteurs au niveau du promoteur est critique pour l’expression du VIH-1.

b) le domaine activateur

En amont des sites Sp1 se trouvent des éléments activateurs, définis par deux copies du site de fixation de 10 pb du facteur de transcription inductible NF- κ B (Gaynor et al., 1988; Nabel and Baltimore, 1987). La fixation de NF- κ B, en réponse à une variété de signaux d’activation cellulaire, entraîne une augmentation de la transcription du LTR. Les membres de la famille NF- κ B (NF- κ B1 (p50/p105), NF- κ B2 (p52/p100), RelA (p65), RelB et c-Rel) se

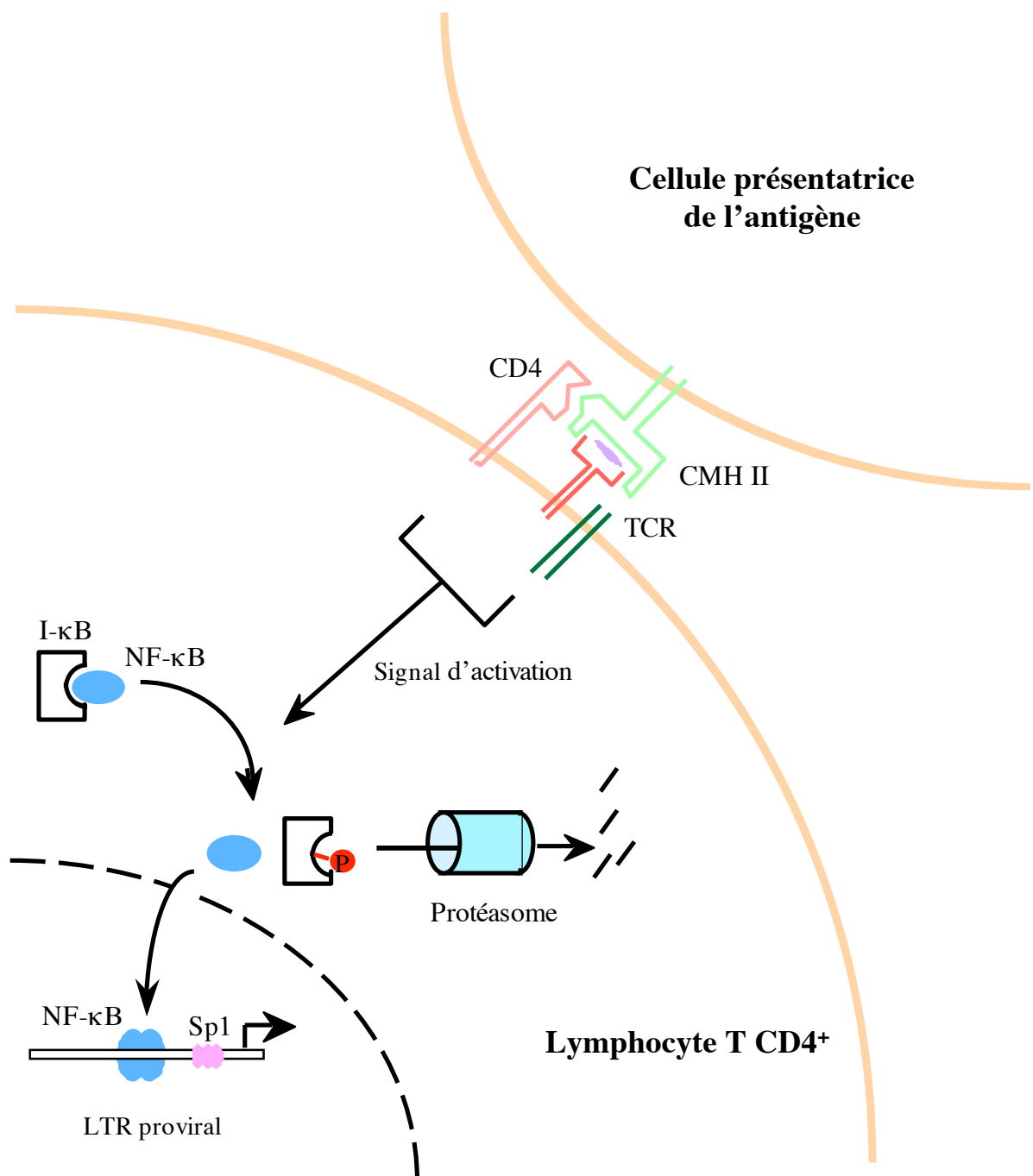


Figure 8 : Activation de la transcription virale suite à la migration du facteur de transcription NF-κB dans le noyau du fait de la stimulation du lymphocyte T CD4⁺ par la cellule présentatrice de l'antigène

fixent sous forme d'homo- ou hétéro-dimères sur les éléments activateurs du VIH-1, et certaines combinaisons de sous-unités NF- κ B sont préférées pour la trans-activation par Tat (p50-p65) (Liou and Baltimore, 1993). Dans les cellules au repos, les facteurs de transcription NF- κ B sont séquestrés dans le cytoplasme et sont liés à I- κ B, une protéine inhibitrice cytoplasmique (Schmitz and Baeuerle, 1995). L'activation des LT entraîne la phosphorylation et la dissociation d'I- κ B, qui va être dégradée par le protéasome, et permet ainsi la translocation des protéines NF- κ B dans le noyau de ces cellules, où elles pourront activer l'expression de gènes cellulaires mais également viraux comme ceux du VIH-1 (**Figure 8**).

Bien que la fixation de NF- κ B sur les éléments activateurs entraîne une augmentation de l'expression du VIH-1 dans les LT et les macrophages, les sites NF- κ B ne sont pas essentiels pour la réplication du VIH-1 (Chen et al., 1997; Leonard et al., 1989) et serviraient principalement à moduler le taux de transcription du VIH-1 durant l'activation cellulaire. Cependant, il existe déjà dans les lignées cellulaires un haut niveau d'activité basale du LTR du VIH-1, qui est augmentée lors de la stimulation par NF- κ B, mais qui n'est pas dépendante de cette stimulation. Au contraire, l'activation par NF- κ B est un pré-requis pour la réplication du VIH-1 dans les LT au repos et les monocytes/macrophages, où le LTR est inactif. Ainsi, la délétion des sites NF- κ B diminue aussi bien l'activité basale du LTR que celle trans-activée par Tat (Berkhout and Jeang, 1992; Gaynor et al., 1988). Par ailleurs, les sites de fixation de NF- κ B peuvent fonctionnellement se substituer aux sites Sp1, lorsque ces derniers sont délétés, et permettent ainsi l'activation de la transcription du LTR dans certains types cellulaires (Parrott et al., 1991). Les éléments activateurs du LTR sont stimulés par des cytokines pro-inflammatoires, incluant le TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha), l'IL-1 β et l'IL-6 (Duh et al., 1989; Granowitz et al., 1995; Israel et al., 1989; Li et al., 1997; Mellors et al., 1991; Poli et al., 1990; Poli et al., 1994), ainsi que par des stimuli mitogéniques (Kaufman et al., 1987) ou des invasions par des microorganismes (Ghassemi et al., 1999). Tat peut elle-même activer NF- κ B, formant ainsi une boucle de régulation positive pour augmenter et soutenir la transcription virale (Biswas et al., 1995; Li et al., 2001; Westendorp et al., 1995).

Les éléments activateurs requièrent des coopérations de type protéine-protéine. Pour activer la transcription virale, NF- κ B coopère aussi bien avec les sites de fixation adjacents de Sp1 (Perkins et al., 1993) qu'avec les éléments se fixant à la boîte CATA (Paal et al., 1997; Schmitz et al., 1995). La coopération avec Sp1 est hautement spécifique (Perkins et al., 1994). La coopération avec les éléments fixant la boîte CATA est médiée par des interactions avec TBP et plusieurs TAFs.

Par ailleurs, une autre famille de facteur de transcription, impliqué dans l'activation des cellules T, NFAT (nuclear factor of activated T cells), peut se fixer aux sites de fixation de NF- κ B au niveau du domaine activateur du VIH-1 et conduire à la trans-activation du LTR du VIH-1 (Cron et al., 2000). NFAT est un facteur de transcription inductible relié à la famille NF- κ B (Rao et al., 1997). Il est régulé par la calcineurine, une phosphatase calcium/calmoduline-dépendante. La calcineurine contrôle la translocation des protéines NFAT du cytoplasme au noyau des cellules activées. NFAT est présent dans la plupart des cellules du système immunitaire et peut interagir avec le facteur de transcription AP-1 {Macian, 2001 #106}. Il joue un rôle important dans la régulation du VIH-1, notamment dans les LT CD4⁺ CD45RO⁺ mémoires (Robichaud et al., 2002). Il a été montré que NFAT1 se fixe à ces sites sous forme d'homodimère et occupe le site NF- κ B, suggérant une fixation mutuellement exclusive et une trans-activation alterne entre ces deux facteurs de transcription (Giffin et al., 2003). NFAT régule aussi l'infection par le VIH-1, en enlevant le blocage de la transcription inverse dans les cellules T au repos (Kinoshita et al., 1998). Le VIH-1, et particulièrement Tat et Nef, peuvent conduire à une augmentation de l'expression de NFAT et de son activité (Manninen et al., 2000; Pessler and Cron, 2004). Cette régulation réciproque entre le virus et le facteur de transcription crée potentiellement une boucle de régulation positive, qui pourrait faciliter l'établissement de l'infection précoce du VIH-1, et, plus tard, la transition d'une infection latente à productive.

c) le domaine modulateur

Le domaine modulateur, situé en amont des sites NF- κ B, contient des sites de fixation pour de nombreux facteurs de transcription (voir pour revue (Pereira et al., 2000)) : RBF-2 (qui se fixe sur le site RBEIII pour RBF binding element III) (Bell and Sadowski, 1996), C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) (Tesmer et al., 1993), AP-1 (activator protein 1) (Canonne-Hergaux et al., 1995), ATF/CREB (activating transcription factor/cyclic AMP response element binding) (Schwartz et al., 1997), LEF-1 (lymphocyte enhancer factor) (Sheridan et al., 1995), NFAT (Shaw et al., 1988), COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription Factor) (Cooney et al., 1991), et USF (upstream stimulating factor) (Giacca et al., 1992).

Les premières études concernant le domaine modulateur ont suggéré que la fixation de facteurs de transcription dans cette région du LTR sert à moduler l'activité induite par les domaines promoteur minimal et activateur. En effet, des expériences *in vitro* ont montré que l'infection de lignées cellulaires lymphoïdes et myéloïdes par des souches du VIH-1 délétées

dans le domaine modulateur provoquait une augmentation de l'activité du LTR de 2 à 3 fois {Lu, 1990 #10;Lu, 1989 #9}. Elles ont conduit à la désignation de ce domaine comme un élément de régulation négative (NRE). Mais d'autres études ont montré que cette région, riche en sites de facteurs de transcription agissant en *cis*, supportait à la fois la répression et l'activation de l'activité du LTR (voir pour revue (Pereira et al., 2000)).

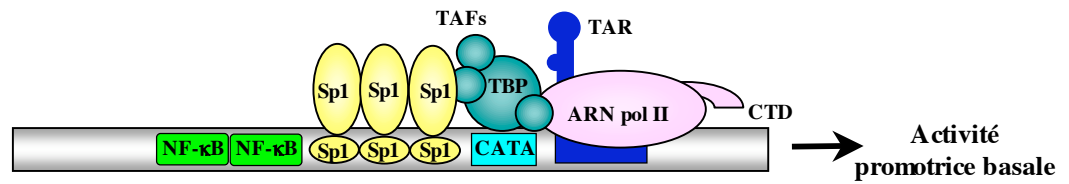
Des travaux *in vivo* sur des cohortes de patients infectés avec des souches du VIH-1 délétées dans la portion non-chevauchante de *nef* ont montré que ces souches évoluent vers des formes virales présentant des délétions successives et localisées dans le NRE (Kirchhoff et al., 1995). Ce phénomène révèle une corrélation entre la perte de fonction de *nef* et la perte successive de portions non essentielles du promoteur (Pohlmann et al., 1998). Toutefois, une autre interprétation est légitimement possible : pour retrouver l'équilibre perturbé par la perte d'une fonction positive en *cis* sur la transcription (celle de *nef*), le virus opère des délétions successives d'une fonction négative (NRE). A l'heure actuelle, les données *ex vivo* et *in vivo* ne permettent pas de choisir entre ces deux interprétations, et donc de définir clairement le rôle du NRE du VIH-1 au sein du promoteur viral. Il n'y a donc toujours pas de rôle clair pour cette région dans la réplication du VIH-1 et la pathogenèse associée, bien que la conservation de ce domaine, ainsi que le rôle fonctionnel démontré *in vivo*, témoigne de son importance dans la réplication virale.

2) La région répétée R

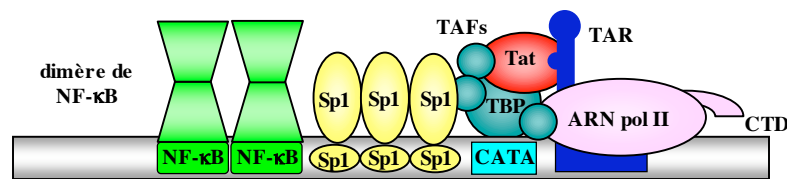
La région R est comprise entre le site d'initiation de la transcription (jonction entre U3 et R) et la séquence de polyadénylation (jonction entre R et U5).

Dans la région R se trouve une séquence d'ARN, correspondant à l'élément de réponse à la trans-activation (TAR), localisée juste en aval du site d'initiation de la transcription. La région TAR est non traduite et est hautement conservée (Berkhout et al., 1989). Elle forme une structure stable tige-boucle consistant en une tige de 26 paires de nucléotides et une boucle de 6 nucléotides. Un renflement de 3 nucléotides, localisé dans la partie supérieure de la tige et en 5' de la boucle, interagit avec la protéine virale Tat (Roy et al., 1990a). La tige et la boucle contiennent des sites de fixation de facteurs de transcription cellulaires qui coopèrent avec Tat pour activer l'expression des gènes du VIH-1. Des analyses de délétion dans la région R entre les nucléotides +19 et +43 ont montré que la région TAR est nécessaire à l'activité de Tat (Hauber and Cullen, 1988; Muesing et al., 1987). De plus, des délétions du renflement ainsi que toutes les mutations qui empêchent l'appariement de la région TAR avec Tat, qui augmentent l'espace entre le renflement et la boucle, ou qui

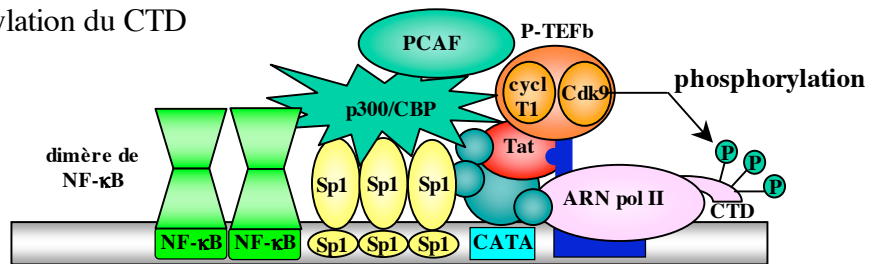
a) initiation de la transcription



b) production de Tat et fixation au TAR



c) phosphorylation du CTD



d) élongation de la transcription

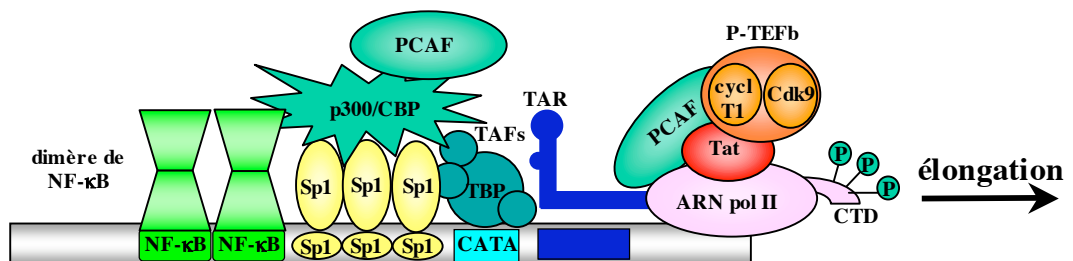


Figure 9 : Tat et la transcription virale

Légende: CTD:domaine carboxyterminal, cyclT1: cycline T1

déplacent le renflement en 3' de la boucle, abolissent la transcription médiée par Tat (Berkhout and Jeang, 1989; Berkhout and Jeang, 1991; Huthoff and Berkhout, 2001; Klaver and Berkhout, 1994; Roy et al., 1990b). L'attachement de Tat à la région TAR permet à Tat d'interagir avec la machinerie de transcription basale (Berkhout et al., 1990).

La régulation de l'expression des gènes du VIH-1 par la protéine trans-activatrice Tat est une étape critique dans le cycle de vie du virus. Tat est une protéine virale essentielle qui est exprimée dans la phase précoce de l'infection à partir d'ARNm viraux doublement épissés (cf. chapitre I.A.2). Elle agit comme un facteur de transcription et interagit avec la région TAR localisée à l'extrémité 5' de tous les transcrits viraux. En l'absence de Tat, l'activité basale du promoteur génère des transcrits courts et des transcrits permettant la synthèse de Tat. Tat se fixe ensuite sur la région TAR de ces transcrits, induit un changement au niveau du complexe de pré-initiation de la transcription, conduisant alors à la production de longs transcrits. Tat permet ainsi de passer d'une transcription non processive à processive. Cette transition est critique pour permettre une transcription efficace et rapide du génome, requise pour le passage de l'infection virale d'un état quiescent à actif.

La protéine virale Tat agit sur la transcription à deux niveaux. Elle influe sur l'initiation de la transcription, par l'augmentation du recrutement de l'ARN polymérase II au site d'initiation de la transcription, et elle agit également sur l'efficacité d'élongation de la transcription (Marcello et al., 2001) (**Figure 9**). L'augmentation de l'élongation de la transcription est une conséquence de l'interaction de Tat avec la cycline T1, composant de P-TEFb (positive transcription elongation factor b), qui permet le recrutement au complexe Tat/TAR/cyclineT1 de la kinase Cdk9, elle-même composant de P-TEFb. Cette kinase va alors phosphoryler le domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II pour augmenter sa processivité (Bieniasz et al., 1998; Bieniasz et al., 1999; Ivanov et al., 1999; Romano et al., 1999). L'activation de la transcription du LTR induite par Tat est concomitante au recrutement de la protéine p300/CBP (CREB binding protein) au niveau du LTR. Cette protéine agit au niveau de l'initiation de la transcription en liant la machinerie de transcription basale avec des activateurs transcriptionnels tels que p300/CBP-associating factor (PCAF). L'acétylation de Tat par p300/CBP est importante pour l'activation transcriptionnelle du promoteur du VIH-1 aussi bien pour l'initiation de la transcription que pour l'élongation (Bres et al., 2002; Hottiger and Nabel, 1998; Kiernan et al., 1999; Ott et al., 1999).

3) La région unique 5'

La région unique 5' (U5) contient également des sites de fixation de facteurs de transcription, notamment deux sites AP-1-ATF/CREB (nt +95 et +160) et un site NFAT (Al-Harthi and Roebuck, 1998). Cette région, tout comme la région R, est transcrite mais non traduite. Elle est beaucoup moins étudiée que les autres régions du LTR.

AP-1 est composé d'hétérodimères Jun (c-Jun, JunB, et JunD)/Fos (c-Fos, FosB, Fra1, et Fra2) ou d'homodimères Jun/Jun, et fixe un site nommé TRE (TPA/PMA responsive element). Les sites de fixation d'AP-1 en aval du site d'initiation de la transcription sont également similaires à CRE, l'élément de réponse à l'AMPc (AMP cyclique) qui fixe les facteurs de transcription de la famille ATF/CREB. ATF/CREB et AP-1 sont des phosphoprotéines nucléaires inductibles qui se dimérisent par le biais de leur domaine de type "fermeture éclair de leucine". Les sites TRE fixent AP-1 et répondent à la stimulation par des phorbol esters et par le TNF α , via la voie de signalisation de la protéine kinase C (PKC). Les sites CRE fixent les protéines ATF/CREB et répondent à la stimulation par l'AMPc via l'activation de la protéine kinase A (PKA). Mais la distinction entre ces deux voies d'activation n'est plus aussi claire depuis qu'il a été montré que les membres de la famille Jun/Fos pouvaient se combiner avec des membres de la famille ATF/CREB, via leur domaine de dimérisation de type "fermeture éclair de leucine" (Rabbi et al., 1997b; Roebuck et al., 1993).

Des études *in vitro* sur des lignées cellulaires épithéliales ont montré que les deux sites de fixation TRE et CRE pouvaient médier la transcription du LTR du VIH-1 en l'absence d'éléments activateurs fonctionnels, et indépendamment de la trans-activation par Tat (Roebuck et al., 1993). Les sites TRE/CRE fixent à la fois AP-1 et ATF/CREB. Ils permettent l'induction du LTR du VIH-1 aussi bien par le biais des signaux d'activation de PKC que de PKA, ces deux types de signaux pouvant également agir en synergie (Kagnoff and Roebuck, 1999; Rabbi et al., 1997a). Par ailleurs, il a été montré que l'infection de cellules hôtes par le VIH-1 active la voie AMPc/PKA et entraîne ainsi une augmentation rapide de l'activité nucléaire de fixation des facteurs ATF/CREB, ce qui suggère que le VIH-1 lui-même stimule des voies de transduction de signaux cellulaires pour favoriser sa propre réplication (Rabbi et al., 1997b).

Dans la région U5 se trouve également un site de fixation pour NFAT (Van Lint et al., 1997). La délétion de ce site ne conduit pas à une complète suppression de l'activité du LTR,

mais conduit à une forte augmentation de l'induction médiée par Tat sur l'activité du LTR (Romanchikova et al., 2003).

Les éléments agissant en *cis* de cette région semblent donc requis pour une activité optimale du promoteur et pourraient fournir, à travers une réponse à de multiples signaux cellulaires, les moyens pour rapidement induire une transcription du VIH-1 durant l'activation cellulaire.

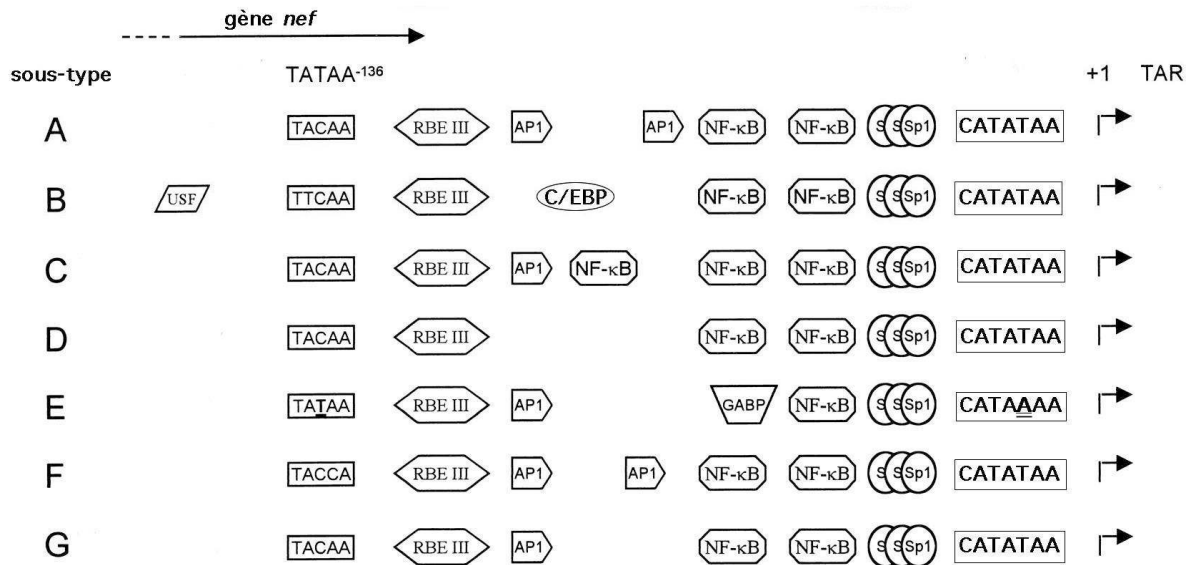
4) Les spécificités du LTR du VIS

Bien que le LTR du VIS soit similaire à celui du VIH-1, il existe des différences au niveau de cette région entre les deux virus. Le domaine promoteur minimal/activateur du VIS comporte notamment quatre sites Sp1 et un seul site de fixation de NF-κB.

Un nombre très limité d'études porte sur les régions du génome du VISmac correspondant à la portion NRE du promoteur du VIH-1. Toutefois, les travaux sur le sujet montrent qu'*in vivo*, dans le contexte du VISmac239, le rôle du NRE sur la dynamique virale apparaît comme marginal. En effet, la délétion d'une grande portion de la région de U3 chevauchant le gène *nef* n'a pas d'impact sur la fonction promotrice du LTR (Chakrabarti et al., 2003; Ilyinskii et al., 1994). Les données *in vivo* relatives à l'évolution de la région NRE du VISmac239 montrent que des remaniements dans cette portion du promoteur n'ont pas d'incidence sur l'activité promotrice de U3 (Chakrabarti et al., 2003). De plus, l'équipe de Kirchoff et la nôtre ont construit un virus basé sur le génome du VISmac239 dans lequel la région promotrice est réduite au promoteur minimal/activateur (Centlivre et al., 2005; Munch et al., 2001). Ce virus se réplique de façon similaire au virus parental sauvage VISmac239 aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans le macaque rhésus. Ces résultats confirment donc que, dans le VIS, la région NRE ne semble pas avoir d'impact sur la fonction promotrice du LTR.

De la même façon, des clones moléculaires du VIS, délétés dans les éléments Sp1 ou NF-κB, sont capables de se répliquer efficacement dans des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC). Cependant, ces mutants sont incapables de se répliquer dans les lignées monocytaires/macrophagiques. Ainsi, Sp1 et NF-κB sont nécessaires pour la réplication dans les monocytes/macrophages mais dispensables à une réplication dans les lymphocytes (Ilyinskii and Desrosiers, 1996). Une souche mutante pour les sites Sp1 et NF-κB se réplique à un niveau comparable au virus parental dans des cellules lymphoïdes *in vitro* et conduit à un SIDA chez le macaque rhésus (Ilyinskii et al., 1997). Ces résultats obtenus pour le VIS contrastent avec le cas des variants du VIH-1 contenant des délétions dans tous les éléments Sp1 et NF-κB et qui ne se répliquent pas. Ainsi, dans le VIS, les séquences du LTR en amont

a)



b)

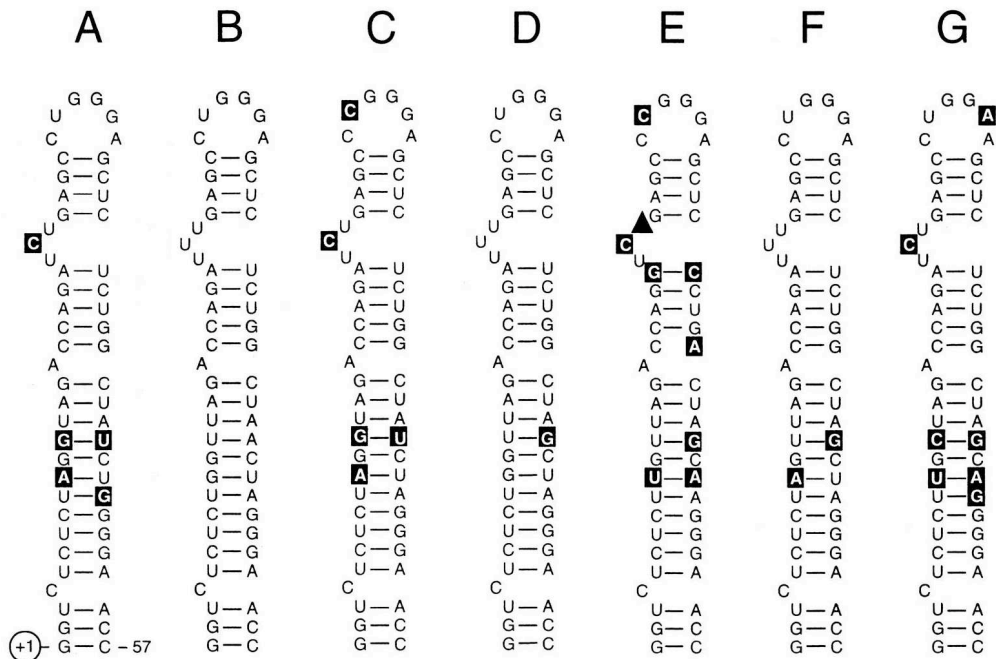


Figure 10 : Polymorphisme du promoteur (a) et du TAR (b) des sous-types du VIH-1 du groupe M (d'après Jeeninga et al, Journal of Virology, 2000)

Légende: ▲ délétion de 1 nucléotide

du site NF- κ B permettent la transcription virale en l'absence des domaines promoteur minimal et activateur (Pohlmann et al., 1998).

La profusion de sites de fixation de facteurs de transcription cellulaires au niveau du LTR du VIH-1 et du VIS, où réside le promoteur viral, fournit de nombreuses opportunités pour ces facteurs d'interagir avec le LTR. Ainsi, ils peuvent réguler le niveau d'activation du LTR dans des types cellulaires spécifiques, et dans des contextes différents de différenciation et d'activation cellulaire. De plus, l'activité de la protéine virale trans-activatrice Tat ajoute un niveau supplémentaire de complexité à la régulation de l'activité du LTR lors de la réplication virale. Par ailleurs, la redondance des sites de fixation de facteurs de transcription au niveau du LTR permet la réplication du VIH-1 dans un large spectre de cellules, en palliant à la déficience en facteur de transcription dans certains types cellulaires.

C. Influence du Polymorphisme du LTR sur la Réplication Virale

L'évolution du VIH-1 dans le temps se traduit par une constante génération de polymorphismes de séquences du génome viral, notamment au niveau du LTR. Ces variations de séquence du LTR peuvent par conséquent entraîner une modulation de l'expression des gènes viraux et conduire à des souches virales avec des capacités différentes de réplication.

De même, au cours de l'infection par le VIH-1, le génotype du VIH-1 et le phénotype résultant varient. Les quasi-espèces virales contiennent des modifications de séquence à travers tout le génome viral, y compris le LTR. Ces modifications peuvent être compartimentées suivant l'organe dans lequel le virus se réplique (cerveau, sang...).

1) Le polymorphisme des sous-types du VIH-1 et son impact sur la réplication virale

Le génome de différents sous-types du VIH-1 a été séquencé (Carr et al., 1998; Gao et al., 1998a; Gao et al., 1998b; Lole et al., 1999; Naghavi et al., 1999a). Des variations remarquables ont été observées au niveau de la séquence nucléotidique de la région du LTR (De Baar et al., 2000; Jeeninga et al., 2000). Chaque sous-type est en effet caractérisé par une configuration unique du LTR (**Figure 10**).

a) configuration des LTR sous-types-spécifiques

i) le domaine promoteur minimal

Tous les isolats possèdent une boîte CATA 27 pb en amont du site d'initiation de la transcription, mais le sous-type VIH-1 E est caractérisé par un variant de la boîte CATA (CATA~~AAA~~) (Montano et al., 1998; Montano et al., 1997). Les données disponibles quant à l'influence de cette mutation sur l'intégrité fonctionnelle de la boîte CATA du sous-type E restent encore controversées. Dans des expériences de retard de migration sur gel, la boîte CATA du sous-type E entre en compétition pour la fixation de TBP avec celle du sous-type B, ce qui laisse supposer que cette boîte fixerait le facteur TBP (Montano et al., 1997). Toutefois, l'assemblage du complexe TBP/TFIIB/CATA au niveau de la boîte CATA du sous-type E semble être moins efficace que celui du sous-type B (Montano et al., 1998). Une des hypothèses avancées est celle d'une adaptation en parallèle de la protéine Tat et de la région TAR, cette dernière possédant un renflement de 2 nucléotides au lieu de 3. Une autre étude montre que la boîte (CATA~~AAA~~) du sous-type E, bien que fonctionnelle, est moins adaptée que celle (CATATAA) des autres sous-types, et ce dans un contexte de virus entier (van Opijnen et al., 2004b).

De plus, un autre trait intéressant du sous-type E est la présence d'une boîte TATA en position -136 qui est absente de la séquence des autres sous-types à cette position. Il a été suggéré que cette boîte TATA₋₁₃₆ pouvait fonctionnellement remplacer la boîte CATA mutée, mais Jeeninga et collègues ont montré que des mutations de cette boîte TATA₋₁₃₆ n'entraînait aucune modification de l'activité du LTR, indiquant ainsi que cette boîte ne remplaçait pas fonctionnellement la boîte CATA et ne contribuait donc pas à l'activité du promoteur (Jeeninga et al., 2000).

Le nombre de sites de fixation pour les facteurs de transcription Sp1 localisés dans le domaine promoteur minimal de U3 reste inchangé selon les sous-types même si leur séquence nucléotidique peut légèrement varier d'un isolat à l'autre, plus particulièrement au niveau du site Sp1 III (le plus en amont de la boîte CATA) (Jeeninga et al., 2000; Naghavi et al., 1999b).

ii) le domaine activateur

Au niveau du domaine activateur, le nombre de sites de fixation pour NF-κB diffère selon les sous-types. En général, tous les sous-types possèdent deux sites de fixation pour ce facteur de transcription, exceptés les sous-types C et E.

Le sous-type C possède trois copies du site de fixation de ce facteur de transcription (NF- κ B I, II et III, I étant le plus proche du site d'initiation de la transcription). Les sites NF- κ B II et III du sous-type C s'alignent parfaitement avec les deux sites consensus du sous-type B, alors que le site NF- κ B I du sous-type C possède des mutations. Toutefois, il est peu probable que les trois sites fixent le facteur de transcription avec la même affinité : le site NF- κ B III, le plus en amont du site d'initiation de la transcription, est fonctionnel pour la fixation de NF- κ B comme le montrent des expériences de retard de migration sur gel (Lemieux et al., 2004; Naghavi et al., 1999a), alors que le premier site contient des mutations engendrant probablement une diminution de la capacité de fixation (Johansson et al., 1995; Montano et al., 1997; Naghavi et al., 1999a; Rodenburg et al., 2001; Salminen et al., 1996).

Le sous-type E ne possède qu'une copie du site de fixation de NF- κ B (Gao et al., 1996; Montano et al., 1997). Le deuxième site potentiel de fixation de NF- κ B, suite à une délétion d'une base T, correspond à un site de fixation pour le facteur de transcription GABP (GA binding protein), un facteur de transcription constitutif de la famille Ets (Verhoef et al., 1999). Ainsi, il y a une perte de fonction d'un site NF- κ B, mais aussi un gain de fonction avec une nouvelle spécificité.

iii) le domaine modulateur

Certains sites de fixation de facteurs de transcription dans le domaine modulateur montrent des variations sous-type-spécifiques tandis que d'autres sont plus conservés. Ces données sont souvent déterminées *in silico*, par l'utilisation de logiciels de prédiction de site de fixation de facteurs de transcription sur les séquences consensus de chaque sous-type.

Ainsi, le site RBE III est absolument conservé dans tous les sous-types (Estable et al., 1998; Estable et al., 1996; Jeeninga et al., 2000). Cet élément agissant *in cis* est le site de fixation pour RBF2 et est impliqué dans la réponse à la voie de signalisation des kinases tyrosines/Ras/Raf. Ce site est souvent dupliqué dans des isolats de patients.

Le site de fixation de USF, qui est chevauchant avec la protéine Nef, contribue à la fonction du LTR des virus de sous-type B (Giacca et al., 1992; Sieweke et al., 1998). Ce site n'est trouvé que dans la séquence du sous-type B (Hunt et al., 2001; Naghavi et al., 2001).

Il existe également des variations pour le site putatif de fixation de AP-1 juste en amont du site II de NF- κ B (Jeeninga et al., 2000). En effet, ce site n'est pas prédit dans la séquence du sous-type B ni dans celle du D, mais un site AP-1 est prédit dans les sous-types C, E et G, et deux sites AP-1 sont prédits dans les sous-types A et F.

La région -170 de U3 contient un motif spécifique pour le facteur de transcription C/EBP (NFIL6) dans le cas du sous-type B, mais ce motif est absent dans les sous-types A, C, D (Zacharova et al., 1997). Ce facteur trans-active le LTR dans les cellules d'origine monocyttaire (Henderson et al., 1995).

iv) le TAR

Chaque sous-type a une région TAR spécifique, avec des différences plus particulièrement dans le bas de la tige (Jeeninga et al., 2000). La plupart des changements sont des variations en paires de bases qui n'influent pas sur la structure secondaire. Le changement le plus marquant est la variation au niveau du renflement, site de fixation de Tat : le sous-type E est caractérisé par un renflement de 2 nucléotides alors que tous les autres sous-types ont un renflement de 3 nucléotides (Jeeninga et al., 2000; Montano et al., 1997). Toutefois l'existence d'un impact de ces modifications du renflement sur la liaison Tat-TAR n'est pas démontrée.

b) impact du polymorphisme sur la réplication virale

i) la force promotrice

De nombreuses études sur le LTR des sous-types du VIH-1 ont analysé la force promotrice du LTR à travers des essais en transfection transitoire, l'activité transcriptionnelle du LTR étant mesurée à l'aide de l'expression de gènes rapporteurs, tels que CAT (Chloramphénicol Acétyl Transférase) ou luciférase.

Tous les LTR des différents sous-types montrent une activité basale faible et un haut niveau de transcription médiée par Tat. Pourtant, des différences dans l'activité des différents promoteurs sont observées, plus particulièrement en absence de la protéine Tat. En effet, l'activité basale des sous-types non-B est plus élevée que celle du sous-type B, avec une transcription basale particulièrement élevée du sous-type C (Jeeninga et al., 2000; Naghavi et al., 1999b). Ces différences d'activité basale sont dépendantes du type cellulaire ; ainsi, dans la lignée cellulaire T SupT1, le sous-type E montre la plus forte activité basale. Ces différences spécifiques du type cellulaire utilisé, en terme de concentration et d'activité des facteurs de transcription interagissant avec le LTR, semblent être la source de cette activité basale différentielle selon les sous-types. En présence de Tat, tous les sous-types montrent une forte activité transcriptionnelle. Toutefois, lors de l'activation par différents agents de lignées cellulaires T, le sous-type E montre toujours la plus faible activation de son LTR, ce

qui est dû notamment à une faible association des facteurs de transcription NF- κ B et NFAT à sa région activatrice (Lemieux et al., 2004). Par ailleurs, les LTR des différents sous-types répondent de manière équivalente à une protéine Tat de sous-type B, il n'y aurait donc pas de différences majeures dans le mécanisme de trans-activation médiée par Tat parmi les différents sous-types (Jeeninga et al., 2000).

Roof et collègues ont démontré que la protéine Tat du sous-type E possède la plus forte capacité à trans-activer les LTR des sous-types B, C ou E (Roof et al., 2002). Ces résultats ne sont pas en accord avec ceux obtenus par Kurosu et collègues. Ces derniers ont montré que la protéine Tat du sous-type C présentait la plus forte capacité de trans-activation de la transcription du LTR dans des lignées cellulaires T CD4⁺ humaines, quel que soit le sous-type du LTR (B, C, E) utilisé dans les études (Kurosu et al., 2002). Cela est dû non pas à la séquence du LTR mais à celle de la protéine Tat. Ainsi, le LTR et la protéine Tat du sous-type C auraient tous les deux évolués pour accroître les capacités répliquatives de ce virus, ce qui pourrait ainsi être à l'origine de la prédominance du sous-type C dans la pandémie actuelle.

Etant donné le polymorphisme génétique entre les promoteurs du VIH-1, il n'est pas surprenant de trouver que les sous-types répondent différemment à des facteurs de transcription divers. Ainsi, le facteur de transcription NF- κ B va stimuler de manière différentielle les sous-types du VIH-1. De nombreuses analyses de transcription de gènes rapporteurs sous le contrôle du LTR ont montré que le sous-type C, qui contient trois sites NF- κ B au niveau du promoteur, possède une activité accrue de son LTR, comparativement aux sous-types dont les LTR ne comportent qu'un ou deux sites de fixation de NF- κ B (Montano et al., 1997; Naghavi et al., 1999b). De manière similaire, le TNF α , qui entraîne l'activation de NF- κ B consécutive à la phosphorylation et la dégradation de I- κ B, active le LTR du sous-type C de manière plus marquée que celui des sous-types A, B, D, F et G, avec la plus faible stimulation observée pour le LTR du sous-type E, aussi bien dans des lignées cellulaires T (Jurkat et SupT1) que dans les lignées monocytaires (THP1 et U937) (Jeeninga et al., 2000; Montano et al., 2000). Or, le TNF α est élevé chez les patients infectés, notamment au niveau du vagin (Belec et al., 1995). Ces résultats suggèrent donc que la présence de 3 sites de fixation de NF- κ B pourrait contribuer à la dissémination rapide du sous-type C comparée à celle des autres sous-types du VIH-1.

Des facteurs de transcription autres que NF- κ B sont également impliqués dans l'activation du LTR des 3 sous-types majoritairement étudiés B, C et E. Ainsi, dans le LTR du

sous-type E, les protéines GABP et les facteurs de transcription de la famille Ets sont actifs au niveau du site muté NF- κ B II. Ils permettent de compenser cette mutation, qui confère un avantage dans des lignées cellulaires avec une faible concentration en facteur de transcription NF- κ B (Verhoef et al., 1999). Ainsi, la perte ou le gain sous-type-spécifique de motifs peut être observé, comme dans le cas de USF, spécifique du sous-type B. Toutefois, il n'est pas encore très clair si les sous-types non-B possèdent un site USF au niveau de la région NRE car USF semble réprimer la transcription du VIH-1 de tous les sous-types non-B comme du sous-type B (Jeeninga et al., 2000; Naghavi et al., 2001).

L'étude de l'activité relative des LTRs des différents sous-types du VIH-1, réalisée *in vitro*, montre des variations dans leur activité. Toutefois, l'équipe de Berkhout a montré que la force d'un promoteur n'est pas corrélée avec une cinétique de réplication accrue (Marzio et al., 2002). Ainsi, bien que les sous-types du VIH-1 possèdent des LTR avec des forces promotrices différentes, il faut replacer le LTR dans un contexte de virus entier capable de se répliquer *in vitro* et *in vivo* pour pouvoir apprécier l'impact du polymorphisme sur la dynamique de la réplication virale.

ii) une réplication différentielle

Dans un contexte de virus entier ne différant que par le promoteur, il a été montré que le virus portant le LTR du sous-type C avait une plus forte activité transcriptionnelle que les virus portant les LTR des sous-types A, B, et D, cela se traduisant par l'augmentation de la concentration en protéine de capsid p24 dans le surnageant de cultures des cellules HeLa (Naghavi et al., 1999b).

Si on compare les cinétiques de réplication d'un virus de sous-type B LAI à celle d'un virus de sous-type B LAI portant un site GABP à la place du site NF- κ B II, c'est-à-dire portant un promoteur similaire à celui du sous-type E, on observe que le virus portant le site GABP a un avantage répliatif *in vitro* dans des cellules avec une faible concentration en NF- κ B, telles que les SupT1. Par contre, les deux virus ont la même cinétique de réplication dans d'autres types cellulaires T ou dans des PBMC activés (Verhoef et al., 1999). Au vu des résultats en mono-infection sur SupT1, il n'est pas étonnant de constater que le virus portant un LTR similaire au sous-type E prédomine sur le sous-type B lorsqu'ils sont en compétition dans ce même type cellulaire (Verhoef et al., 1999). Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de la cinétique de réplication d'un virus de sous-type B portant le promoteur minimal /activateur du sous-type E, comparé à celle du virus parental sauvage de sous-type B : le variant de sous-type B portant les éléments du promoteur minimal/activateur du sous-

type E se réplique plus rapidement dans les cellules SupT1 (Jeeninga et al., 2000). Ainsi, le promoteur sous-type-spécifique a un impact sur la réplication virale.

Van Opijnen et collègues ont affiné ces conclusions. Ce groupe a construit des virus isogéniques basés sur le génome viral du sous-type B LAI, mais portant les promoteurs/activateurs minimaux de différents sous-types du VIH-1. Ainsi, les virus obtenus ne diffèrent que par l'activité de leur LTR (van Opijnen et al., 2004a). Les cinétiques de réplication virale ont alors été réalisées dans différents types cellulaires éventuellement supplémentés par du TNF α et de la PHA (Phyto-hémagglutinine, mitogène entraînant l'activation non-spécifique des LT), afin de jouer sur le pool nucléaire de facteurs de transcription. Les résultats montrent que le changement d'environnement a un effet très marqué sur la réplication des différents sous-types du VIH-1.

Cependant, des différences phénotypiques subtiles entre des variants proches peuvent être masquées lors des cinétiques de réplication virale, et peuvent au contraire être mises en évidence lors d'expériences de compétition, où les virus doivent partager leurs ressources (Quinones-Mateu and Arts, 2001). En réalisant des compétitions entre les sous-types 2 à 2, il a été montré que le LTR des sous-types viraux engendre un " fitness " différentiel qui dépend de l'environnement cellulaire et qui peut changer de manière drastique (van Opijnen et al., 2004a). Ainsi, le virus portant le promoteur du sous-type E prédomine dans les cellules SupT1 sur tous les autres sous-types, mais dans le même environnement supplémenté par du TNF α , ce qui favorise alors l'augmentation du pool de NF- κ B nucléaire, ce même virus va être complètement dominé par les autres sous-types.

Ainsi, il semble bien que le polymorphisme sous-type spécifique ait un impact sur la réplication virale, mais cette question requiert de plus amples élucidations, pour vérifier notamment *in vivo* la relevance de ces expériences *in vitro*. Toutefois, les études *in vivo* sont extrêmement complexes car elles mettent en jeu des systèmes multifactoriels (Hu et al., 1999).

2) Le LTR, la lignée monocytaire/macrophagique et le système nerveux central

a) régulation de l'activité du LTR dans les monocytes/macrophages infectés

La différenciation des monocytes va conduire à la production de macrophages ne se divisant pas. Ces derniers peuvent servir de réservoirs au VIH-1 et de sources de production du virus après leur réactivation (Crowe et al., 2003; Herbein et al., 2002; Igarashi et al., 2001). Des études sur l'activité du LTR du VIH-1 dans les lignées monocytaires et les

macrophages primaires humains ont révélé l'extrême importance des sites de fixation, au niveau du LTR, du facteur de transcription C/EBP (Henderson and Calame, 1997; Henderson et al., 1996; Henderson et al., 1995; Lee et al., 2002). C/EBP fait partie d'une famille de facteurs de transcription de type "fermeture éclair de leucine". Bien que les protéines C/EBP soient exprimées dans une grande variété de tissus, leur expression dans les cellules d'origine hématopoïétique est principalement limitée à la lignée myéloïde, particulièrement durant la différenciation des monocytes en macrophages (Natsuka et al., 1992). Il existe trois sites de fixation de C/EBP dans le LTR du VIH-1 B : un site C/EBP (site I) est localisé juste en 5' du site NF- κ B II et juste en aval d'un site pour ATF/CREB. Deux autres sites C/EBP sont localisés plus en amont dans le domaine modulateur (site II et III) (Krebs et al., 1997; Krebs et al., 1998; Tesmer and Bina, 1996; Tesmer et al., 1993). C/EBP est un activateur important de la transcription basale et trans-activée par Tat du VIH-1 dans les monocytes et dans les macrophages, et n'est pas requis pour la transcription du LTR dans les LT CD4⁺ (Henderson and Calame, 1997). En outre, au moins un site C/EBP est nécessaire pour une activité transcriptionnelle normale du LTR du VIH-1 (Henderson et al., 1995). Par ailleurs, le facteur C/EBP qui se lie au site I interagit avec des facteurs qui lient le site adjacent ATF/CREB, ajoutant ainsi un niveau de complexité pour l'activité du LTR dans les lignées monocytaires et macrophagiques (Ross et al., 2001b). On peut se demander si les sites C/EBP agissent de façon similaire sur les différents sous-types du VIH-1, car le site C/EBP I n'est retrouvé que dans le LTR du sous-type B.

Ainsi, au moins trois familles de facteur de transcription cellulaire, C/EBP, NF- κ B et Sp1, interviennent dans l'activation de la transcription du LTR du VIH-1 dans les monocytes et dans les macrophages, et l'expression de C/EBP et NF- κ B est induite par l'activation de ces cellules (Asin et al., 2001; Griffin et al., 1989; Griffin et al., 1991).

b) régulation de l'activité du LTR dans le système nerveux

La compartimentation des séquences du LTR du VIH-1 a été démontrée. En effet, les séquences du LTR, dérivées du système nerveux de patients infectés par le VIH-1, sont distinctes des séquences du LTR de cellules infectées provenant du sang, des ganglions lymphatiques et des poumons (Ait-Khaled et al., 1995). De plus, les séquences du LTR, chez des patients survivants à long terme et qui possèdent des délétions de la région chevauchante de *nef* et du LTR, divergent également entre le sang et le fluide cébrospinal (Churchill et al., 2004). De plus, dans les virus isolés à partir du fluide cébrospinal, une duplication de sites

NF- κ B et parfois Sp1 est observée, et elle est associée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de ces virus.

Des études se sont focalisées sur le rôle des facteurs C/EBP dans le contrôle de l'activité du LTR dans le cerveau. Une étude a comparé les séquences du LTR dérivées du cerveau de patients infectés par le VIH-1 avec celles du LTR du sang (Ross et al., 2001a). Les résultats indiquent que les séquences du LTR dérivées du cerveau possèdent un site C/EBP I spécifique, dont la séquence résulte en une augmentation de la fixation des facteurs C/EBP. Au contraire, les séquences du LTR dérivées du sang ne montrent pas de site préférentiel C/EBP. De plus, le site C/EBP II est davantage conservé dans le cerveau que dans le sang. Des analyses ont par ailleurs montré que la trans-activation par Tat du LTR est dépendante d'une haute conservation du site C/EBP II qui possède une forte capacité de fixation (Li et al., 1991). La sélection dans le cerveau de séquences préférentielles des sites C/EBP au niveau du LTR suggère que ces sites pourraient jouer un rôle important dans la régulation par le LTR de l'expression des gènes du VIH-1 durant l'invasion du système nerveux central et dans le maintien du virus dans ce compartiment.

Ainsi, les séquences du LTR peuvent être compartimentées, et le LTR subit une pression de sélection différente dans le système immunitaire et dans le système nerveux central.

3) Modification des promoteurs viraux, atténuation et tropisme

Le terme de tropisme viral définit la capacité du virus à infecter des types cellulaires pouvant supporter efficacement toutes les étapes du cycle de réplication du virus, depuis l'entrée dans la cellule jusqu'au relargage de nouveaux virions. Des études ont porté sur le remplacement du promoteur du VIH-1 et du VIS par d'autres promoteurs viraux ou des promoteurs de gènes humains. Ces études montrent tout l'impact du promoteur sur la réplication virale, mais également sur le tropisme viral engendré par le promoteur.

a) atténuation de la réplication virale

Dans le but d'obtenir un variant viral capable de se répliquer même dans les cellules quiescentes, un virus, basé sur le génome du VISmac239, a été construit dans lequel le promoteur minimal/activateur du VISmac239 a été remplacé par le promoteur du cytomégalo virus (CMV) (Blancou et al., 2004). Ce virus SIVmégalo se réplique en culture cellulaire à un niveau comparable à celui du virus parental sauvage, mais avec un retard dans la cinétique. L'infection de macaques rhésus par ce virus résulte en une séroconversion

(apparition d'anticorps spécifiques du VIS dans le sang), mais contrairement aux attentes, la virémie en primo-infection est extraordinairement faible. Ces résultats montrent que des altérations de la région du promoteur minimal/activateur du VIS conduisent à des différences profondes dans le phénotype du virus recombinant *in vitro* et *in vivo*. Le promoteur est crucial pour le tempo de la réplication virale en général, et l'échange du promoteur dans cette expérience confère une atténuation du virus chimère.

De même, la substitution du promoteur minimal/activateur du VISmac239 par le promoteur fort du gène EF1 α dans un virus VISmac239 résulte en une réplication fortement atténuée de ce virus, due à une absence de réponse à la protéine Tat (Sommer et al., 2004). Des virus révertants, qui portent des délétions d'une partie du promoteur EF1 α et qui ont récupérés la boîte TATA et deux sites Sp1 du VISmac239, peuvent être obtenus en culture, ces virus ont restauré leur capacité à se répliquer. Ces données montrent l'impact du promoteur et de son organisation pour une réplication optimale du VIH-1.

b) changement du tropisme viral

Pour déterminer si la spécificité cellulaire pouvait être due à des éléments du promoteur minimal/activateur du VIH-1, un virus a été construit dans lequel le promoteur minimal/activateur du VIH-1 a été remplacé par des motifs contrôlant l'expression des gènes de façon myéloïde-spécifique (Reed-Inderbitzin and Maury, 2003). La boîte CATA du VIH-1 n'est pas touchée, et les éléments activateurs du virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV) sont insérés en amont de celle-ci. Il est ainsi possible d'obtenir un virus chimère, qui se réplique et donne lieu à la production de particules infectieuses uniquement dans les macrophages, et non dans des lignées cellulaires T ou des cellules T primaires. Ainsi, il est possible de modifier ou de restreindre le tropisme viral en ciblant le promoteur viral, et ce de façon indépendante ou en addition du tropisme déterminé par l'enveloppe virale.

Chaque sous-type du VIH-1 est caractérisé par une configuration unique de son LTR en termes de sites de fixation de facteurs de transcription cellulaires. Le polymorphisme des LTR des différents sous-types du VIH-1 va avoir un impact sur la force du promoteur, et donc sur la réplication virale, en fonction de la cellule dans laquelle le virus va se répliquer, et des facteurs environnementaux agissant sur cette cellule infectée et sur son état d'activation. Par ailleurs, le promoteur peut également diriger le tropisme viral, favorisant la réplication du VIH-1 dans un type cellulaire (par exemple le macrophage) ou dans un compartiment particulier (comme le système nerveux).

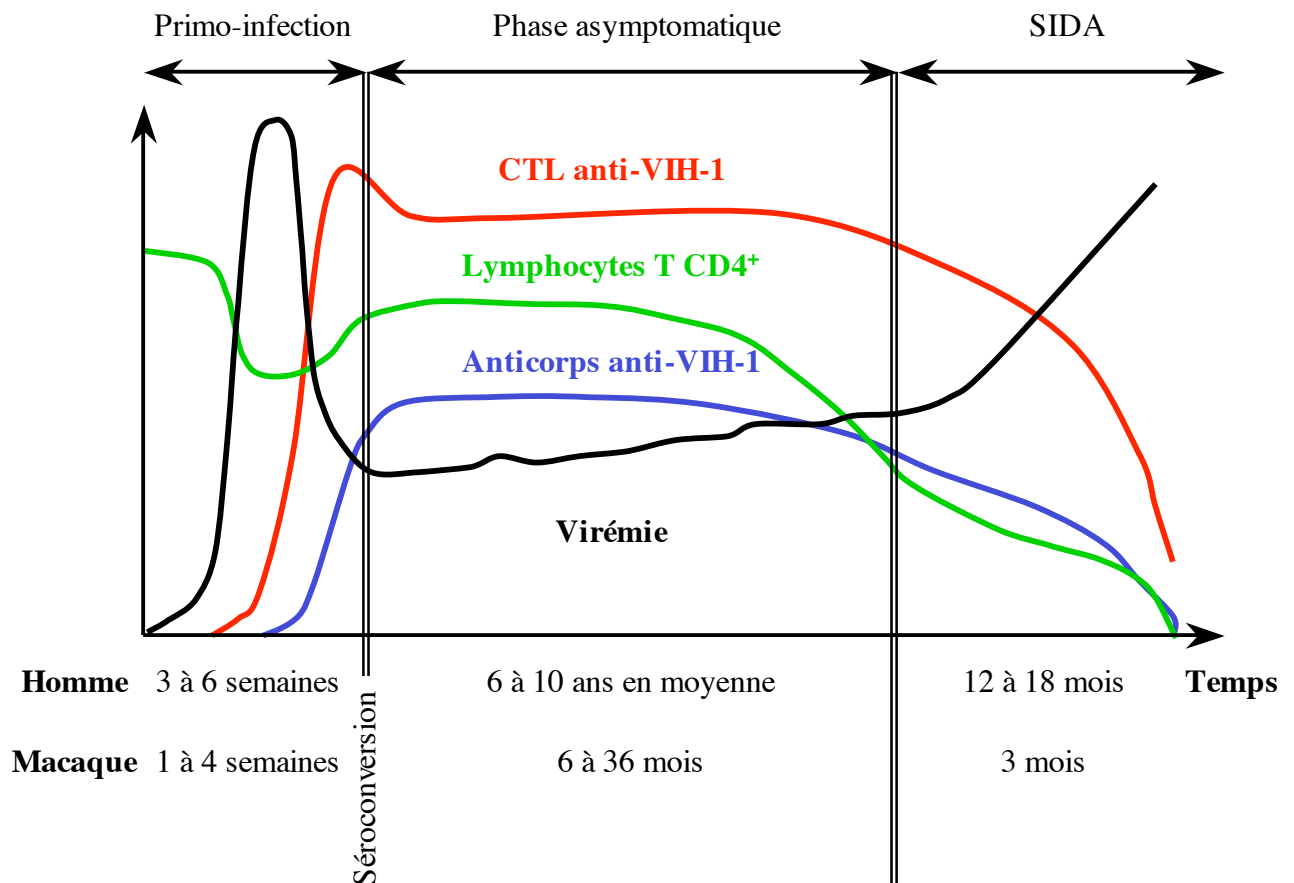


Figure 11 : Evolution schématique des différents paramètres de l'infection par le VIH-1 :

virémie, nombre de lymphocytes T CD4⁺, de CTL et d'anticorps anti- VIH-1

Légende: CTL: lymphocyte T CD8⁺ cytotoxique

II. PATHOGENESE DE L'INFECTION PAR LE VIH-1 ET LE VIS

A. Dynamique de l'infection par le VIH-1 et le VIS

1) Les différentes phases de l'infection par le VIH-1 et le VIS

La cinétique de l'infection de patients infectés par le VIH-1 et non traités, ou de macaques infectés par le VIS, est décomposée en 3 phases : la primo-infection (ou encore phase aiguë et précoce), la phase asymptomatique et la phase symptomatique ou SIDA. (Figure 11).

a) la primo-infection

La première phase de l'infection, dite phase de primo-infection, est caractérisée par une augmentation exponentielle de la virémie jusqu'à un pic d'environ 10^6 à 10^8 copies d'ARN viral par ml dans le plasma des individus infectés (Clark et al., 1991; Daar et al., 1991). C'est une phase dynamique, d'intense réplication du virus, qui peut s'accompagner de signes cliniques ressemblant notamment à une mononucléose infectieuse (fièvre, fatigue générale, maux de tête...) (Cooper et al., 1985; Ho et al., 1985). Cette phase dure 3 à 6 semaines chez l'homme et 1 à 4 semaines chez le macaque rhésus, et précède la séroconversion (apparition d'anticorps spécifiques du VIH-1 ou du VIS détectables dans le sang). On observe lors de cette phase une chute massive mais transitoire des LT CD4⁺ dans le sang, l'établissement d'un réservoir de LT CD4⁺ infectés de façon latente et le développement d'une réponse immunitaire spécifique du VIH-1. En fin de primo-infection, la charge virale chute (100 à 1000 fois par rapport au pic) et se stabilise à un point d'équilibre, variable selon les individus. Il a été montré que le point d'équilibre semble être prédictif d'un pronostic sur le long terme. Ainsi, plus le point d'équilibre où se stabilise la charge virale est élevé, plus l'évolution vers la maladie sera accélérée (Mellors et al., 1996). Le taux de progression vers le stade SIDA et la mort corrèle avec la charge virale ARN plasmatique (Mellors et al., 1996), qui reflète la production virale dans les tissus lymphatiques (Haase et al., 1996). Il existe également une corrélation, lors de la primo-infection, entre une évolution plus rapide vers la maladie et un taux d'apoptose plus élevé dans les ganglions lymphatiques périphériques (Monceaux et al., 2003).

La dissémination virale débute par une intense réplication du VIH-1 au niveau du tractus intestinal, du fait de la présence de sa cible majeure, les LT CD4⁺ mémoires/activés

(cf. chapitre II.B). Puis l'infection se dissémine rapidement en infectant un nombre croissant de LT CD4⁺ dans les tissus lymphoïdes proches du site de l'infection et dans les tissus plus distants, incluant notamment les ganglions lymphatiques, la rate, le thymus et les muqueuses (Chakrabarti et al., 1994a; Reimann et al., 1994; Vajdy et al., 2000; Veazey et al., 1998; Zhang et al., 1999). Chez des patients infectés en phase aiguë, des biopsies de ganglions lymphatiques montrent que les LT sont la cible et la source majeure de production du VIH-1 dans ces organes (Schacker et al., 2001). Cette infection mène à l'établissement précoce d'un groupe de LT CD4⁺ infectés de façon latente (Chun et al., 1998a). De plus, le VIH-1 peut s'accumuler durant la primo-infection à des taux très élevés au niveau des ganglions lymphatiques, à la surface des cellules dendritiques folliculaires (FDC) (Chakrabarti et al., 1994b; Schacker et al., 2000). Ces cellules constitueraient ainsi un réservoir majeur de particules infectieuses du VIH-1 dans les stades plus tardifs de l'infection, les particules piégées dans ce réseau de FDC restant infectieuses *in vivo* pendant au moins 9 mois (Smith et al., 2001).

b) la phase asymptomatique

La phase asymptomatique consiste en l'établissement d'une infection chronique faisant suite à l'infection aiguë de la primo-infection (Fauci, 1988; Fauci et al., 1991). Cette phase d'infection chronique dure en moyenne 6 à 10 ans chez l'homme et 6 à 36 mois chez le macaque rhésus. Elle résulte en un déclin graduel du nombre et des fonctions des LT CD4⁺ dans le sang et en une légère remontée de la charge virale. C'est une phase de latence clinique mais ce n'est pas une phase de latence virale : la réplication virale est intense et permanente au sein des tissus lymphoïdes, avec un renouvellement très important des LT CD4⁺ (Pantaleo et al., 1993). Lors de cette phase, la production virale est estimée supérieure à 10⁹ virions par jour (Ho et al., 1995). Or, la charge virale plasmatique en ARN est de l'ordre de 10⁴ copies/ml (Hubert et al., 2000), il existe donc une dynamique très rapide d'élimination et de renouvellement des cellules infectées. Cette dynamique est notamment liée à la réponse immunitaire, et un nombre élevé de LT CD8⁺ activés est détecté dans la circulation périphérique. Mais l'existence de cellules mononuclées quiescentes et contenant le provirus intégré a été identifiée comme un des obstacles majeurs pour permettre une cure thérapeutique de l'infection chez des personnes recevant un traitement anti-rétroviral (HAART). Les modèles déduits des changements dans les niveaux de charge virale et dans le nombre de LT CD4⁺ après l'initiation de l'HAART ont montré que la plupart des virus plasmatiques sont

produits par des LT activées, et que la demi-vie de ces cellules est réduite du fait de leur infection par le VIH-1.

c) la phase symptomatique ou SIDA

La phase SIDA est prononcée lorsque le nombre de LT CD4⁺ chute en dessous de 200 cellules/mm³, ce qui correspond à une réduction de plus de la moitié du nombre total de LT CD4⁺ dans le corps. En parallèle, la charge virale plasmatique en ARN augmente fortement. L'ensemble des réponses immunitaires est défaillant en fin d'évolution de l'infection, l'activité anti-VIH-1 des LT CD8⁺ diminue. Cela conduit ainsi au développement d'infections opportunistes (toxoplasmose cérébrale, infection à CMV, pneumonie, candidose...), de tumeurs (lymphome, sarcome de Kaposi...), voire de troubles neurologiques. La phase clinique s'étale sur environ 12 à 18 mois chez l'homme et sur 3 mois chez le macaque rhésus (Mocroft et al., 1996).

d) des évolutions particulières

Chez un petit pourcentage de personnes infectées par le VIH-1, il n'y a pas de progression vers la maladie. Ces personnes, appelées " non progresseurs sur le long terme " (LTNP), ont un taux de LT CD4⁺ qui reste stable pendant de nombreuses années (Cao et al., 1995; Pantaleo et al., 1995; Rinaldo et al., 1995). Ils sont également caractérisés par une charge virale cellulaire et plasmatique faible. Par ailleurs, on observe chez ces patients une faible hyperplasie lymphocytaire et une conservation de l'architecture ganglionnaire (Pantaleo et al., 1995). Ils présentent de hauts niveaux de LT CD8⁺ cytotoxiques mémoires anti-VIH-1. L'immunité humorale est également conservée, avec de hauts taux d'anticorps neutralisants (Montefiori et al., 1996). Enfin, l'apoptose spontanée des LT est réduite chez ces patients (Liegler et al., 1998).

Par ailleurs, un autre groupe est particulièrement étudié : les exposés non infectés (ENI). Il s'agit de personnes séronégatives qui sont hautement exposées au VIH-1 et qui demeurent indemnes de l'infection (comme les prostituées) (Rowland-Jones et al., 1999). Certaines de ces personnes ont des LT cytotoxiques (CTLs) spécifiques du VIH-1, confirmant que ces personnes ont bien été exposées au virus, et la présence de ces CTLs pourrait expliquer leur statut séronégatif, elles possèdent également de nombreuses IgA anti-VIH-1 (Kaul et al., 2004; Lo Caputo et al., 2003). Ces données confortent le rôle protecteur important des CTLs.

Parmi ces personnes exposées et non infectées, certaines portent une mutation déficiente (délétion de 32 paires de bases) du gène codant pour le co-récepteur CCR5 (Liu et al., 1996). Cette mutation à l'état homozygote confère une résistance à l'infection, au moins par voie sexuelle (Agrawal et al., 2004).

2) Mise en place de la réponse à l'infection

L'infection par le VIH-1 génère une réponse immunitaire qui contient le virus mais qui ne l'élimine jamais. Deux types de réponses sont mis en place pour le contrôle de l'infection : la réponse à médiation cellulaire et la réponse à médiation humorale.

a) la réponse à médiation cellulaire

i) la réponse CD8

Les CTLs sont des effecteurs essentiels de la réponse immunitaire antivirale. Des CTLs spécifiques du VIH-1 ont été trouvés en grand nombre et dans une multitude de compartiments anatomiques (sang, rate, ganglions lymphatiques, muqueuse vaginale et gastrointestinale, peau, espaces bronchoalvéolaires...), aussi bien chez des patients infectés par le VIH-1 que des macaques infectés par le VIS (Bachelez et al., 1998; Cheyner et al., 1994; Lohman et al., 1995; Plata et al., 1987; Veazey et al., 2001a; Walker et al., 1987). Ces CTLs sont dirigés contre des épitopes de différentes protéines du VIH et du VIS (Gag, Pol, Tat, Nef, Vif ou Env) (Nixon et al., 1992).

Le contrôle partiel de la réplication du VIH-1 a lieu précocement après l'infection, et corrèle avec l'émergence de la réponse CTL CD8⁺ spécifique du VIH-1. Une association semble donc possible entre l'apparition de populations cellulaires effectrices qui lysent les cellules infectées par le VIH-1 et le déclin de la charge virale en ARN plasmatique durant la période de primo-infection (Borrow et al., 1994; Koup et al., 1994; Regoes et al., 2004). Des populations oligoclonales de LT CD8⁺ apparaissent rapidement après l'infection par le VIH-1 dans le sang périphérique des individus infectés, au moment où le virus est contenu (Pantaleo et al., 1994). Des études menées chez des macaques infectés par le VIS montrent également une corrélation claire entre l'expansion des CTLs et l'élimination du virus (Chen et al., 1995; Kuroda et al., 1999; Yasutomi et al., 1993). De plus, la déplétion *in vivo* de LT CD8⁺ chez le macaque, par infusion d'anticorps monoclonaux anti-CD8, induit des changements profonds sur la réplication du VIS, comme une charge virale plus forte, une déplétion plus marquée des LT CD4⁺ et une absence de contrôle de la charge virale menant à la mort des animaux si la

déplétion en LT CD8⁺ perdue au-delà de 28 jours (Matano et al., 1998; Schmitz et al., 1999). Ainsi, les CTLs jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la réplication du VIS durant la primo-infection.

Les LT CD8⁺ sont également importants lors de la phase asymptomatique. Ainsi, bien que la charge virale soit faible, les réponses CTLs se maintiennent *in vivo* durant cette phase (Harrer et al., 1996a; Harrer et al., 1996b). Chez le macaque infecté par le VIS et en phase asymptomatique, la déplétion de ces cellules par infusion d'anticorps anti-CD8 donne lieu à une remontée rapide et forte de la charge virale, qui est à nouveau contrôlée lors d'une ré-émergence d'une population de LT CD8⁺ (Jin et al., 1999; Metzner et al., 2000; Schmitz et al., 1999). De plus, chez l'homme infecté par le VIH-1 et le macaque infecté par le VIS, la fréquence en CTLs est inversement corrélée à la charge virale ARN plasmatique et à la progression de la maladie (Ogg et al., 1998; Riviere et al., 1995; Villada et al., 1997). Lors d'un rebond de la virémie ou lors d'une interruption de la trithérapie chez des patients VIH⁺, de nouvelles cellules ou des cellules préexistantes T CD8⁺ spécifiques du VIH-1 peuvent être activées et s'expandre (Mollet et al., 2000).

En addition d'une activité de lyse des cellules infectées, les LT CD8⁺ peuvent inhiber la réplication du VIH-1 *in vitro* (Walker et al., 1986). Des mécanismes cytolitiques et non cytolitiques sont ainsi associés à cette activité antivirale. La voie cytolitique consiste soit en l'exocytose calcium dépendante des protéases granzyme et perforine, soit en la mort cellulaire programmée médiée par Fas. La voie non cytolitique implique le relargage de facteurs solubles prévenant notamment l'entrée virale, comme des chimiokines. Les chimiokines β MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES, ligands du corécepteur CCR5, ont des activités anti-VIH-1, colocalisent avec les granzymes et les perforines, et sont sécrétées par les CTLs après la rencontre avec l'antigène viral (Cocchi et al., 1995; Wagner et al., 1998). Le CAF (CD8 Antiviral Factor) est un autre facteur soluble ayant une action inhibitrice sur la réplication du VIH-1 (Levy et al., 1996). C'est une protéine, encore non identifiée, produite seulement par les LT CD8⁺ activés (HLA-DR⁺). Son mécanisme d'action n'est pas encore bien connu, mais il semblerait qu'il bloque la réplication virale en inhibant la transcription des gènes viraux au niveau du LTR, la prolifération, l'activation, le phénotype et la viabilité des LT CD4⁺ n'étant pas touchés (Levy, 2003; Mackewicz et al., 1995).

Une réponse T CD8⁺ se met en place rapidement après l'infection et joue un rôle important dans le contrôle du virus aussi bien en primo-infection que lors de la phase chronique de l'infection. Toutefois, il apparaît que cette réponse n'est pas efficace tant sur le

plan quantitatif que qualitatif, car elle ne permet pas l'éradication du virus et n'empêche pas l'évolution vers le stade SIDA.

ii) la réponse CD4

Les LT CD4⁺ spécifiques du virus ont aussi un rôle important dans le contrôle de la réplication du VIH-1. En effet, il a été montré que de nombreux individus infectés par le VIH-1, avec une charge virale faible, possèdent des populations de LT CD4⁺ spécifiques du virus (McNeil et al., 2001; Pitcher et al., 1999). Des populations oligoclonales de LT CD4⁺ sont détectées *in vivo* dans des singes chroniquement infectés par le VIS (Chen et al., 2000). De plus, l'amplitude de la réponse lymphocytaire T CD4⁺ et le contrôle de la virémie corrént chez des individus infectés et non progressseurs, ainsi que chez des singes infectés par le VIS ou un SHIV (McKay et al., 2003; Rosenberg et al., 1997a). Toutefois, l'infection par le VIH-1 conduit à une déplétion sélective de la population lymphocytaire T CD4⁺, et en particulier les LT CD4⁺ spécifiques du VIH-1 (Douek et al., 2002). Or, les LT CD4⁺ sont un élément essentiel du système immunitaire en permettant le développement et le maintien de la réponse CTL et humorale. Leur déplétion influe par conséquent sur la capacité d'élimination du virus (Kalams et al., 1999; Kalams and Walker, 1998).

b) la réponse à médiation humorale

La mise en place d'une réponse à médiation cellulaire est suivie par une forte réponse humorale (Safrit and Koup, 1995). La séroconversion apparaît 3 à 6 semaines après l'infection, mais certaines séroconversions sont plus tardives (au-delà de six mois) (Horsburgh et al., 1989). Elle suit le contrôle de la virémie plasmatique, mais la détection d'anticorps neutralisants est généralement plus tardive que la séroconversion. Les anticorps neutralisants sont principalement dirigés contre l'enveloppe du VIH-1 et agissent soit en bloquant l'infection avant l'attachement du virion à la cellule, soit en inhibant la fusion membranaire, voire l'internalisation du virion (Poignard et al., 1996). Il existe également des anticorps dits facilitants : les virions recouverts de ces anticorps pénètrent dans les cellules par le biais des récepteurs aux immunoglobulines (FcR) exprimés à la surface de ces cellules (Robinson et al., 1988). Ainsi, bien que la réponse humorale ait un rôle central dans l'élimination de nombreuses infections virales, son rôle dans l'infection par le VIH-1 est plus controversé.

En effet, les anticorps retrouvés dans le sérum de personnes VIH⁺ ont seulement une faible activité de neutralisation contre des isolats primaires du VIH-1 (Moore et al., 1995;

Poignard et al., 1999). De plus, l'explosion de réplication du VIH-1 dans les premiers jours après l'infection initiale est contenue chez les individus infectés bien avant le développement d'anticorps qui peuvent neutraliser le virus (Pilgrim et al., 1997). Par ailleurs, si la déplétion des cellules B chez des macaques rhésus par infusion d'anticorps anti-CD20 retarde de manière significative l'émergence d'une réponse humorale neutralisante après l'infection par le VIS, elle ne change rien à la cinétique de l'élimination virale précoce (Schmitz et al., 2003). Enfin, les anticorps neutralisants détectés sont souvent spécifiques d'une quasi-espèce virale antérieure à celle majoritairement présente chez un individu, ce qui suggère un temps de maturation trop lent de la réponse humorale pour qu'elle soit pleinement efficace (Von Gegerfelt et al., 1991). Ces observations suggèrent donc que les anticorps neutralisants ne sont pas importants dans le contrôle précoce de la réplication du VIH-1.

En revanche, la présence d'anticorps neutralisants avant l'infection semble avoir un impact important. Ainsi, l'infusion d'anticorps polyclonaux (sérum) ou monoclonaux, qui neutralisent le VIS ou le SHIV, atténue la pathogenèse, voire bloque l'établissement de l'infection par ces virus (Baba et al., 2000; Haigwood et al., 1996; Mascola et al., 2000). Cela suggère donc que ces anticorps neutralisants sont capables de protéger de l'infection initiale et par conséquent sont importants à prendre en compte dans d'éventuelles stratégies de vaccination contre le VIH-1. Enfin, les derniers résultats très prometteurs obtenus par l'équipe de Hovanessian et collègues confirment l'importance d'une réponse humorale neutralisante préexistante avant l'infection (Hovanessian et al., 2004).

3) La dynamique des populations lymphocytaires

La perte en LT CD4⁺ est essentiellement biphasique avec une déplétion rapide et massive de cibles T préexistantes durant la phase aiguë, suivi par le déclin lent mais irrémédiable des LT CD4⁺ restants, qui caractérise la phase chronique de l'infection. En parallèle à la lymphopénie en LT CD4⁺ s'installe une lymphocytose en LT CD8⁺. Ainsi une dynamique particulière des populations lymphocytaires T caractérise l'infection par le VIH-1 (voir pour revue (Douek et al., 2003; Grossman et al., 2002; Haase, 1999)).

a) la phase aiguë de l'infection

i) installation de l'infection

La cible primaire du VIH-1 et du VIS est le compartiment des LT CD4⁺ mémoires/activés qui expriment le corécepteur CCR5. Ces cellules sont localisées majoritairement au niveau des muqueuses, et plus particulièrement de la muqueuse intestinale

(cf. chapitre II.B). La transmission du virus est principalement un phénomène local, pendant lequel une cellule infectée relargue des virus qui vont infecter efficacement des cibles voisines (Cheynier et al., 1994). Cela implique ainsi que la propagation de l'infection dépend de l'interaction cellulaire locale et de la densité en cellules cibles avoisinantes, plutôt que du nombre total de cibles dans le corps (Grossman et al., 1998). Durant la phase aiguë, le tissu mucosal constitue une source continue en cellules cibles à travers lequel le virus se propage et se multiplie rapidement.

ii) impact du corécepteur sur la dynamique de déplétion

La dynamique de la déplétion des LT CD4⁺ est également déterminée lors de la phase aiguë par le corécepteur utilisé par le virus. L'infection de macaques par des virus SHIV portant une enveloppe du VIH-1 utilisant exclusivement comme corécepteur soit CXCR4 (*env* de sous-type B), soit CCR5 (*env* de sous-type B, C et E), conduit à une cinétique de réplication similaire des deux virus, mais les profils pathologiques induits sont différents. Ainsi, les singes infectés en intravaginal avec la souche SHIV de tropisme R5 subissent une déplétion rapide et profonde en LT CD4⁺ intestinaux, avec peu d'effets visibles au niveau du sang et des ganglions périériques (Chen et al., 2002; Harouse et al., 1999; Himathongkham et al., 2000). A l'inverse, les singes infectés par la souche SHIV de tropisme X4 présentent un tout autre profil avec une déplétion également rapide et profonde des LT CD4⁺ mais au niveau du sang et des ganglions périphériques, la population des LT CD4⁺ intestinaux n'étant pas touchée (Harouse et al., 1999). De plus, la population cellulaire cible pour la souche SHIV de tropisme X4 inclut les LT CD4⁺ naïfs et les thymocytes (Igarashi et al., 2002; Reyes et al., 2004). Dans des systèmes d'histocultures ganglionnaires et thymiques, il a été également mis en évidence que les cellules ganglionnaires et les thymocytes sont profondément déplétés par une souche du VIH-1 de tropisme X4, alors que la souche du VIH-1 de tropisme R5 n'induit qu'une légère déplétion (Grivel and Margolis, 1999; Penn et al., 1999; Uittenbogaart et al., 1996).

iii) la dynamique d'activation et déplétion des lymphocytes T

Il est possible d'examiner la prolifération et le renouvellement des populations lymphocytaires T lors de la phase aiguë de l'infection par le VIS par cytométrie de flux en suivant deux marqueurs : Ki67 et BrdU. L'expression de Ki67, un antigène nucléaire associé au cycle cellulaire, a un lien direct avec les cellules qui ont subi une synthèse d'ADN dans les 3-4 jours précédents. Alternativement, la fraction de cellules en phase S peut être évaluée en

suivant l'incorporation cellulaire de BrdU, un analogue de la thymidine. Le taux d'incorporation du BrdU durant le traitement, et le déclin des populations cellulaires BrdU⁺ après arrêt du traitement, fournit ainsi une évaluation, notamment *in vivo*, de leur survie et de leur prolifération.

Ces techniques ont permis de mettre en évidence, 14 jours post-infection, un accroissement de la fraction de LT CD4⁺ et CD8⁺ mémoires exprimant Ki67 (Douek et al., 2003). Par la suite, la fréquence de prolifération des LT CD4⁺ mémoires et celle des LT CD8⁺ mémoires sont très proches, et augmentent lentement avec le temps. Pour comparaison, dans le cas d'une infection par le CMV, la prolifération est contrôlée et revient à la normale 2 mois post-infection. L'incorporation de BrdU est élevée aussi bien dans les LT mémoires CD4⁺ que CD8⁺ (Douek et al., 2003). De manière frappante, tous les LT mémoires CD4⁺ marqués par le BrdU disparaissent en une semaine dans des singes infectés par le VIS, alors que la cinétique de décroissance du BrdU dans la population T CD8⁺ mémoire est identique à celle des populations T CD4⁺ et T CD8⁺ mémoires chez des singes infectés par le CMV. Ces expériences mettent donc en évidence un temps de demi-vie très court des LT CD4⁺ mémoires/activés. Dans l'infection aiguë par le VIH-1 et le VIS, la perte des LT CD4⁺ mémoires proliférants est donc en accord avec l'excès de mort cellulaire, qui est due à des effets cytopathiques viraux directs ou indirects et à la destruction médiée par les LT CD8⁺ des LT CD4⁺ infectés.

Par ailleurs, dans l'infection de macaques par le VIS, le nombre de LT CD4⁺ CCR5⁺ en division augmente dans le sang et les ganglions lymphatiques, cette population étant la cible principale du virus. Ainsi, la génération par prolifération de nouveaux LT CD4⁺ CCR5⁺ mémoires peut engendrer constamment de nouvelles cibles pour la réplication virale. De plus, dans la phase aiguë ou très précoce de l'infection par le VIH-1, bien que la prolifération des LT CD4⁺ CCR5⁺ dans le sang augmente dramatiquement, le nombre total de LT CD4⁺ CCR5⁺ reste dans la norme, alors que dans l'infection aiguë par le virus Epstein-Barr, les LT CD4⁺ CCR5⁺ en division s'accumulent à de hauts niveaux (Zaunders et al., 2001). Cela suggère donc que les LT CD4⁺ CCR5⁺ sont rapidement déplétés durant l'infection primaire par le VIH-1, et que la fraction restante se maintient par un processus prolifératif.

Ainsi, la population de LT CD4⁺ mémoires est fortement diminuée en taille après la phase aiguë de l'infection, même si cette population prolifère à de très hauts niveaux.

b) la phase chronique de l'infection

Tandis que la primo-infection par le VIH-1 est marquée par une augmentation rapide de la charge virale et par une déplétion forte des LT CD4⁺, la phase chronique de l'infection montre des dynamiques virale et lymphocytaire T différentes. A la fin de la phase aiguë, la charge virale s'est stabilisée à un point d'équilibre. Sur l'ensemble de la phase asymptomatique, la charge virale augmente lentement. En parallèle, le nombre de LT CD4⁺ du sang périphérique, augmenté par rapport au niveau qu'il atteignait lors du pic de déplétion de la primo-infection, tend à diminuer progressivement au cours du temps. Parallèlement à la diminution du nombre de LT CD4⁺, un accroissement du nombre de LT CD8⁺ est observé, qui est peut-être partiellement dû à un processus homéostatique tendant à maintenir constant le nombre total de LT (Margolick et al., 1995). Lors de cette phase chronique, un haut niveau d'activation des LT CD4⁺ et CD8⁺ est observé. Ainsi, cette phase correspond à un état d'activation immunitaire T chronique qui résulte en une réplication virale persistante.

i) activation chronique des LT CD4⁺ et CD8⁺ naïfs et mémoires

Durant la phase d'infection chronique, on observe un renouvellement élevé des LT CD4⁺ et CD8⁺. Des études chez le macaque rhésus ont montré un accroissement d'incorporation et de perte *in vivo* de BrdU dans toutes les populations lymphocytaires T, les LT mémoires étant plus touchés que les lymphocytes naïfs (Mohri et al., 1998; Rosenzweig et al., 1998). Le renouvellement des populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ est deux à trois fois plus élevé chez un singe infecté par le VIS que chez un animal contrôle. Si on analyse l'expression du Ki67 comme marqueur de la prolifération cellulaire, on note également que le taux de renouvellement des populations lymphocytaires T CD4⁺ et CD8⁺ est augmenté aussi bien dans les populations naïves que mémoires/activées lors de l'infection par le VIH-1 (Sachsenberg et al., 1998). Enfin, la mesure du temps de demi-vie des LT a été effectuée *in vivo* en suivant l'incorporation de glucose marqué par un isotope stable. Ces expériences ont montré que l'infection par le VIH-1 cause une diminution du temps de demi-vie des LT CD4⁺ et CD8⁺ mémoires (Hellerstein et al., 1999; McCune et al., 2000).

ii) l'activation chronique : cause ou conséquence de la déplétion des LT CD4⁺ ?

Est-ce le virus lui-même qui cause une mort massive des LT CD4⁺, ce qui pousserait le système immunitaire à tenter de compenser ce phénomène par une réponse proliférative homéostatique importante ? Ou est-ce que le virus cause une activation et une prolifération

massive des LT, la mort de ces cellules par différenciation terminale étant alors une conséquence naturelle ?

La deuxième hypothèse semble la plus vraisemblable. En effet, le taux de mort cellulaire touchant les LT CD8⁺ est similaire à celui des LT CD4⁺ (Hellerstein et al., 1999; Kovacs et al., 2001; Mohri et al., 1998). De plus, il est peu probable que le virus cause une mort massive des LT CD4⁺ lors de l'infection chronique, car le degré de LT CD4⁺ productivement infectés est très faible dans le sang et les ganglions lymphatiques (de 0,01 à 1%) (Chun et al., 1997; Haase et al., 1996). Par ailleurs, le VIH-1 se réplique préférentiellement dans la population des LT CD4⁺ activés, or la majorité de ces cellules sont destinées à mourir rapidement après prolifération et élaboration de leur fonction effectrice (Sprent, 1993).

Ainsi, le haut niveau de mort cellulaire semble être une conséquence, plutôt qu'une cause, de l'activation et de l'expansion des LT durant la phase chronique de l'infection par le VIH-1 (Anderson et al., 1998).

iii) déplétion et trafic lymphocytaire

Le trafic des LT CD4⁺ semble altéré durant la phase chronique de la maladie, participant ainsi à la diminution du nombre de ces cellules dans le sang alors que leur nombre n'est pas modifié dans les tissus lymphoïdes (Rosok et al., 1996; Sopper et al., 2003). Ainsi, les ganglions lymphatiques d'un animal infecté en phase asymptomatique contiennent 7,5 fois plus de LT CD4⁺ que ceux d'un animal sain (Schenkel et al., 1999).

Par ailleurs, chez des singes infectés par le VIS, il a été montré que la muqueuse pulmonaire est continuellement approvisionnée par un afflux de nouveaux LT CD4⁺ mémoires ayant une courte durée de vie et qui sont le produit d'événements de prolifération ayant eu lieu ailleurs (Picker et al., 2004). Il y a donc un renouvellement constant en LT au niveau des tissus muqueux effecteurs. Le potentiel de régénération des LT mémoires après la phase aiguë, et donc la capacité à délivrer des LT CD4⁺ mémoires aux tissus, est un signe prédictif de l'évolution rapide ou lente vers la maladie. Toutefois, le maintien à long terme d'une production fortement accrue de LT CD4⁺ et CD8⁺ mémoires va irrémédiablement conduire à une hypofonctionnalité cellulaire et/ou des altérations de la différenciation et de la composition du répertoire T disponible, contribuant ainsi au développement de l'immunodéficience dans la phase chronique (Appay and Rowland-Jones, 2002).

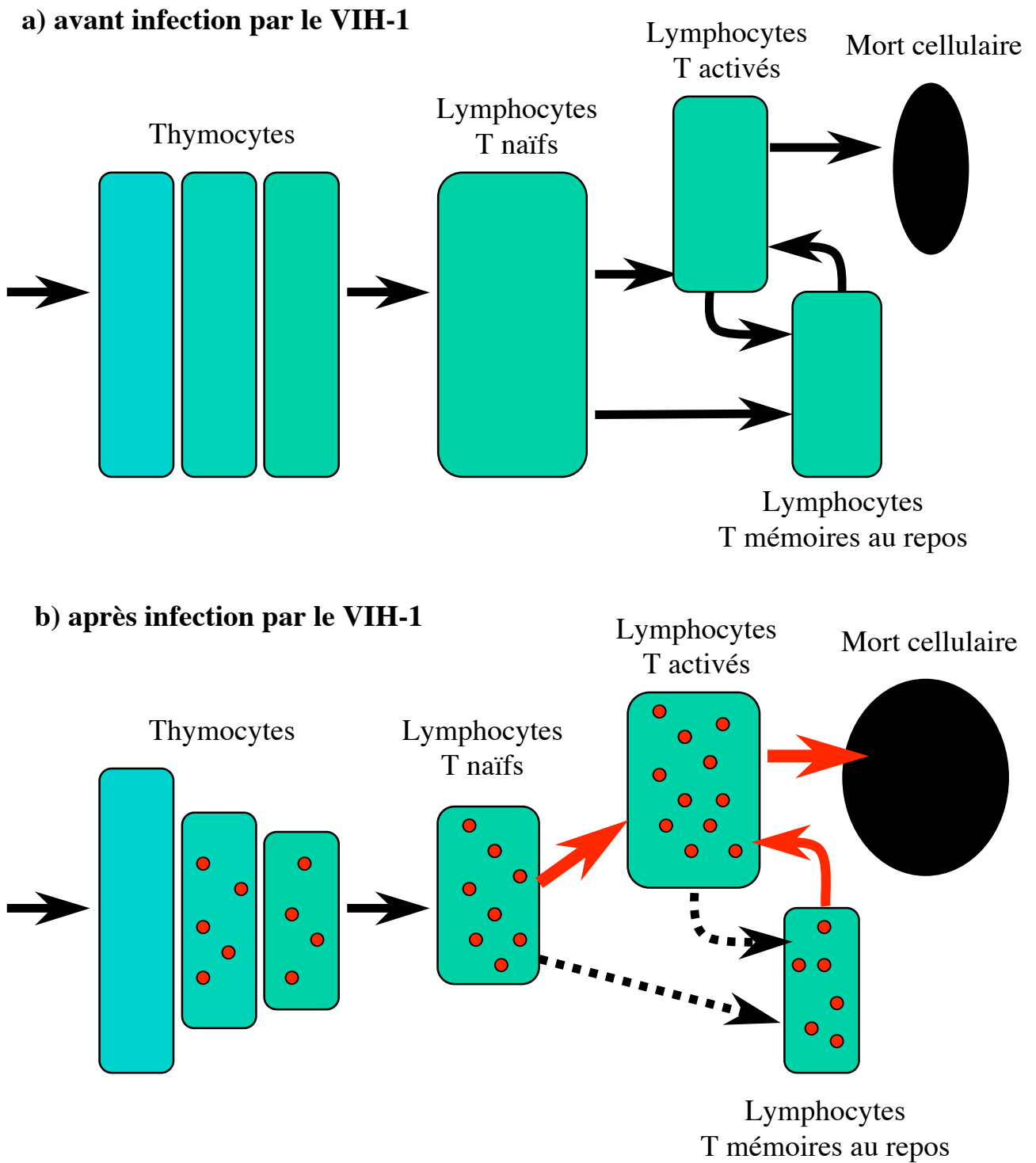


Figure 12 : Modèle de la dynamique lymphocytaire T lors de l'infection par le VIH-1

Légende: ● :VIH-1

iv) un dérèglement global de l'homéostasie des LT

Il semblerait que différents événements conduisent à la déplétion lymphocytaire T CD4⁺ (voir pour revue (Douek et al., 2003; Grossman et al., 2002; Haase, 1999), **Figure 12**) :

- attrition de la population de LT mémoires du fait des activations immunitaires répétées, la population mémoire T CD4⁺ étant déjà largement déplétée après la phase aiguë ;
- large activation (spécifique et non spécifique) des LT naïfs qui vont se différencier en LT mémoires/activés ;
- production altérée de LT naïfs provenant des sources lymphopoïétiques ;
- réduction du nombre de LT au repos due à une stimulation permanente et improductive. L'activation des LT les conduit à la mort, les LT CD4⁺ y étant plus sensibles que les LT CD8⁺. L'expansion des LT CD8⁺ activés est plus importante que celle des LT CD4⁺ activés dans le cadre d'une réponse immunitaire, ce qui explique ainsi en partie la plus forte augmentation du nombre total de LT CD8⁺ que de LT CD4⁺ durant la phase chronique.

Les capacités de renouvellement des différents compartiments lymphocytaires sont donc sévèrement perturbées, ce qui provoque l'installation progressive de la lymphopénie. De plus, l'activation immunitaire maintient la réplication virale et conduit à la progression de la maladie en déstabilisant ou en changeant progressivement l'état d'équilibre homéostatique des populations lymphocytaires au repos, naïves et mémoires.

c) lors d'un traitement anti-rétroviral

i) une dynamique en deux temps

On observe, lors de la prise d'un traitement anti-rétroviral, une dynamique lymphocytaire T en deux temps (Pakker et al., 1998). L'augmentation précoce du nombre de LT CD4⁺ comprend l'augmentation des LT mémoires/activés de phénotype CD45R0⁺, puis l'augmentation plus tardive de LT naïfs. Les LT mémoires qui apparaissent après traitement ne sont pas des LT mémoires qui prolifèrent, mais plutôt des LT qui étaient séquestrés au niveau des tissus lymphoïdes et qui sont relargués dans le sang, suite au contrôle de la réplication virale et de la baisse d'activation du système immunitaire (Autran et al., 1997). En revanche, après quelques mois de traitement, on peut observer une augmentation du nombre de LT mémoires, due à une activité de prolifération, comme l'ont montré des études chez des patients (Fleury et al., 2000; Hellerstein et al., 1999).

Les LT naïfs jouent un rôle majeur sur le long terme dans la reconstitution du compartiment des LT CD4⁺, après le traitement durant la phase chronique de l'infection. Ces

LT naïfs de phénotype CD45RA⁺ CD62L⁺ sont produits *de novo* par le thymus, comme le montre la détection de TREC (cercles d'excision provenant du réarrangement du TCR) au sein de ces cellules. Alors que la proportion de cellules T TREC⁺ diminue avec l'âge et l'infection par le VIH-1, on détecte une augmentation de ces cellules après le traitement HAART. Les variations dans les proportions en TREC pourraient être dues aux variations de la production thymique de cellules. Ainsi, la masse du thymus s'accroît en parallèle à l'augmentation du nombre de LT CD4⁺ naïfs durant le traitement de patients VIH⁺ adultes (McCune et al., 1998). De plus, la prolifération intra-thymique est réduite chez des patients infectés par le VIH-1, ce qui implique une diminution de production thymique qui serait compensée par des phénomènes homéostatiques en périphérie afin de soutenir le nombre de nouveaux émigrants thymiques (Dion et al., 2004). Toutefois, une autre hypothèse est maintenant avancée : l'intense activation immunitaire observée lors de l'infection pourrait induire l'augmentation de la prolifération des LT naïfs, contribuant ainsi à la dilution des TREC, et ce phénomène serait donc indépendant d'une diminution de l'export thymique (Hazenberg et al., 2000). Les travaux récents de l'équipe de David Ho vont également dans le sens d'un rôle mineur du thymus dans l'infection par le VIH-1 et le VIS. En effet, chez des singes thymectomisés puis infectés par le VIS, on n'observe pas de charge virale accrue, pas de déclin plus rapide en LT ou encore de progression plus rapide vers la maladie (Arron et al., 2005). Il est cependant probable que ces deux phénomènes, variation de la production thymique et prolifération en périphérie, soient impliqués à des niveaux variables suivant la phase de l'infection et l'individu infecté.

ii) diminution de l'activation et restauration d'une réponse immunitaire généralisée

Après la mise en place d'un traitement HAART, on observe une diminution des marqueurs d'activation aussi bien sur les LT CD4⁺ que les LT CD8⁺ (Autran et al., 1997; Bouscarat et al., 1998; Kelleher et al., 1996). Par ailleurs, alors que l'expression de la molécule de co-activation CD28 est diminuée lors de la maladie, contribuant ainsi à l'anergie des LT et à une sensibilisation accrue à l'apoptose, le traitement induit un retour de l'expression du CD28 à un niveau normal sur les LT CD4⁺ (Autran et al., 1997). De plus, l'expression de surface de Fas/FasL est également réduite, s'accompagnant ainsi d'une diminution du taux de mort cellulaire observé durant l'infection par le VIH-1 en l'absence de traitement (Sloand et al., 1999). Ainsi, l'effet majeur du traitement HAART sur le système immunitaire est une baisse générale de son état d'activation. En conséquence, la survie des différents compartiments lymphocytaires, et plus particulièrement le compartiment des LT

CD4⁺ mémoires/activés, est prolongée et le traitement contribue à la restauration du nombre des LT. Toutefois, le nombre de LT CD4⁺ après traitement reste inférieur à celui d'un sujet sain, ce qui suggère une altération de la fonction de régénération des populations lymphocytaires.

La reconstitution des LT naïfs et mémoires permet aux patients de répondre à des immunisations, par exemple contre des antigènes microbiens (Rinaldo et al., 1999). Ainsi avec l'administration de HAART, la suppression immunitaire est réversible après une infection prolongée par le VIH-1. Cependant, la restauration de la réactivité contre le VIH-1 lui-même n'est pas observée chez les patients sous HAART : les LT CD4⁺ spécifiques du VIH-1 ne sont pas définitivement délévés, mais persistent à des fréquences très faibles, même après un traitement (Pitcher et al., 1999). De même, un déclin des LT CD8⁺ spécifiques du virus en parallèle à la réduction du virus est observé, ce déclin s'expliquant par la baisse d'antigènes stimulant cette réponse T CD8⁺ (Mollet et al., 2000).

Ainsi, la thérapie anti-rétrovirale restaure le compartiment lymphocytaire T CD4⁺ et confère une protection contre des pathogènes opportunistes. Trois mécanismes permettent la restauration des LT : la redistribution de LT mémoires provenant des tissus, la régénération de LT naïfs, et la réduction du syndrome inflammatoire. L'absence de restauration d'une immunité efficace contre le VIH-1 lui-même reste un problème majeur, malgré le succès thérapeutique évident des traitements anti-rétroviraux.

4) L'échappement au système immunitaire

Bien que des réponses cellulaires et humorales soient mises en place après l'infection, comment expliquer que la réplication du VIH-1 ne soit pas contenue et conduite progressivement et invariablement à une profonde immunodéficience ?

a) l'existence de réservoirs viraux

Le VIH-1 s'intègre au sein du génome de la cellule infectée, et seule la production de protéines virales permet la reconnaissance de l'infection par le système immunitaire et particulièrement par les CTLs. L'activité du génome viral intégré est grandement influencée par le métabolisme et l'état d'activation de la cellule hôte, et la longévité du provirus est dictée par la durée de vie de la cellule qui le contient. Certaines cellules (LT CD4⁺, macrophages, cellules dendritiques) sont donc des réservoirs de virus au sein desquels, en l'absence d'activation, le virus peut se maintenir dans un état latent, indétectable pendant plusieurs années.

L'exemple le plus marquant se trouve au niveau du compartiment lymphocytaire T CD4⁺. Dans les LT CD4⁺ activés, la réplication virale est rapide et productive. Les facteurs de transcription nécessaires à la transcription du provirus sont abondamment présents dans la cellule. Toutefois, la situation est différente dans les LT CD4⁺ au repos, qui sont réfractaires à la réplication virale *in vitro*. Dans les patients infectés, ces LT contiennent de l'ADN proviral, mais semblent ne pas l'exprimer (Schnittman et al., 1989), l'expression virale est bloquée au niveau transcriptionnel (Adams et al., 1994; Seshamma et al., 1992). De plus, le temps de demi-vie des différents compartiments T CD4⁺ en fonction de leur état d'activation a été déterminé : ce temps est de 24 heures pour les LT activés, 14 jours à 6 mois pour les LT au repos en phase G1, et 44 mois pour les LT au repos en phase G0 (Stevenson, 2003). Ces données montrent ainsi que le virus peut persister de façon latente sur de très longues périodes et qu'il peut par ailleurs être ultérieurement produit suite à l'activation de ces cellules au repos (Bukrinsky et al., 1991; Chun et al., 1998b). La latence contribue ainsi à l'échappement du virus au système immunitaire, les cellules quiescentes infectées n'exprimant pas d'épitopes viraux à leur surface ou les exprimant à un niveau insuffisant pour permettre leur reconnaissance par les CTLs.

b) la régulation négative du CMH

Un autre mécanisme possible utilisé par le virus pour échapper au système immunitaire est la régulation négative des molécules du CMH par la protéine virale Nef. La protéine Nef interagit et modifie la voie d'endocytose de la cellule, ce qui conduit à la régulation négative de l'expression des molécules du CMH à la surface de la cellule infectée (Alexander et al., 2004; Schindler et al., 2003; Schwartz et al., 1996). La baisse d'expression en surface de ces molécules réduit la capacité de reconnaissance potentielle par les CTLs, et la cellule infectée va ainsi échapper à la lyse (Ali et al., 2004). Il est intéressant de noter que le VIH-1 induit la diminution d'expression des molécules HLA-A et HLA-B, mais pas celle de HLA-C et HLA-E. Or, HLA-C et HLA-E interagissent avec des récepteurs inhibiteurs sur les cellules NK (Natural Killer) (Cohen et al., 1999). Ainsi, le virus a mis au point un mécanisme pour éviter la lyse par les CTLs des cellules qu'il infecte, tout en limitant le risque représenté par les cellules NK.

c) la surexpression du ligand de Fas

L'infection des tissus lymphatiques par le VIH-1 est accompagnée *in vivo* par une augmentation de l'apoptose, qui affecte principalement les cellules voisines non infectées (Finkel et al., 1995a; Mueller et al., 2001). Ces effets pourraient être dus en partie à la surexpression, induite par Nef, du ligand de Fas (FasL) à la surface des cellules infectées, via un mécanisme impliquant le TCR (Xu et al., 1999). L'interaction entre FasL exprimé à la surface des LT infectés par le VIH-1 et son récepteur Fas, exposé à la surface des cellules avoisinantes, incluant les CTLs spécifiques du VIH-1, pourrait ainsi conduire à la mort par apoptose des cellules exprimant le récepteur Fas et non infectées. Il a été montré chez des patients infectés par le VIH-1, que les CTLs spécifiques du VIH-1 sont plus enclins à l'apoptose médiée par Fas que des CTLs spécifiques du CMV chez un même individu (Mueller et al., 2001). Ainsi, en induisant la surexpression de FasL à la surface de la cellule qu'il infecte, le VIH-1 peut échapper au contrôle par le système immunitaire en entraînant la mort par apoptose des CTLs spécifiques des épitopes viraux.

Le VIH-1 induit une pathologie caractérisée par trois phases : (a) la primo-infection, correspondant à une forte augmentation de la charge virale qui se stabilise à la fin de cette phase et à la mise en place d'une réponse immunitaire antivirale ; (b) la phase asymptomatique, où la charge virale augmente lentement et le nombre de LT CD4⁺ diminue lentement mais irréversiblement, et (c) la phase symptomatique ou SIDA, correspondant à la défaillance terminale du système immunitaire et à la maladie. L'infection par le VIH-1 induit une activation chronique et générale du système immunitaire, due à la réplication continue du virus. Ce processus conduit au vieillissement prématuré et à l'épuisement des ressources du système immunitaire. De plus, le virus met en place des mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire, contribuant ainsi à l'échec d'une réponse immune efficace contre le virus.

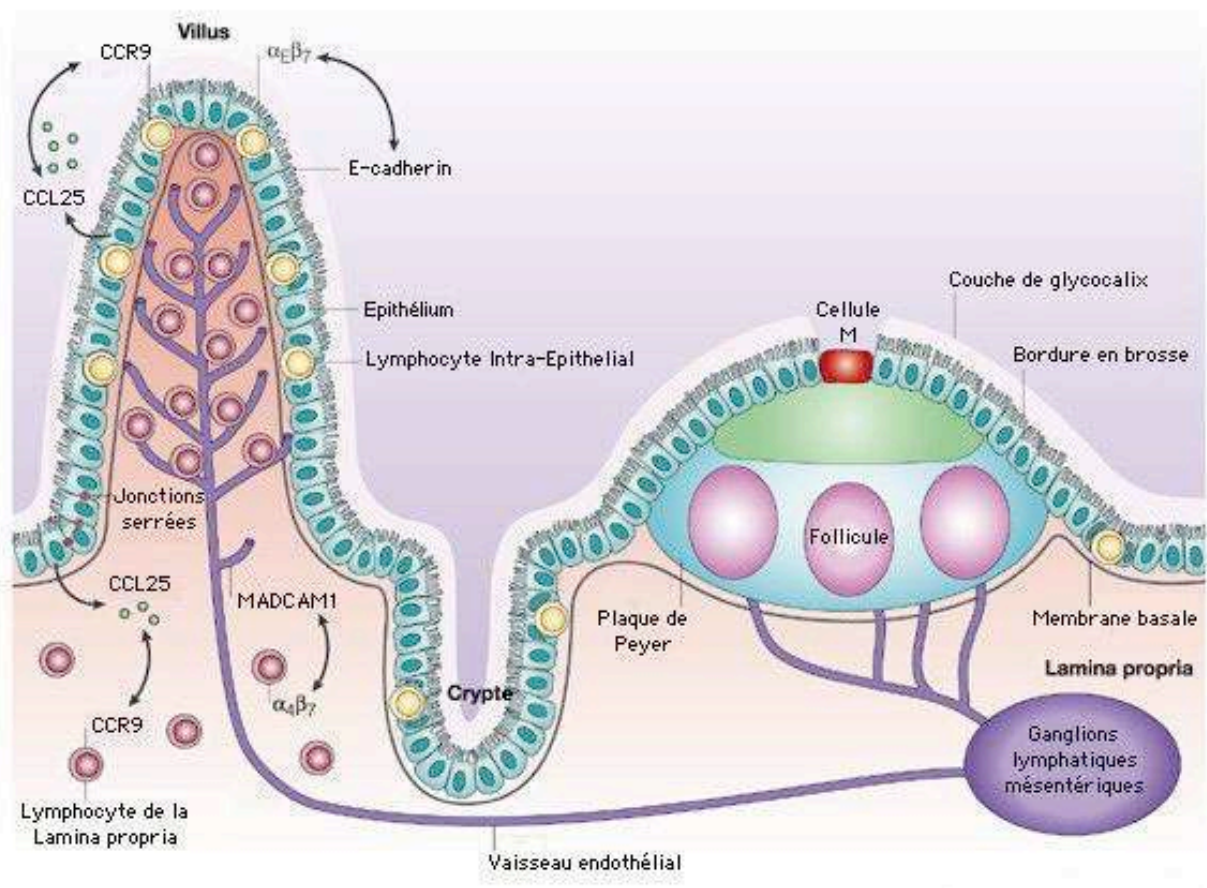


Figure 13 : Organisation du tissu lymphoïde associé à l'intestin (d'après Cheroutre et al, Nature Review Immunology, 2004)

B. L'intestin : un rôle central dans la pathogenèse

Les appareils gastro-intestinal, ano-rectal et génito-urinaire sont considérés comme les compartiments majeurs dans l'établissement de l'infection naturelle par le VIH-1 (Milman and Sharma, 1994). Les muqueuses et le système immunitaire associé sont donc d'une grande importance dans la pathogenèse induite par le VIH-1 et le VIS.

Nous nous focaliserons sur la muqueuse intestinale. L'organisation du tissu lymphoïde associé à l'intestin (GALT) et la composition des sous-populations lymphocytaires dans le tube gastro-intestinal des macaques rhésus sont remarquablement similaires à ceux de l'homme (Veazey et al., 1997), ce qui confirme le fait que le macaque rhésus est un bon modèle pour l'étude de la pathogenèse induite par le VIH-1 et du rôle de l'intestin dans l'établissement de cette infection.

1) La muqueuse intestinale : organisation et système immunitaire

L'intestin est divisé en deux parties : le petit intestin, qui comprend les portions duodénum, jéjunum, iléum, et le gros intestin qui comprend le cæcum, le colon et le rectum. L'intestin est recouvert d'un épithélium monostratifié, orienté, recouvert d'une couche de glycocalix. Vers le lumen intestinal, les cellules épithéliales possèdent une bordure de microvillosités. L'épithélium intestinal est entièrement renouvelé en l'espace d'une semaine.

La muqueuse intestinale représente une des interfaces majeures entre l'hôte et l'environnement, et joue un rôle important de défense contre les pathogènes. Il n'est donc pas étonnant que ce compartiment intestinal soit quantitativement le plus important du système immunitaire (Cerf-Bensussan and Guy-Grand, 1991; Kraehenbuhl and Neutra, 1992). Ainsi, l'épithélium intestinal contient approximativement 60% des LT de l'organisme, et les tissus lymphoïdes intestinaux constituent plus de 85% des tissus lymphoïdes du corps (Guy-Grand and Vassalli, 1993; Mowat and Viney, 1997). Le système immunitaire intestinal est constamment dans un état d'activation dû à la présence de nombreux pathogènes et antigènes bactériens, notamment dans la nourriture et l'eau. Ces observations ont conduit au concept "d'inflammation physiologique", dans lequel l'intestin normal est considéré comme étant dans un état d'inflammation bénigne (Abrams et al., 1963; Sansonetti, 2004).

Le GALT est structuré en deux compartiments : les sites inducteurs et les sites effecteurs (**Figure 13**). Les plaques de Peyer (PP) et les follicules lymphoïdes isolés forment les sites inducteurs (ou tissu lymphoïde organisé), les sites effecteurs étant constitués par les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) et les lymphocytes de la lamina propria (LPL) (voir pour

revues (Cheroutre, 2004; Cheroutre and Madakamutil, 2004; Elson and Mestecky, 2002; Mowat, 2003; Mowat and Viney, 1997)). Les ganglions lymphatiques mésentériques sont en général également compris dans le GALT, plus particulièrement en tant que site inducteur de la réponse immunitaire intestinale (Cheroutre and Madakamutil, 2004).

a) les sites inducteurs du GALT

Les sites inducteurs du GALT sont constitués par les PP et les follicules lymphoïdes isolés. Ces deux sites inducteurs ont la même structure et organisation, ils constituent le tissu lymphoïde organisé associé à l'intestin (Elson and Mestecky, 2002; Mowat and Viney, 1997). Les PP sont très présentes et visibles macroscopiquement dans les portions iléum et cæcum, mais des petits follicules lymphoïdes analogues sont dispersés abondamment à travers tout l'intestin chez l'Homme (Cornes, 1965).

Les PP sont organisées en agrégats lympho-épithéliaux avec un ou plusieurs follicules lymphoïdes qui s'étendent de la couche épithéliale à la lamina propria. Elles ont une apparence anatomique d'organes lymphoïdes secondaires classiques avec deux zones : une zone riche en LT et une zone riche en lymphocytes B (LB). Elles sont le site principal d'induction de la réponse immunitaire intestinale et contiennent donc toutes les cellules nécessaires pour cela, c'est-à-dire les LB et les LT ainsi que les cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques et macrophages). Les cellules des PP sont constituées de cellules naïves plutôt que de cellules effectrices. Par exemple, les PP contiennent beaucoup de LB, et très peu de cellules plasmocytes, même après immunisation, car les LT et les LB qui se différencient après activation quittent les PP (Kagnoff, 1977).

Les cellules des PP vont être activées et répondre de manière prédominante à des antigènes présentés via le lumen intestinal, par l'intermédiaire notamment des cellules M (Microfold cell). Les cellules M sont des cellules épithéliales spécialisées qui permettent de délivrer des antigènes du lumen vers les follicules (Bomsel et al., 1989; Neutra et al., 1999; Simons and Fuller, 1985). Ces cellules fixent des macromolécules et des microorganismes, comme des virus, à leur pôle apical et les transportent par un processus non dégradant à la surface basale pour une délivrance par exocytose aux cellules mononucléaires interdigitantes. Ce processus est appelé transcytose. Les LB et LT activés vont alors quitter les PP et migrer vers les ganglions lymphatiques mésentériques, qui ont une structure similaire à celle des ganglions périphériques. Puis, ils vont rejoindre les sites effecteurs du GALT.

b) les sites effecteurs du GALT

i) les lymphocytes intra-épithéliaux

Les lymphocytes intra-épithéliaux (IEL) sont localisés dans la couche épithéliale à l'interface entre le corps et le lumen intestinal, enchâssés entre les cellules épithéliales, et ils représentent une cellule de l'épithélium sur six à dix (Cheroutre, 2004). Des études suggèrent que les IEL ont une double origine, thymus-dépendante et thymus-indépendante (Rocha et al., 1994; Saito et al., 1998). De plus, l'épithélium intestinal jouerait un rôle dans la différenciation des IEL, par la sécrétion notamment d'IL-7 (Watanabe et al., 1995). En parallèle, les IEL, quant à eux, modulent l'homéostasie de l'épithélium intestinal à travers la production locale de cytokines (Guy-Grand et al., 1998).

Les IEL sont distincts des lymphocytes périphériques : ils forment une large population de LT activés (plus de 90% des IEL), qui possèdent des caractéristiques de LT effecteurs (Lambolez and Rocha, 2001).

Phénotypiquement, les IEL sont majoritairement des LT CD8⁺ (environ 80%), qui peuvent exprimer un récepteur (TCR) $\alpha\beta$ ou un TCR $\gamma\delta$ en proportion variable selon l'espèce étudiée. Chez l'homme, 70 à 90% des IEL CD8⁺ expriment un TCR $\alpha\beta$ (Brandtzaeg et al., 1989).

ii) les lymphocytes de la lamina propria

La lamina propria intestinale contient une abondance de LT, de macrophages, de cellules dendritiques, et de LB, notamment des cellules plasmocytes produisant des IgA. Les anticorps IgA servent principalement à protéger la surface de la muqueuse intestinale, en limitant l'absorption de protéines exogènes, en inhibant l'attachement des bactéries et en neutralisant un large spectre de virus (Corthesy and Kraehenbuhl, 1999). Ils sont principalement synthétisés et sécrétés au niveau de la lamina propria intestinale, puis ils sont transportés sous forme de dimère à la lumière de l'intestin par les cellules épithéliales (Lamm, 1998; Mostov, 1994). Les LT de la lamina propria (LPL) ont un ratio CD4 sur CD8 similaire à celui du sang et des organes lymphoïdes (1:1 à 2:1). Les LPL expriment tous un TCR $\alpha\beta$ et ont un phénotype de type mémoire/activé CD45RO⁺ CD45RA⁻, en opposition aux LT du sang périphérique qui sont majoritairement de phénotype naïf CD45RO⁻ CD45RA⁺ (Zeitl et al., 1991). Les LPL, tout comme les IEL, sont dans un état élevé d'activation, reflété notamment par une augmentation de l'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25⁺) et de la molécule de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité HLA-DR (Zeitl et al., 1988a).

Enfin, les LT de la lamina propria sont considérés comme des effecteurs tardifs, du fait de leur faible capacité de prolifération et de leur forte capacité de production de cytokines, telles que l'interféron γ , IL-4 et IL-5 (Zeitz et al., 1988b). La proportion de LT CD4⁺ mémoires/activés est donc plus importante dans la lamina propria intestinale que dans le sang périphérique ou les ganglions lymphatiques. Les LPL sont immunophénotypiquement et fonctionnellement distincts des lymphocytes périphériques. Ils sont également caractérisés par une forte proportion de LT double positifs CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺ (Veazey et al., 1997).

c) la circulation des lymphocytes

Dans un premier temps, les lymphocytes stimulés migrent hors des sites inducteurs via les vaisseaux lymphatiques efférents et entrent dans les ganglions lymphatiques mésentériques, où ils vont se diviser et se différencier. Dans un second temps, ces cellules rejoignent la circulation sanguine et se dispersent à travers tout l'organisme. Ces cellules, pour la plupart, vont ensuite revenir et s'accumuler au niveau de la muqueuse intestinale, à l'opposé des lymphocytes activés dans les organes périphériques, qui vont moins coloniser les muqueuses (Campbell and Butcher, 2002; Mora et al., 2003). Les lymphocytes activés dans l'intestin surexpriment en effet deux intégrines qui redirigent ces lymphocytes activés de la périphérie vers le GALT (Cepek et al., 1994; Shaw and Brenner, 1995).

L'intégrine $\alpha 4\beta 7$ est exprimée dans le sang à la surface des lymphocytes qui ont été activés dans l'intestin et qui vont retourner vers le GALT. Cette intégrine $\alpha 4\beta 7$ fixe la molécule MADCAM1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1), exprimée à la surface des cellules endothéliales des capillaires (Berlin et al., 1995; Berlin et al., 1993). Par ailleurs, l'intégrine $\alpha E\beta 7$ est exprimée une fois que les cellules ont atteint le GALT pour diriger les IEL vers l'épithélium intestinal. En effet, cette intégrine fixe la E-cadhérine, qui est exprimée à la surface des cellules épithéliales intestinales. Le récepteur à chimiokine CCR9 joue également un rôle dans la migration des LPL et IEL vers certains tissus, comme le petit intestin. Les LPL et IEL exprimant CCR9 vont migrer vers le petit intestin sous l'effet de la chimiokine TECK (thymus expressed chemokine ou CCL25), produite sélectivement par les cellules épithéliales de ce tissu (Kunkel et al., 2000; Papadakis et al., 2003; Zabel et al., 1999). Ces lymphocytes vont alors coloniser les sites effecteurs du système immunitaire intestinal (Mora et al., 2003).

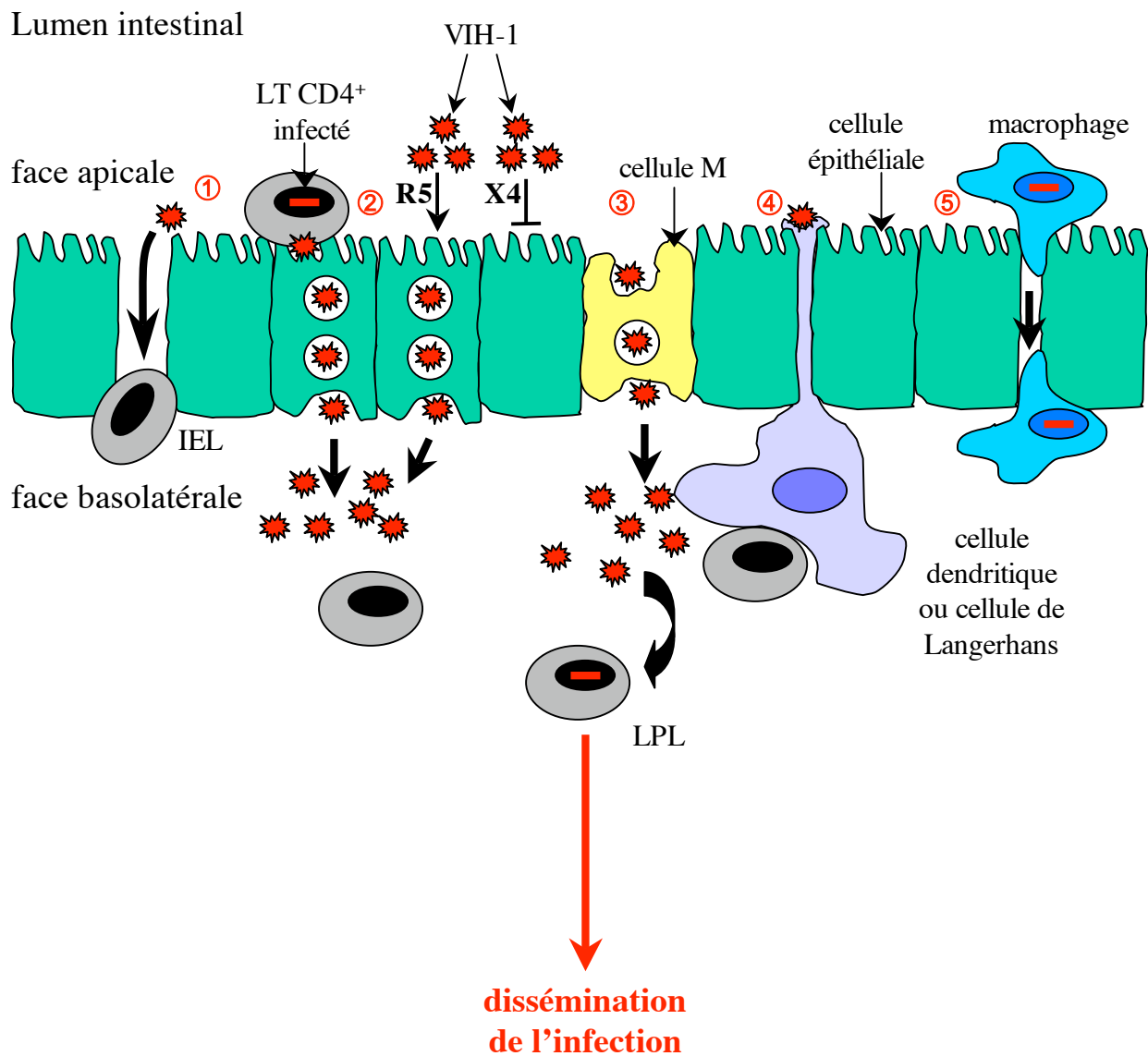


Figure 14 : Différentes voies d'entrée du VIH-1 à travers l'épithélium intestinal :

- ① brèche dans l'épithélium ou infection directe des IEL,
- ② transcytose à travers les cellules épithéliales,
- ③ transcytose à travers les cellules M,
- ④ transport du virus par le biais des cellules dendritiques ou des cellules de Langerhans,
- ⑤ migration trans-épithéliale de macrophages infectés

2) Le système immunitaire intestinal : cible pour l'infection par le VIH-1 et le VIS

La muqueuse intestinale joue un rôle important à tous les stades de la pathogenèse induite par l'infection par le VIH-1. De plus, la muqueuse gastro-intestinale est la voie principale par laquelle le VIH-1 colonise les tissus lymphoïdes chez les homosexuels et les enfants, et permet l'établissement de l'infection. Nous verrons dans ce chapitre par quels mécanismes le virus entre dans les muqueuses et quels changements il induit au niveau du système immunitaire muqueux.

a) passage de la barrière mucoale par le VIH-1

Le VIH-1 peut traverser l'épithélium des muqueuses par différents modes de transmission et de dissémination (**Figure 14**). Le passage le plus simple du virus peut se faire par des brèches dans l'épithélium, lors de lésions d'origine traumatique ou inflammatoire, qui vont permettre au virus d'interagir directement avec les cellules cibles sous la muqueuse ou aux cellules infectées (macrophages, lymphocytes) de traverser la muqueuse (Carreno et al., 2002a).

La transcytose par des chemins vésiculaires est un des mécanismes par lequel le VIH-1 peut traverser la barrière intacte pour infecter des cellules hôtes sensibles à l'infection dans les tissus sous-jacents. Cette transcytose implique soit les cellules M de la muqueuse intestinale (Neutra, 1999; Smith et al., 2003), soit les cellules épithéliales intestinales (Bomsel, 1997; Bomsel and Alfsen, 2003; Fantini et al., 1993). Ce phénomène de transport du pôle apical au pôle basal des cellules est relativement rapide (environ une heure) (Hocini and Bomsel, 1999). Toutefois, si la transcytose est possible avec des virions de tropisme X4 ou R5 générés lors du contact entre deux cellules, la transcytose de particules libres à travers les cellules épithéliales n'est observée que pour les virus de tropisme R5 (Bomsel, 1997; Bomsel and Alfsen, 2003). En effet, les cellules épithéliales exprimant CCR5 et non CXCR4, il semblerait par conséquent que cette étape de transcytose conduise à une sélection des virus de tropisme R5 (Carreno et al., 2002b; Meng et al., 2002; Smith et al., 2003). Cette capacité de sélection des virus de tropisme X4 ou R5 lors de l'étape de transcytose à travers les cellules M reste à clarifier. Par ailleurs, les cellules épithéliales intestinales primaires ne supportent pas la réplication virale, mais sont capables de transporter le VIH-1 (Smith et al., 1999).

Les cellules M étant absentes de la muqueuse du vagin et du cervix, les virus passent donc par une autre voie. En l'occurrence, les virus utilisent les cellules dendritiques épithéliales et les cellules de Langerhans pour passer la barrière mucoale lors d'infection intravaginale de macaque rhésus (Hu et al., 2000; Miller and Hu, 1999). Les virus peuvent

soit infecter les cellules dendritiques ou les cellules de Langerhans (Dezutter-Dambuyant and Schmitt, 1993), soit être capturés par ces cellules par le biais de la molécule de surface DC-SIGN/Langerin (Geijtenbeek et al., 2000; Tschachler et al., 1987; Turville et al., 2002). A ce stade s'opère également une sélection pour les virus de tropisme R5, car les cellules dendritiques et de Langerhans favorisent la réplication des virus R5 (Granelli-Piperno et al., 1998; Lin et al., 2000). La dernière voie de transmission possible est l'infection des IEL nichés dans l'épithélium.

Quel que soit le mécanisme utilisé par le virus pour pénétrer les muqueuses, l'infection se propage dans les tissus sous-jacents, puis est disséminée par le biais de la circulation sanguine. Ainsi, le VIH-1 a été retrouvé dans toutes les régions du tube digestif au tractus gastro-intestinal : duodénum (Jarry et al., 1990; Ullrich et al., 1989), iléum (Harriman et al., 1989), colon (Fox et al., 1989) et rectum (Fox et al., 1989).

b) une déplétion intestinale rapide et précoce des LT CD4⁺

i) mise en évidence de la déplétion intestinale

Lors de l'infection de macaques rhésus par le VIS, de nombreuses cellules infectées sont présentes initialement aussi bien dans la lamina propria intestinale que dans les zones riches en LT des follicules lymphoïdes organisés : dès 3 jours post-infection, de l'ARN viral est détecté dans les macrophages et les LT de la lamina propria (Heise et al., 1994; Stone et al., 1994). A des stades plus avancés de l'infection (21 à 50 jours), quand la déplétion des LT CD4⁺ est marquée, le nombre de cellules infectées est grandement diminué au niveau de l'intestin, et les cellules infectées restantes sont alors limitées aux follicules lymphoïdes organisés. En parallèle, la fréquence des macrophages infectés augmente, et ceux-ci sont pour la plupart localisés au niveau des follicules lymphoïdes organisés (Heise et al., 1993a; Heise et al., 1993b).

L'infection en intraveineux de macaques rhésus par le virus pathogène VISmac239 conduit à une déplétion rapide et profonde des LT CD4⁺ de la muqueuse intestinale (duodénum, jéjunum, iléum, colon et rectum) (Kewenig et al., 1999; Vajdy et al., 2000; Veazey et al., 1998). Cette déplétion est évidente dès 7 jours post-infection, et elle atteint son paroxysme 14 à 21 jours post-infection dans ces animaux. De même, l'infection de macaques rhésus par le VIS, par voie intravaginale ou orale, conduit à une propagation rapide du virus au niveau de la muqueuse intestinale. Des cellules infectées y sont observées entre 7 et 23 jours post-infection (Stahl-Hennig et al., 1999; Zhang et al., 1999). Après l'inoculation du

VIS à des macaques rhésus par voie rectale, une activation précoce (environ 7 jours post-infection) des cellules de la lignée monocyttaire a lieu au niveau des sites immunologiques inducteurs. Cette activation est suivie, 14 à 21 jours post-infection, par une déplétion des LT CD4⁺ des sites effecteurs des muqueuses, aussi bien localisés au site de l'inoculation qu'à des sites plus distants (intestins et poumons) (Vajdy et al., 2001). Ainsi, il est probable que les cellules activées de la lignée monocyttaire, 7 jours post-inoculation, migrent vers les sites effecteurs des muqueuses intestinale et pulmonaire, où elles causent l'infection des LT CD4⁺ (Vajdy et al., 2001).

La déplétion des LT CD4⁺ a lieu au niveau de la muqueuse intestinale, mais elle est également visible au niveau des muqueuses vaginales et pulmonaires (Vajdy et al., 2001; Veazey et al., 2003c). Cette déplétion concerne aussi bien la population lymphocytaire T "classique" (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻) que T mature atypique (CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺) (Smit-McBride et al., 1998). Par ailleurs, il a été confirmé par analyse en cytométrie de flux que la déplétion intestinale des LT CD4⁺ n'est pas uniquement le reflet d'une diminution de l'expression du co-récepteur CD4 à la surface des lymphocytes, ou à son internalisation, car aucune augmentation de la population T double négative CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ n'est détectée (Veazey et al., 1998). Cela suggère donc que la déplétion intestinale des LT CD4⁺ est due à une élimination des LT CD4⁺, soit par des effets cytopathiques directs ou indirects dûs au virus, soit par des mécanismes apoptotiques, ou encore du fait d'un trafic ou d'une régénération altérée des lymphocytes de la muqueuse.

ii) une déplétion préférentielle au niveau des sites effecteurs

La déplétion intestinale des LT CD4⁺ intervient plus particulièrement au niveau des sites effecteurs de la muqueuse intestinale (Smit-McBride et al., 1998; Veazey et al., 1998). Elle est ainsi très importante au niveau des LPL et des IEL (Mattapallil et al., 2000; Smit-McBride et al., 1998; Veazey et al., 1998). De plus, cette déplétion intestinale sélective est observée aussi bien chez des macaques adultes et nouveaux-nés infectés par le VIS (Veazey et al., 1998; Veazey et al., 2003a), que chez des patients infectés par le VIH-1 (Clayton et al., 1997). Elle est fortement marquée au niveau du jéjunum, car cette portion intestinale ne contient que des sites effecteurs, mais une déplétion mineure peut également être observée dans les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés (Veazey et al., 1998). Ces données, obtenues dans le modèle animal, ont été confirmées chez des patients VIH⁺ en primo-infection (4 à 6 semaines post-infection), où une déplétion marquée des LT CD4⁺

intestinaux prédomine dans les sites effecteurs de la muqueuse, et où la présence de cellules infectées est détectable dans les sites inducteurs (Mehandru et al., 2004).

Cette déplétion touche aussi bien les LT matures atypiques CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺ que les LT "classiques" CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻. Les LT CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺ observées dans ces sites ne sont pas des cellules précurseurs immatures (CD34⁻ CD45RA⁻), mais plutôt des lymphocytes effecteurs hautement activés et différenciés, comme le montre notamment l'expression du marqueur d'activation CD69⁺. Ces cellules sont donc également une cible préférentielle du virus, et sont par conséquent éliminées aussi rapidement que les LT CD4⁺ "classiques" (Veazey et al., 2000a).

La déplétion préférentielle au niveau des sites effecteurs intestinaux corrèle avec le phénotype des LPL et des IEL. Les IEL et LPL sont des cellules de type activé, qui expriment le marqueur CD25⁺ plus fortement et plus abondamment au niveau des sites effecteurs de la réponse immunitaire intestinale (LPL et IEL) que des sites inducteurs (plaque de Peyer) (Veazey et al., 1998). De plus, les sites effecteurs de l'intestin normal contiennent un grand nombre de LT CD4⁺ de phénotype mémoire/activé (CD45RA⁻ CD45RO⁺ CD25⁺), contrairement aux sites inducteurs de la muqueuse intestinale (Veazey et al., 2000a; Veazey et al., 2000b). Or, le VIH-1 se réplique plus efficacement dans les LT CD4⁺ mémoires/activés (McDougal et al., 1985; Nabel and Baltimore, 1987; Rosenberg and Fauci, 1991; Schnittman et al., 1990; van Noesel et al., 1990), l'intestin est donc une cible préférentielle de l'infection et de la réplication précoce du VIH-1. La déplétion des LT CD4⁺ intestinaux touche plus particulièrement la population lymphocytaire mémoire/activée de la lamina propria qui est déplétée en 14 à 21 jours post-infection (Veazey et al., 2000a; Veazey et al., 2000b).

Les LT des muqueuses expriment les molécules CD69 et HLA-DR qui sont des marqueurs de l'activation médiée par le TCR (Veazey et al., 2000a; Veazey et al., 2000b). Cet état cellulaire est en général un pré-requis pour la réplication virale à de hauts niveaux (Bukrinsky et al., 1991; Korin and Zack, 1998; Zack et al., 1990). Il est également possible que les LT infiltrant les tissus expriment ces marqueurs d'activation sous l'effet de signaux environnementaux, indépendamment de la signalisation par le TCR. En effet, l'environnement mucosal est riche en cytokines inflammatoires, dont certaines activent les LT CD4⁺ (Unutmaz et al., 1994) et promeuvent l'infection et la propagation du VIH-1 dans les LT CD4⁺ au repos (Chun et al., 1998b; Unutmaz et al., 1999). Ainsi, il apparaît que, même en absence d'une activation complète induite par un antigène et médiée par le TCR, le phénotype et l'environnement des LT CD4⁺ des muqueuses font de ces cellules une cible préférentielle pour le VIH-1. L'effet conjugué de la stimulation médiée par des antigènes et des cytokines

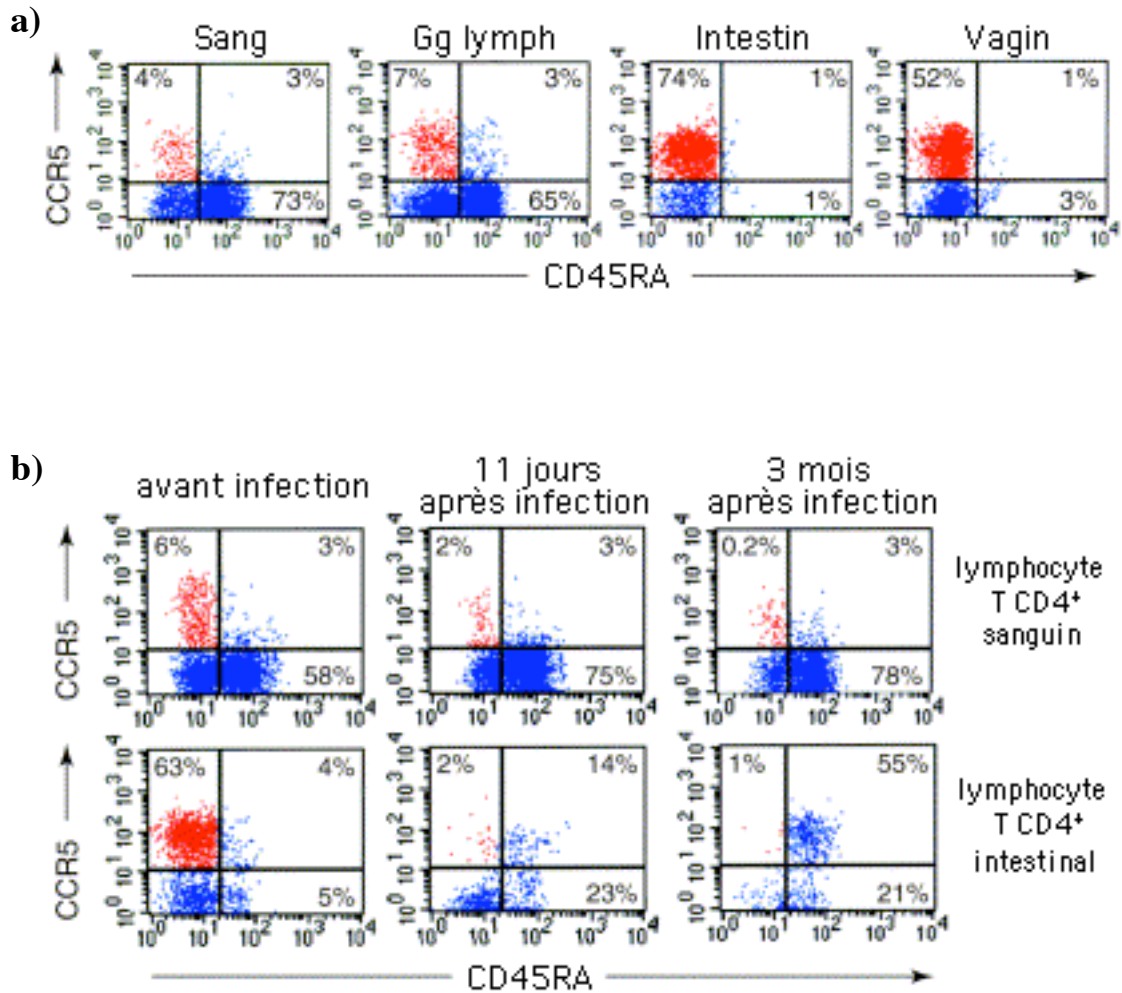


Figure 15: Expression des marqueurs CD45RA et CCR5 parmi les LT CD4⁺ au niveau de différents compartiments (a) et mise en évidence de la déplétion des LT CD4⁺ CD45RA⁻ CCR5⁺ lors de l'infection par le VIH-1(b)

(d'après Veazey et al, TRENDS in Immunology, 2001)

Légende: Gg lymph: ganglion lymphatique

va conduire à une production efficace et une propagation du virus des cellules infectées aux LT CD4⁺ CCR5⁺ adjacents.

La proportion de LT mémoires/activés est également plus importante au niveau de l'intestin que des tissus lymphoïdes périphériques (**Figure 15**) (Veazey et al., 2001b). Ainsi, la déplétion des LT CD4⁺ est beaucoup plus rapide et profonde en primo-infection dans l'intestin que dans le sang, la rate et les ganglions lymphatiques, où des changements mineurs dans les pourcentages en LT CD4⁺ sont observés (Veazey et al., 1998). Le déclin en LT CD4⁺ dans les PBMC est progressif et plus prononcé durant les stades les plus tardifs de l'infection (Smit-McBride et al., 1998). De plus, on retrouve plus de cellules infectées par le virus dans l'intestin que dans les tissus lymphoïdes périphériques (Sasseville et al., 1996).

La population intestinale des LT CD4⁺ mémoires/activés possède également un autre trait particulier qui est un haut niveau d'expression du corécepteur CCR5 (Meng et al., 2000; Smith et al., 2000; Veazey et al., 2000a), qui permet à ces cellules de soutenir la réplication des virus de tropisme R5, mais également d'être la cible préférentielle de ces virus, transmis lors des infections hétérosexuelles ou homosexuelles impliquant les muqueuses (Bleul et al., 1997).

iii) les mécanismes potentiels de la déplétion intestinale

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la déplétion intestinale des LT CD4⁺. Toutefois certains ne sont que de simples hypothèses qu'il reste à vérifier.

Le premier mécanisme envisageable est un effet direct cytopathique du virus sur les LT CD4⁺. En effet, un haut taux de réplication du VIH-1 conduit à la mort des LT CD4⁺ infectées. En parallèle, l'infection virale entraîne la mort par apoptose des LT CD4⁺ infectées et non infectées (cf. chapitre II.A.4.d) (Badley et al., 1996; Finkel et al., 1995b; Oyaizu et al., 1997). Ainsi, de nombreuses cellules apoptotiques ont été détectées au niveau de la muqueuse intestinale en primo-infection (Li et al., 2005; Smit-McBride et al., 1998).

Par ailleurs, la déplétion des LT CD4⁺ s'accompagne en primo-infection d'une augmentation du nombre absolu de LT CD8⁺ (Smit-McBride et al., 1998; Veazey et al., 1998). Il a été montré que les LPL et les IEL ont une activité CTL anti-VIH-1 en primo-infection (Couedel-Courteille et al., 1997; Smit-McBride et al., 1998). Chez des macaques rhésus infectés par le VIS, des LT CD8⁺ spécifiques d'antigènes du VIS apparaissent dans la muqueuse intestinale à un taux comparable à celui dans le sang, en primo-infection, dès 14 jours post-infection (Veazey et al., 2001a; Veazey et al., 2003b). Ainsi, l'intestin est un site majeur de réplication virale précoce mais également un site de développement d'une réponse

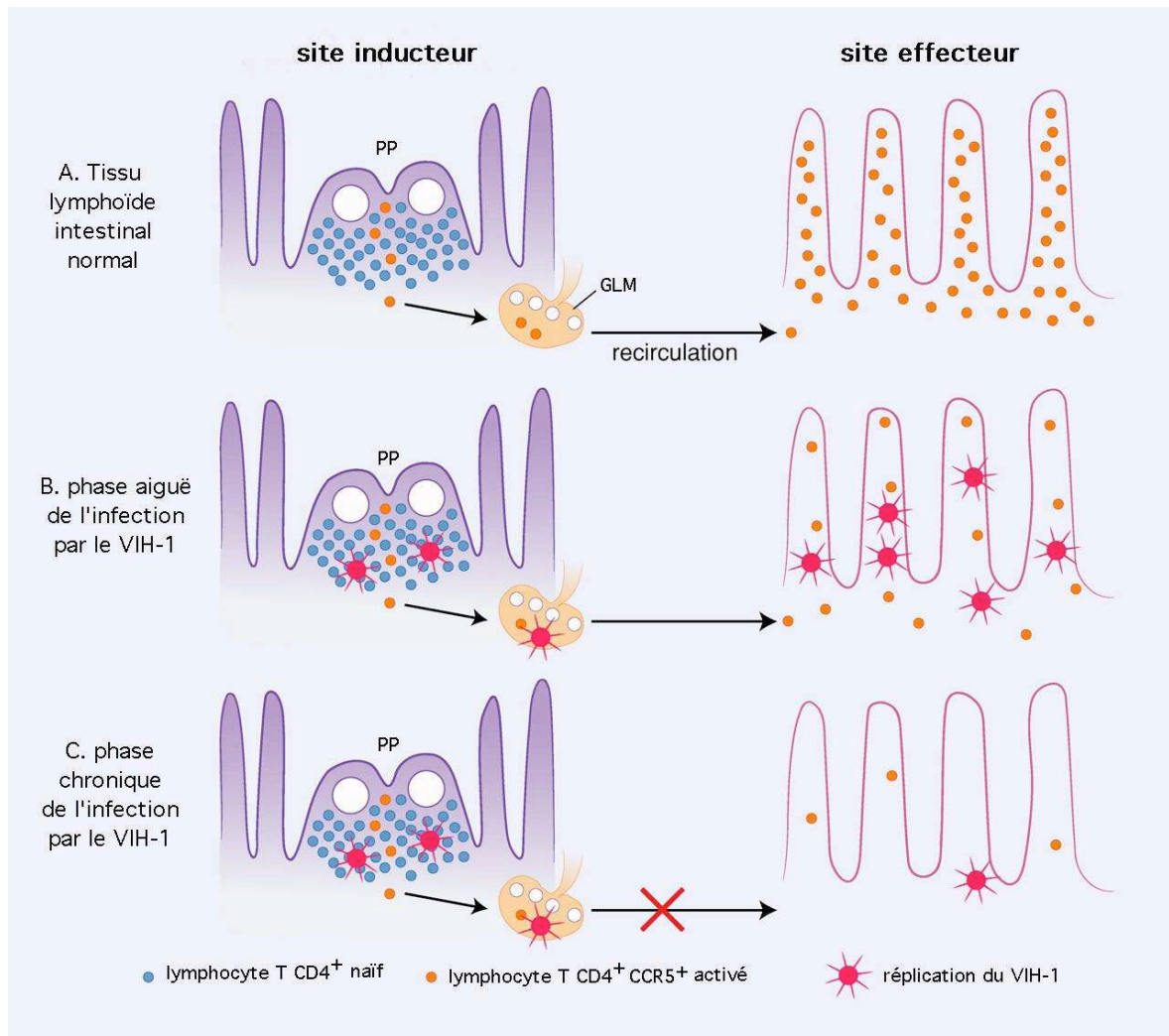


Figure 16 : Modèle de la réplication du VIH-1 dans l'intestin
(d'après Veazey et al, Journal of Experimental Medicine, 2004)

Légende: GLM: ganglion lymphatique mésentérique, PP: plaque de Peyer

immunitaire antivirale qui pourrait jouer un rôle important dans la déplétion intestinale des LT CD4⁺.

Un autre mécanisme possible pourrait être lié à des altérations du trafic lymphocytaire vers le GALT. En effet, des LT CD4⁺ exposés au VIH-1 surexpriment transitoirement la molécule CD62L (L-selectin), un récepteur impliqué dans la migration vers les ganglions lymphatiques (Wang et al., 1997). Il est donc possible que le trafic lymphocytaire soit altéré du fait de la rétention des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques (Rosenberg et al., 1997b). Ainsi, Shacklett et collègues ont montré que le pourcentage de IEL CD8⁺ exprimant $\alpha E\beta 7$ est particulièrement réduit dans le GALT, ce qui suggère que le trafic des LT CD8⁺ spécifiques du VIH-1 vers le GALT et leur rétention au niveau du GALT sont altérés (Shacklett et al., 2003).

Il est cependant envisageable que la déplétion des LT CD4⁺ résulte d'une combinaison de ces différents mécanismes.

c) une déplétion persistante des LT CD4⁺ lors de la phase asymptomatique et du SIDA

Des animaux infectés en intraveineux par le VISmac251 et suivis sur le long terme ont permis de mettre en évidence que le nombre de LT CD4⁺ est toujours fortement réduit dans l'intestin de ces animaux 5 mois post-infection (Veazey et al., 1998). Ainsi, la déplétion intestinale des LT CD4⁺ persiste durant l'évolution de l'infection. Il n'y a pas de restauration, ni en phase asymptomatique ni en phase terminale du SIDA, des LT aussi bien CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ que CD3⁺ CD4⁺ CD8⁺ dans des macaques rhésus infectés (Smit-McBride et al., 1998). Une fois que les LT CD4⁺ de la lamina propria sont déplétées, des cellules infectées sont retrouvées au niveau des sites inducteurs de la muqueuse intestinale (Veazey et al., 2003a) (**Figure 16**).

Dans les singes infectés par du VIS, les LT CD4⁺ restant dans l'intestin, après la déplétion sévère en primo-infection, sont des cellules qui n'expriment plus le corécepteur CCR5 et/ou qui sont naïves (CD45RA⁺) (Veazey et al., 2000a). De plus, quand les animaux sont en phase terminale de SIDA, aucun LT CD4⁺ exprimant CCR5 n'est observé dans les tissus lymphoïdes, les LT CD4⁺ y sont tous naïfs et expriment CXCR4 (Veazey et al., 2000a).

Des biopsies intestinales de patients infectés par le VIH-1 ont également mis en évidence une déplétion des LT CD4⁺ intestinaux. Il a été montré que celle-ci est en effet plus prononcée au niveau intestinal qu'au niveau sanguin (Clayton et al., 1997; Lim et al., 1993; Schneider et al., 1995; Schneider et al., 1994; Ullrich et al., 1995). Cette déplétion persistante des LT CD4⁺ intestinaux, observée chez les animaux tout au long de l'infection, est également

confirmée chez des patients infectés par le VIH-1 (Brenchley et al., 2004). De plus, chez des patients infectés par le VIH-1 ou des singes infectés par le VIS, il a été montré que le GALT est toujours le site d'une réponse T CD8⁺ active et spécifique du VIH-1 et du VIS durant la phase chronique de l'infection, ce qui explique ainsi la persistance de la déplétion de LT CD4⁺ (Ibarrondo et al., 2005; Schmitz et al., 2001; Shacklett et al., 2003).

Par ailleurs, il faut noter que la déplétion intestinale des LT CD4⁺ n'est pas visible dans le cas des LTNP qui maintiennent un niveau normal de LT CD4⁺ dans le GALT (Guadalupe et al., 2003). Cela pourrait refléter l'habileté de la réponse antivirale de l'hôte à contrôler l'infection virale et maintenir ainsi l'intégrité du système immunitaire mucosal.

Dans le cas de patients recevant un traitement HAART, la réplication du VIH-1 au niveau du GALT est diminuée, mais l'augmentation dans le GALT du nombre de LT CD4⁺ est variable contrairement à celle visible dans le sang (Talal et al., 2001). La question de la restauration de la population intestinale des LT CD4⁺ reste controversée. En effet, Guadalupe et collègues ont montré que des patients VIH⁺ sous HAART restaurent leur compartiment des LT CD4⁺ intestinaux, mais que cette restauration est dépendante de la période à laquelle a été initié le traitement (Guadalupe et al., 2003). Leur patient traité en primo-infection a montré une restauration quasi complète, à l'opposé des patients traités lors de la phase chronique de l'infection où la restauration est retardée et incomplète. A l'opposé, Mehandru et collègues, qui ont suivi une cohorte de 8 patients VIH⁺ en primo-infection, n'ont observé qu'une reconstitution partielle en LT CD4⁺ de la muqueuse intestinale, chez ces patients ayant reçu un traitement HAART en primo-infection (Mehandru et al., 2004). Toutefois dans les deux études, la fonctionnalité de ces LT CD4⁺ repeuplant le GALT n'a pas été analysée. Or, une étude similaire chez le singe, infecté et recevant un traitement antirétroviral, a montré que les LT CD4⁺ repeuplant l'intestin avaient une capacité réduite de production de l'IL-2 (Mattapallil et al., 1999; Smit-McBride et al., 1998). Ainsi, bien qu'il y ait un repeuplement numérique de l'intestin, celui-ci ne reflète pas un repeuplement fonctionnel de l'intestin. Cependant, l'administration précoce d'un traitement antirétroviral dans des macaques rhésus infectés induit l'expression de gènes de régénération et de réparation de l'épithélium intestinal (George et al., 2005). Ainsi, il semble, à travers ces différentes études, que plus le traitement est administré rapidement après l'infection, plus les effets seront bénéfiques sur la préservation du système immunitaire mucosal.

Un grand nombre de LT CD4⁺ mémoires/activés sont présents à travers toute la lamina propria intestinale, composant majeur du GALT. Ces cibles cellulaires initiales sont infectées dès les premiers jours suivant l'infection et servent de source d'amplification et de dissémination virale. Ainsi, le large compartiment de LT CD4⁺ mémoires/activés est rapidement éliminé, laissant alors dans la muqueuse intestinale les LT naïfs et les macrophages comme seules cellules hôtes pour le virus.

La décroissance du nombre de cellules susceptibles d'être infectées au niveau du GALT conduit au déclin de la charge virale tissulaire. Malgré le recrutement continu de nouveaux lymphocytes au niveau du GALT, la population de LT CD4⁺ intestinaux n'est jamais restaurée. De plus, les nouveaux lymphocytes recrutés sont perpétuellement activés et infectés et vont ainsi contribuer à la réplication virale et à perpétuer l'infection. La réplication virale intestinale s'accompagne également de l'apparition d'une réponse immunitaire mucosale et systémique spécifique du VIH-1 et du VIS.

En résumé, la muqueuse intestinale est un site précoce de changements et de perturbations de l'homéostasie des populations lymphocytaires T, induits par l'infection par le VIH-1 et le VIS. En effet, la muqueuse intestinale représente un site majeur de la réplication et de l'amplification du VIH-1 et du VIS lors de la primo-infection.

RESULTATS

PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

Les différentes souches du VIH-1 du groupe M sont classifiées en 11 sous-types (www.hiv.lanl.org). Parmi ces sous-types, le VIH-1 B, le plus étudié, est majoritaire dans le monde occidental, et le VIH-1 C, qui s'est répandu rapidement de l'Afrique Centrale à l'Afrique du Sud et à l'Inde, est majoritaire dans la pandémie actuelle en représentant environ 50% des cas d'infection. Les sous-types B et E caractérisaient initialement la pandémie en Asie du Sud-Est et en Inde, le B et le F celle en Amérique du Sud. Plus récemment, le VIH-1 C a fortement envahi ces régions où d'autres sous-types préexistaient, comme la Chine (www.unaids.org). Les sous-types du VIH-1 sont extrêmement polymorphes, et il reste à définir l'influence du polymorphisme sur les caractéristiques biologiques du virus.

Des expériences de compétition avec différents sous-types du VIH-1 *ex vivo* ont montré que le VIH-1 B possédait un meilleur "fitness" que le VIH-1 C sur les lymphocytes T CD4⁺ et les macrophages, mais ces deux sous-types ont la même capacité à infecter les cellules de Langerhans (Ball et al., 2003). *In vivo*, dans une étude basée sur une cohorte de femmes en Afrique, il a été montré que les femmes infectées par le VIH-1 C progressaient plus rapidement vers le SIDA comparativement à celles infectées par le VIH-1 A ou D (Kanki et al., 1999). D'autre part, le risque de transmission materno-foetale semble augmenté dans le cas d'une infection par le VIH-1 C par rapport à une infection par les virus VIH-1 A et D (Blackard et al., 2001). De plus, d'autres études semblent confirmer le fait qu'il existe des différences de transmission liées aux sous-types du VIH-1 : le sous-type B est associé de manière prédominante à une épidémie liée à l'injection de drogues et au contact homosexuel dans les pays occidentaux, alors que les sous-types C et E se sont répandus préférentiellement par contact hétérosexuel en Thaïlande, en Inde et en Afrique Sub-Saharienne. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le VIH-1 E se réplique plus efficacement que les virus des autres sous-types dans les cellules de Langerhans, cibles potentielles dans la transmission hétérosexuelle (Soto-Ramirez et al., 1996), mais ces dernières données restent controversées (Dittmar et al., 1997; Pope et al., 1997).

Toutes ces observations, *ex vivo* et *in vivo*, relatives à l'influence du polymorphisme viral sur la pathogénèse restent ponctuelles, et aucune étude systématique sur le sujet n'a à ce jour été publiée. En conséquence, aucune corrélation entre un polymorphisme spécifique d'un sous-type viral, la virulence et la transmission du VIH-1 ne peut être retenue de façon

définitive. Ainsi, le rôle joué par ce polymorphisme dans la pathogenèse induite par le VIH-1 reste à démontrer.

Le promoteur viral est un élément important pour le tropisme du VIH-1 (Krebs et al., 1999). En effet, il module la transcription des gènes viraux et possède donc une influence sur le taux de la réplication et pourrait en conséquence jouer un rôle important dans la pathogenèse virale. Or, le promoteur des sous-types du VIH-1 est également polymorphe et chaque sous-type du VIH-1 possède une configuration unique et conservée de son promoteur minimal/activateur, avec des variations portant principalement sur les sites de fixation des facteurs de transcription NF- κ B (1 dans le VIH-1 E, 2 dans le VIH-1 B, 3 dans le VIH-1 C), AP-1 prédit *in silico* dans le VIH-1 C et E et absent dans le VIH-1 B, et C/EBP présent uniquement dans le VIH-1 B (cf. Introduction I. B et C) (Jeeninga et al., 2000). L'étude de l'activité relative des LTRs des différents sous-types du VIH-1, réalisée *in vitro*, montre des différences nettes. Les promoteurs des sous-types C et E possèdent des activités basales et trans-activées par Tat plus élevées que celle du sous-type B (Jeeninga et al., 2000; Montano et al., 1997; Naghavi et al., 1999b). Ces activités, dépendantes du type cellulaire utilisé et de son état d'activation, ont une influence sur la dynamique de la réplication virale (van Opijnen et al., 2004a). Ainsi, il semble bien exister une variation de l'activité promotrice spécifique du sous-type, qui pourrait expliquer en partie la prévalence des sous-types C et E dans la pandémie actuelle.

Mon travail de thèse a porté sur l'étude du promoteur minimal/activateur des sous-types B, C et E du VIH-1. Nous avons voulu mettre en évidence l'impact du polymorphisme du promoteur minimal/activateur des sous-types du VIH-1 sur la dynamique de la réplication virale *in vivo*.

Afin d'étudier cette problématique *in vivo*, nous avons construit des clones chimères VIS/VIH-1 à partir du génome du VISmac239, permettant un accès direct au modèle animal du macaque rhésus. Dans ces clones, nous avons redessiné la région entière de U3 du VIS en séparant la séquence codante de *nef* de celle de U3. Le clone ainsi obtenu porte un promoteur tronqué du domaine modulateur et restreint au promoteur minimal/activateur (STR-WT, STR pour Short Terminal Repeat). Nous avons ensuite créé une cassette dans la région promotrice minimale/activatrice de U3 et cloné les régions correspondantes des U3 du VIH-1 B, C et E (STR-B, -C et -E) (**article 1**).

Grâce à ces virus chimères, nous avons montré que le polymorphisme du promoteur sous-type spécifique du VIH-1 se traduit par des phénotypes différentiels marqués de la réplication virale, dépendant de l'environnement tissulaire dans lequel le virus se réplique. Par ailleurs, *in vivo*, des fluctuations temporelles et spatiales de la dynamique de la réplication sont observées (**article 1**). Ces différences spatiales et temporelles nous ont conduits à étudier les singes co-infectés par les trois virus chimères lors de la primo-infection, afin de déterminer la source de production de la virémie dans le sérum en primo-infection (**article 2**).

ARTICLE 1

“ HIV-1 clade promoters strongly influence spatial and temporal dynamics of viral replication *in vivo* ”

**Mireille Centlivre, Peter Sommer, Marie Michel, Raphaël Ho Tsong Fang,
Sandrine Gofflo, Jenny Valladeau, Nathalie Schmitt, Françoise Thierry, Bruno Hurtrel,
Simon Wain-Hobson, and Monica Sala**

The Journal of Clinical Investigation, 2005, 115 :348-358

Bien que le déterminant premier du tropisme cellulaire soit l'interaction de l'enveloppe virale avec les récepteurs et les co-récepteurs cellulaires, d'autres éléments viraux peuvent moduler de manière significative la réplication du VIH-1. Le promoteur du VIH-1 pourrait être un de ces éléments en modulant le niveau de la transcription virale, et par conséquent celui de la réplication virale. Le promoteur du VIH-1 est polymorphe pour une variété de sites de fixation de facteurs de transcription cellulaires, toutefois l'impact de ce polymorphisme sur la réplication virale *in vivo* n'est pas élucidé.

Pour étudier cette problématique, nous avons construit un clone du VISmac239, nommé STR-WT (STR pour "Short Terminal Repeat"), dans lequel les régions chevauchantes de U3 et de *nef* ont été dissociées, le promoteur viral est ainsi réduit au promoteur minimal/activateur. Basé sur le clone STR-WT, nous avons généré trois virus chimères VIH-1/VIS, nommés STR-B, STR-C et STR-E, dans lesquels, respectivement, le promoteur minimal/activateur du VIH-1 de sous-type B, ou celui du VIH-1 C, ou celui du VIH-1 E, a été inséré à la place de celui du VIS. Ces virus chimères ont été caractérisés *in vitro* et *ex vivo*. Lors de mono-infections, les chimères STR se répliquent avec une cinétique comparable à celle du VISmac239 et du STR-WT aussi bien sur CEMx174 (lignée cellulaire établie) que sur rPBMCs. Dans des expériences de compétition virale 2 à 2 (B/C, B/E, C/E) ou 3 à 3 (B/C/E), le virus STR-B, lorsqu'il est présent, prédomine sur les autres chimères dès les premiers jours de l'infection et sur plus de 30 jours de culture. Le virus STR-C prédomine sur le virus STR-E dans la compétition C/E. En conclusion, un phénotype spécifique du promoteur a pu être mis en évidence *ex vivo*.

Nous avons poursuivi la caractérisation du promoteur minimal/activateur de ces sous-types, en montrant par des expériences de retard de migration sur gel qu'un site de fixation pour le facteur de transcription AP-1 est présent dans les promoteurs minimaux/activateurs des sous-types C et E mais absent dans celui du sous-type B.

L'IL-7 est connue pour induire l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B. Puisque nous avons démontré qu'un site de fixation pour AP-1 est présent uniquement dans le STR-C et STR-E, nous avons réalisé une expérience de compétition *ex vivo* avec les trois virus chimères STR sur des histocultures thymiques humaines en présence ou en absence d'IL-7. La présence d'IL-7 est essentielle pour soutenir la réplication virale dans les thymocytes. Le virus STR-C domine sur le STR-B dans le surnageant de culture en quelques jours, le STR-E n'étant jamais détecté. Ces résultats suggèrent que la réplication des virus

chimères est régulée de manière différentielle par l'IL-7, et donc en général par l'environnement cellulaire dans lequel le virus se réplique.

Nous avons enfin co-infecté deux macaques rhésus avec les trois virus chimères (STR-B, -C et -E). Nous avons montré qu'il existait en primo-infection une différence entre les virus associés aux rPBMCs (STR-B) et les virus libres dans le sérum (STR-C et -E). De plus, un changement dans le génotype viral dans le sérum a pu aussi être mis en évidence entre la primo-infection (STR-C et -E) et la phase asymptomatique (STR-B) de l'infection.

Ces résultats montrent que le polymorphisme du promoteur spécifique des sous-types du VIH-1 se traduit *in vivo* par des phénotypes différentiels marqués de la réplication virale, dépendant de l'environnement tissulaire dans lequel le virus se réplique. De plus, des différences spatiales et temporelles dans la dynamique de la réplication virale *in vivo* sont observées.



HIV-1 clade promoters strongly influence spatial and temporal dynamics of viral replication in vivo

Mireille Centlivre,¹ Peter Sommer,^{1,2} Marie Michel,¹ Raphaël Ho Tsong Fang,³ Sandrine Gofflo,⁴ Jenny Valladeau,⁴ Nathalie Schmitt,⁵ Françoise Thierry,⁶ Bruno Hurtrel,³ Simon Wain-Hobson,¹ and Monica Sala¹

¹Unité de Rétrovirologie Moléculaire, ²Unité de Biologie Cellulaire du Noyau, and ³Unité de Recherche et d'Expertise Physiopathologie des Infections Lentivirales, Institut Pasteur, Paris, France. ⁴Université Claude Bernard, Hôpital Edouard Herriot, Lyon, France.

⁵Unité de Biologie des Rétrovirus and ⁶Unité d'Expression Génétique et Maladies, Institut Pasteur, Paris, France.

Although the primary determinant of cell tropism is the interaction of viral envelope or capsid proteins with cellular receptors, other viral elements can strongly modulate viral replication. While the HIV-1 promoter is polymorphic for a variety of transcription factor binding sites, the impact of these polymorphisms on viral replication in vivo is not known. To address this issue, we engineered isogenic SIVmac239 chimeras harboring the core promoter/enhancer from HIV-1 clades B, C, and E. Here it is shown that the clade C and E core promoters/enhancers bear a noncanonical activator protein-1 (AP-1) binding site, absent from the corresponding clade B region. Relative ex vivo replication of chimeras was strongly dependent on the tissue culture system used. Notably, in thymic histocultures, replication of the clade C chimera was favored by IL-7 enrichment, which suggests that the clade C polymorphism in the AP-1 and NF- κ B binding sites is involved. Simultaneous infection of rhesus macaques with the 3 chimeras revealed a strong predominance of the clade C chimera during primary infection. Thereafter, the B chimera dominated in all tissues. These data show that the clade C promoter is particularly adapted to sustain viral replication in primary viremia and that clade-specific promoter polymorphisms constitute a major determinant for viral replication.

Introduction

The effect of HIV-1 genetic variation on viral transmission and pathogenesis remains poorly defined. Epidemiological studies have suggested that HIV-1 group M clades might differ in their properties. Epidemiological and phylogenetic studies have also shown that HIV-1 clades are unequally spread out throughout the world, with HIV-1 B being predominant in the West, and HIV-1 C and HIV-1 E in sub-Saharan Africa and Asia (Thailand and India), respectively (<http://www.unaids.org>). Among the HIV-1 group M viruses, HIV-1 C and HIV-1 E are by far the most prevalent HIVs in the world and are linked to heterosexual transmission. Clade C has spread rapidly from central Africa down to South Africa and it is now invading regions where other clades preexisted among high-risk populations. Thus, the clade B and E viruses initially characterized the pandemic in Southeast Asia and India, while B and F were among the first strains in South America. More recently, clade C has strongly invaded these regions to the point at which it is now dominant in China (<http://www.unaids.org>).

HIV and SIV infect various cell types, with CD4⁺ T lymphocytes, macrophages, and DCs being the more frequently infected cell populations in vivo. There is a general consensus that highly pro-

ductive replication in activated CD4⁺ T lymphocytes contributes massively to viremia, whereas infected macrophages and DCs constitute reservoirs of clinical relevance (1, 2). Yet the influence of local tissue environments on the modulation of viral replication in different cellular subsets in vivo remains largely unknown.

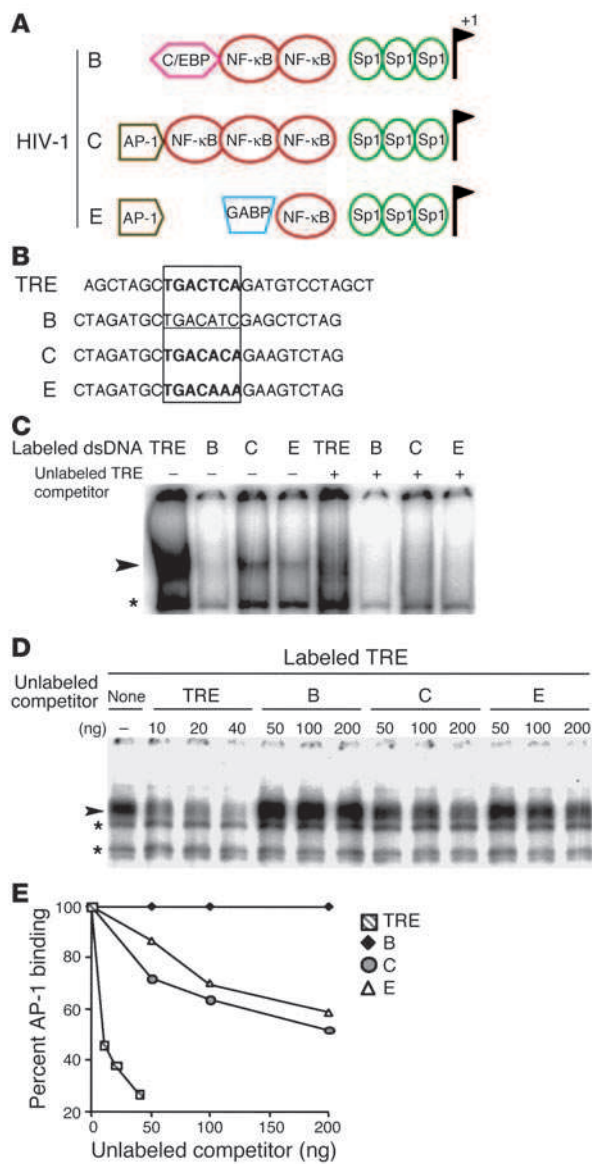
It has been well established that specific HIV/SIV *env* (the gene encoding the envelope proteins) polymorphisms influence viral infection of particular cell subsets (3, 4). Yet viral replication and spread in the host is certainly dependent on events occurring after entry modulation viral latency or productive infection. Accumulating HIV-1 sequence data have shown that the viral promoter is highly polymorphic with clade-specific traits (<http://www.hiv.lanl.gov>). Indeed, different organization and numbers of transcription factor binding sites characterize each HIV-1 subtype-specific promoter. Hence, recruitment of cellular transcription factors might be at the origin of clade-dependent modulation of viral transcription, directly influencing replication and turnover in cell subsets (5, 6).

The HIV-1 promoter is localized in the U3 region of the long terminal repeat (LTR) and can be subdivided into 2 major functional domains: a modulatory region and a downstream core promoter/enhancer (7). The role of the HIV-1 modulatory region (including a negative regulatory element [NRE]) overlapping the 3' region of *nef* (the gene encoding the viral negative factor) remains poorly defined (7, 8). In contrast, the downstream core promoter/enhancer has been widely studied. The core promoter (spanning the CATA box and 3 Sp1 transcription factor binding sites) is generally conserved among clades, with the exception of clade E isolates and some recombinant clade AG strains in which the CATATAA motif is substituted by a CATAAAA sequence (9). One to 3 NF- κ B binding sites characterize different enhancer regions of

Nonstandard abbreviations used: AP-1, activator protein-1; ds, double-stranded; GALT, gut-associated lymphoid tissue; LC, Langerhans cell; LTR, long terminal repeat; MEF, macrophage-enriched fraction; NFAT, nuclear factor of activated T cells; NRE, negative regulatory element; 3'PPT, 3' polypurine tract; RhM, rhesus macaque; rPBMC, RhM PBMC; STR, short terminal repeat; TCEF, T cell-enriched fraction; TCID₅₀, 50% tissue culture infectious dose; TRE, tetradecanoyl phorbol acetate responsive element.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J. Clin. Invest.* 115:348–358 (2005).
doi:10.1172/JCI200522873.



HIV-1 subtypes. The clade C enhancer bears 3 NF-κB binding sites, while the clade B isolates are characterized by 2 NF-κB binding sites and an upstream CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) site (10). In clade E promoters, only 1 NF-κB binding site is present along with an upstream active GA-binding protein (GABP) site (11) (Figure 1A). In vitro and ex vivo data have shown that the core promoter/enhancer is sufficient to promote viral replication (12) and that host cell type and the activation state of the cell affect viral replication, depending on viral promoter polymorphism (6).

The aim of the present study was to determine in vivo the influence of HIV clade-specific promoter polymorphism on differential viral replication in different tissues. In order to analyze the B, C, and E core promoters/enhancers in the context of an isogenic in vivo replication-competent virus, we engineered a SIVmac239 clone in which it was possible to freely exchange the viral promoter without altering *nef*. Based on this genetically modified clone, short terminal repeat (STR) chimeras were generated differing only in their promoter sequences derived from HIV-1 clade B, C, and E prototypes (13). In vitro “mono-infections” with each of the 3 chi-

Figure 1

Analysis of putative AP-1 binding sites in HIV-1 clade C and E promoters/enhancers. **(A)** Polymorphisms among transcription factor binding sites in the core promoter/enhancer regions of HIV-1 clades B, C, and E. The putative clade C and E noncanonical AP-1 binding sites have never before been analyzed experimentally. **(B)** 5′–3′ strands of the TRE, B, C, and E dsDNA used in gel-shift and competition analyses. The TRE of human collagenase 1, bearing a canonical AP-1 binding site (in bold), was used as positive control. C and E nucleotide sequences span the putative AP-1 binding sites (in bold) of the HIV-1 clade C and E enhancers, respectively. The clade B sequence spans the homologous sequence (underlined) in the enhancer region of the HIV-1 clade B LTR, used as negative control. TRE is flanked by *Alu*I, and viral sequences, by *Xba*I (B, C, and E) restriction sites. **(C)** Gel-shift assays with HeLa nuclear extracts. Arrowhead and asterisk indicate AP-1–specific and nonspecific binding, respectively, to the indicated labeled dsDNA (0.5 ng), described in **B**. The presence of an 80-fold excess of unlabeled dsDNA TRE competitor (+) is indicated. **(D and E)** Gel-shift competition assays with HeLa nuclear extracts. Arrowhead and asterisks indicate AP-1–specific and nonspecific binding, respectively, to the labeled TRE (0.5 ng). Competition with increasing concentrations of the indicated unlabeled dsDNA competitors is shown on a gel **(D)** and was quantified by ImageQuant and plotted **(E)**.

meras led to replication kinetics comparable to that of the parental SIVmac239 virus. However, ex vivo growth competition kinetics of Chinese rhesus macaque (RhM) PBMCs (rPBMCs) showed that STR variants replicated differently once they were competing in a fixed environment. Moreover, ex vivo coinfection of human thymic histocultures with the 3 chimeras in the presence of IL-7 resulted in massive replication of the clade C chimera.

The influence of HIV-1 promoter polymorphisms on viral replication was then studied in vivo by coinfection of 2 Chinese RhMs with the B, C, and E STR chimeras. During the 8 months of follow-up of the infection, blood, serum, and lymph node body compartments were analyzed and, at sacrifice, the relative frequency of STR chimeras was determined in an extensive set of tissues. There was a perfect correlation between data from the 2 coinfecting macaques showing a strong predominance of the clade C chimera during primary infection, followed by the dominance of the clade B chimera in all tissues. The in vivo data, in parallel with in vitro and ex vivo experiments, reveal that the clade C promoter is particularly adapted to sustain viral replication in primary viremia and that clade-specific promoter polymorphisms constitute a major determinant for viral replication.

Results

An activator protein-1 binding site is present in the HIV-1 clade C and E enhancers and is absent from clade B. Sequencing of HIV-1 primary isolates (<http://www.hiv.lanl.gov>) has revealed viral promoter polymorphisms for a variety of transcription factor binding sites with conserved clade-specific features. Notably, in the promoter enhancer just upstream of the NF-κB binding sites, a noncanonical activator protein-1 (AP-1) binding site has been predicted but not demonstrated in the clade C and E promoters (6, 13) (Figure 1A). Thus, we performed gel-shift assays to verify the presence of the AP-1 binding sites using HeLa nuclear extracts (14, 15) and double-stranded DNA (dsDNA) oligonucleotides spanning the regions of the HIV-1 C and E enhancers harboring the putative AP-1 binding sites. The homologous region of the HIV-1 B enhancer was used as negative control for AP-1 binding, and the tetradecanoyl phorbol acetate responsive



element (TRE), bearing a canonical binding site, was used as positive control (Figure 1B). This analysis showed that an AP-1 site was indeed present in clades C and E and, as expected, was absent from the clade B promoter (Figure 1, C-E). These data were confirmed using purified JunB/Fra2 and JunB/c-Fos heterodimers (data not shown). In this experimental context, the HIV-1 clade B AP-1 binding site sequence, differing by only 2 nucleotides from the canonical AP-1 binding site, acted as a mutated AP-1 binding site as it was unable to directly bind AP-1 (Figure 1C) or to compete with the TRE (Figure 1, C and D). Competition experiments allowed determination of the specificity and the strength of AP-1 binding, as in this experimental technique the quantity of nuclear extract and dsDNA competitors are not limiting factors. Even at a 400-fold excess of unlabeled competitor on labeled target for AP-1 direct binding (Figure 1D), it could be shown that AP-1 bound specifically to the clade C and E binding sites and that the binding to the clade C site was at least twice as strong as the binding to the clade E site (Figure 1E).

SIVmac239 chimeras bearing HIV-1 clade-specific promoters are fully replication competent. With the aim of analyzing the effect of promoter polymorphism on viral replication both *ex vivo* and *in vivo*, we constructed a SIVmac239 derivative in which it was possible to modify the viral promoter without altering *nef* (16). In SIVmac239, *nef* overlaps approximately 80% of U3 in the 3' LTR. This is due to the localization of *cis*-acting elements that are essential for viral replication within *nef*: the U-box, the 3' polypurine tract (3'PPT), and the viral attachment site (*att*) (17). The extensive overlap limits the possibility of modifying the promoter region without affecting *Nef*. To overcome this and to prevent possible effects of the SIVmac239 NRE on the core promoter/enhancer, we inactivated the *cis*-acting elements by introducing 13 silent point mutations in *nef* and inserted the functional elements between the *nef* stop codon and the single NF-κB binding site in the SIVmac239 U3 region (Figure 2). The relocation of the 3' PPT displaced the U3 region downstream of *nef* and resulted in a clone with a short U3 of approximately 110 bp, called STR. The SIV core promoter/enhancer was then replaced by the corresponding elements from the U3 of HIV-1 B, C, and E (Figure 1A). The promoter sequence from nucleotide -147 to nucleotide -1 of the clade B HIV-1 LAI and the clade C1 and clade E HIV-1 strain analogous sequences (GenBank accession numbers K02013, AF127567, and AF127570, respectively), aligned with the clade B HIV-1 LAI sequence as a reference (13), were cloned through the *Psp*AI and *Pst*I sites in the STR construct (Figure 2). After transient transfection of the CEMx174 cell line (derived from the fusion of a 174 human B cell line and the CEM human T cell line) (18, 19), viral stocks of isogenic STR variants referred to as STR-WT, STR-B, STR-C, and STR-E were made, bearing the U3 core promoter/enhancer of SIVmac239, and clade B, C, and E HIV-1 selected strains, respectively. The replication kinetics of the 4 STR clones were characterized on CEMx174 and rPBMCs pooled from 5 SIVmac239-naive Chinese RhMs (Figure 3, A and B). All STR viruses were replication competent and showed replication kinetics very similar to that of the parental SIVmac239.

Growth competition experiments showed differential fitness. Viral replication kinetics can only discern

gross changes in replication capacity and do not reflect the effect of subtle genetic polymorphisms on the replication rates of viral isolates. Compared with individual replication kinetics in mono-infections, growth competition experiments in cell culture between viral isolates provides a far more sensitive assay (6, 9, 20-22). In competition experiments, viruses must share vital resources. This inevitably enhances subtle phenotypic differences undetectable in mono-infections. Hence, using pooled rPBMCs, we performed growth competition experiments in which STR variants competed 2 by 2 (B/C, B/E, and C/E) and 3 by 3 (B/C/E) (Figure 4, A-D). For all combinations, from the very first data point (day 3) to the last (day 39), the STR-B virus predominated, with relative growth as follows (in descending order): STR-B, STR-C, and STR-E. Even when the relative input ratio of the STR-C variant to the STR-B variant was modified from 1:1 to 19:1, the STR-B virus outgrew the competitor, although STR-C was able to catch up with STR-B at intermediate time points (Supplemental Figure 1 and data not shown; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI200522873DS1). This unexpected observation was not due to an intrinsic bias in the method used, as we were able to reproducibly detect all 3 variants at equivalent frequencies in 1:1:1 input mixtures, well in correlation with the 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) values of the stocks. Moreover, control experiments on the 1:19 input mix gave up to 100% STR-C. Thus, although poorly represented in the input mix, the STR-B was able to outgrow STR-C within the first 3 days of competition.

As a prerequisite to *in vivo* competition experiments in RhMs, we sought to exclude founder effects on viral replication that could

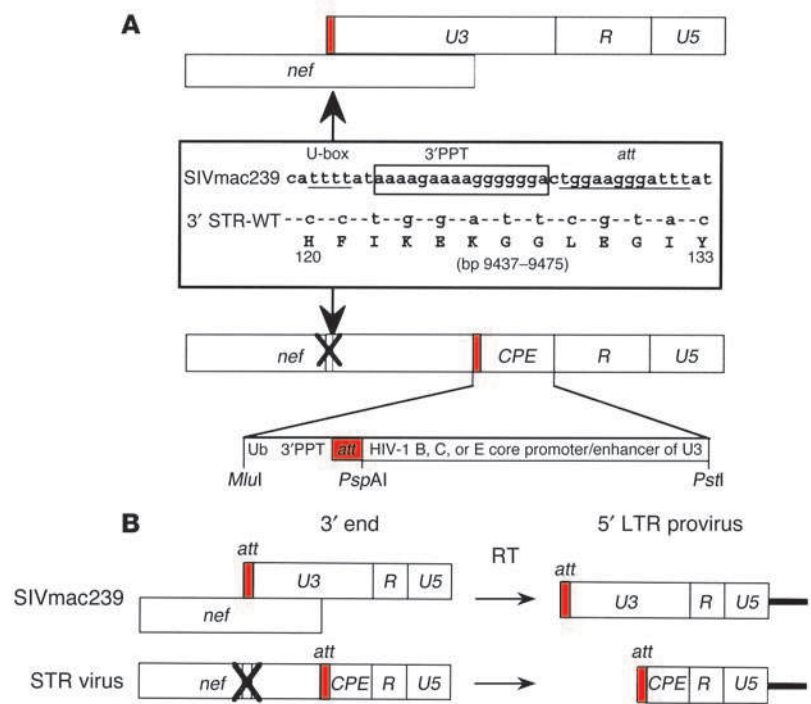


Figure 2 Schematic representation of the STR construct. (A) Silent point mutations in *nef*, cloning sites, and redesigned region of U3 in the 3'LTR are detailed. Dashes in the 3'STR-WT sequence correspond to the same nucleotides as those of the parental SIVmac239 sequence. Both sequences are localized in their respective genomes at positions indicated by arrows. (B) 3' and 5' LTR structures in SIVmac239 versus homologous regions in the STR chimeras. CPE, core promoter/enhancer.

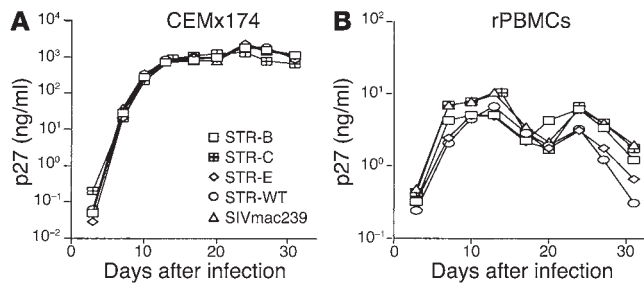


Figure 3
Mean values of replication kinetics assays performed in triplicate. Kinetics assays performed on CEMx174 cells (A) and on rPBMCs obtained from 5 SIV-naïve Chinese RhMs, pooled just before infection (B).

be linked to a different RhM genetic background. Accordingly, replication kinetics and growth competition experiments were performed on unpooled rPBMCs from the 2 monkeys chosen for subsequent inoculation. Again, the STR-B virus was predominant in the cultures at all time points tested (Supplemental Figure 2). Hence, the STR chimeras, despite their comparable replication kinetics in mono-infection experiments, revealed strikingly different fitness in growth competition.

IL-7-dependent differential replication of STR chimeras. Growth competition kinetics in rPBMCs showed that STR variants replicate differently once they are competing in a fixed environment. It has been demonstrated that IL-7, along with the TNF- α secreted in the thymic microenvironment, is a critical cytokine for HIV replication in thymocytes, which is regulated at the transcriptional level through NF- κ B-dependent activation (23, 24). Moreover, in activated human T lymphocytes, the IL-7 signaling pathway has been shown to be involved in the activation of the Fos and Jun proteins that compose AP-1 (25). Because an AP-1 binding site is present in the STR-C and STR-E promoters and is absent from the STR-B promoter, and the NF- κ B binding sites differ in number among the STR chimeras (Figure 1), we set up a competition assay to verify the possible influence of IL-7 on relative replication of STR clade-specific viruses. Hence, this *ex vivo* growth competition

experiment was performed using human thymic histocultures (26) in the presence or absence of IL-7. Cytokine treatment sustained viral replication in thymocytes, as increased p27 viral *gag* protein levels were only detectable in the presence of IL-7 for up to 21 days of culture (Figure 5A). Analysis of the relative frequency of STR viruses in the culture supernatant showed that STR-C dominated within a few days over STR-B, with STR-E being undetectable from the onset (Figure 5B). Interestingly, the profile of cell-associated viruses did not correspond to that of free virions in the supernatant (Figure 5C). This discrepancy could be explained by apoptosis or necrosis involving the cells sustaining STR-C replication (Figure 5B), which might have been counterselected from those harboring the less robust STR-B variant (Figure 5C). In conclusion, these data show differential dynamics of replication of the 3 STR chimeras in the presence of IL-7.

Serum- and cell-associated virus differs in primary infection. Although *ex vivo* studies are useful for studying viral replication in an established environment, they cannot mimic the natural setting within the infected host. Hence, with the aim of analyzing *in vivo* the influence on viral replication and colonization of the host, we performed coinfection with the STR chimeras of 2 Chinese RhMs. RhMs 97R0092 and 98R0012 were infected intravenously with 100 TCID₅₀ of each of the 3 STR chimeras. Determination of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte counts (Figure 6A), plasma RNA viral loads (Figure 6B), and anti-SIVmac239 titers (Figure 6C) showed that STR chimeras efficiently infected the 2 macaques. Moreover, infection parameters showed that monkey 97R0092 appeared to be typical for infection in RhMs, with equivalent TCID₅₀ of parental SIVmac239, while monkey 98R0012 infection was markedly atypical because viral RNA levels quickly approach background levels (Figure 6B) (27).

Coinfection with the STR chimeras enabled us to monitor replication in different body compartments using the 3 different promoters as markers. Independently of the capacity of each monkey to control viral RNA levels, this *in vivo* experiment revealed a perfect correlation between data from the 2 coinfecting macaques. The relative proportion of viral DNA present in rPBMCs obtained from both infected monkeys (Figure 7, A and B) was not reflected by that of the circulating viruses from serum (Figure 7, C and D). During the first 2 months of infection, STR-C virus was the predominant

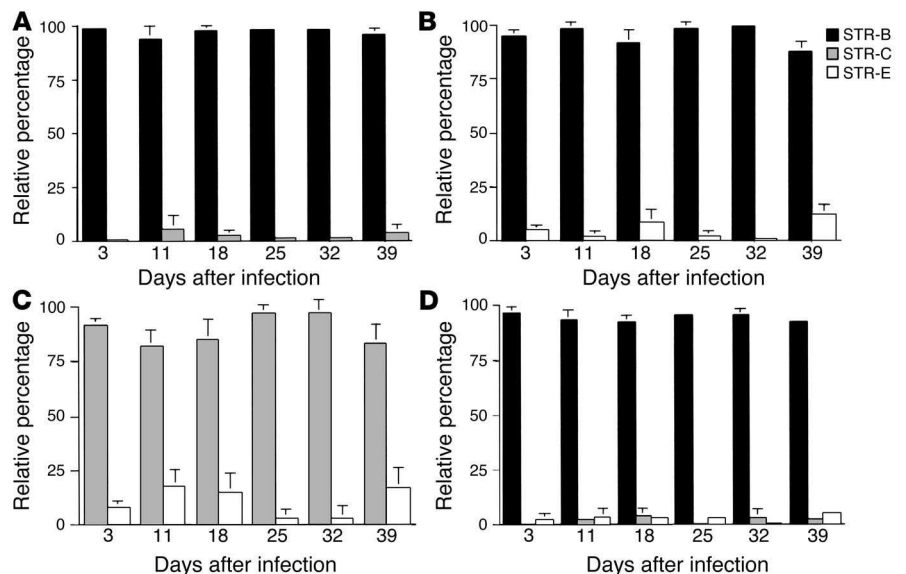


Figure 4
Growth competition experiments using pooled rPBMCs (each data point is in triplicate). *Ex vivo* coinfection with STR-B (black bars) and STR-C (gray bars) (A), STR-B and STR-E (white bars) (B), STR-C and STR-E (C), and STR-B, STR-C, and STR-E (D).

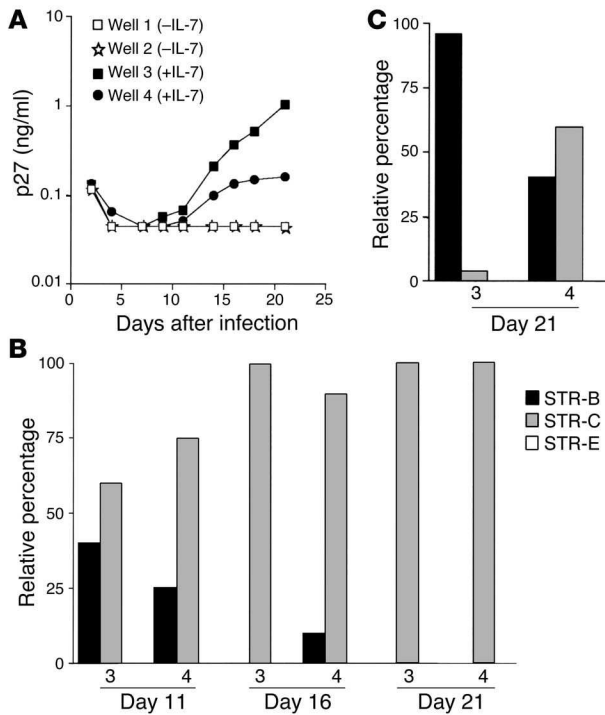


Figure 5

Growth competition experiments using fresh human thymus fragments. (A) Global viral kinetics were performed in duplicate in the absence (wells 1 and 2) or presence (wells 3 and 4) of 5 ng/ml IL-7. (B and C) Relative percentage of STR chimeras determined for thymic histoculture supernatants (B) and cells (C) from wells 3 and 4.

form in the serum, along with the STR-E virus, for both animals. Then a switch to the STR-B form occurred in monkey 97R0092, persisting up to sacrifice (week 36). This distribution was in sharp contrast to the situation in rPBMCs, for which the STR-B virus dominated the early phase of infection in both monkeys. Notwithstanding those results, at peak viremia (day 13), the chimera DNA profile in rPBMCs showed the rebound of the STR-C upon the STR-B form. Then STR-B became again the dominant genotype, with exceptions at weeks 18 and 36, for monkey 97R0092.

At weeks 10, 22, and 31, we investigated the distribution of the 3 STR viruses in peripheral lymph nodes (left and right inguinal and left axillary). At all time points, in macrophage-enriched fractions (MEFs) or CD4⁺ T cell-enriched fractions (TCEFs) obtained from lymph nodes, the predominant virus was STR-B, and the relative proportion among variants in TCEFs recalled that of the corresponding rPBMC samples (Figure 7, E and F). In order to identify

recombination or substitution events that might have occurred during infection, the STR regions were analyzed by sequencing the chimeric STR promoters. The 2 sets of primers used exclusively amplify the complete 5' STR promoter regions (see Methods). Analysis of lymph nodes, rPBMCs, and serum at weeks 10, 22, and 31 did not show any mutations (data not shown), confirming that the SIV-STR configuration is genetically stable in vivo, as shown previously for an analogous strain (17).

Persistent STR-C and STR-E despite predominance of STR-B. During the 8 months of infection, access to body compartments was obviously limited. At sacrifice, it was possible to investigate the distribution of the different STR chimeras in an extensive set of tissues (Table 1). In general, cellular fractions were enriched for macrophages and CD4⁺ T lymphocytes (MEFs and TCEFs, respectively). It was not possible to recover viral DNA from the jejunum of either animal, although it was possible to amplify CD3 γ DNA from the same samples. Interestingly, this part of the gut undergoes the greatest depletion of activated memory CD4⁺ T lymphocytes (28). As a consequence of active viral replication, infected cells might have been eliminated to undetectable levels. Although the STR-B variant predominated in almost all samples, STR-C and to a lesser extent STR-E were present in many organs analyzed, at relative percentages ranging from 1–29% (Table 1). Remarkably, the relative proportion between STR-B and STR-C chimeras in rPBMCs did not reflect that of any organ analyzed at sacrifice of monkey 97R0092.

STR-B predominated in recently infected epithelial Langerhans cells at sacrifice. Langerhans cells (LCs) are of major interest as they might play a primary role in sexual transmission of HIV/SIV infection (29). However, a few publications (30, 31) have shown that LC homeostasis is unchanged in skin and vaginal epithelia during HIV/SIV pathogenesis. By HLA-DR staining of skin epidermis from the 2 monkeys and comparison of the data with that in the literature (31), it was possible to show that homeostasis of cutaneous DC populations (LCs and dermal DCs) was not altered during infection

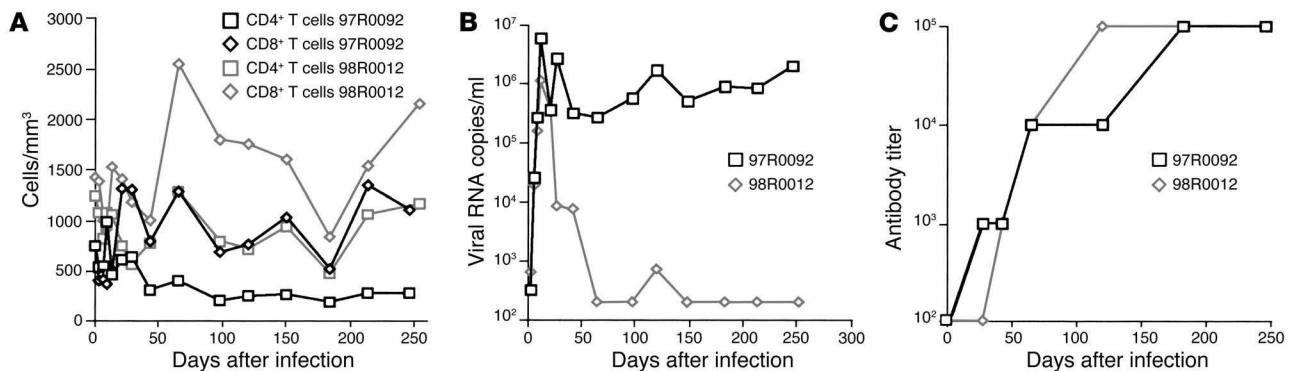
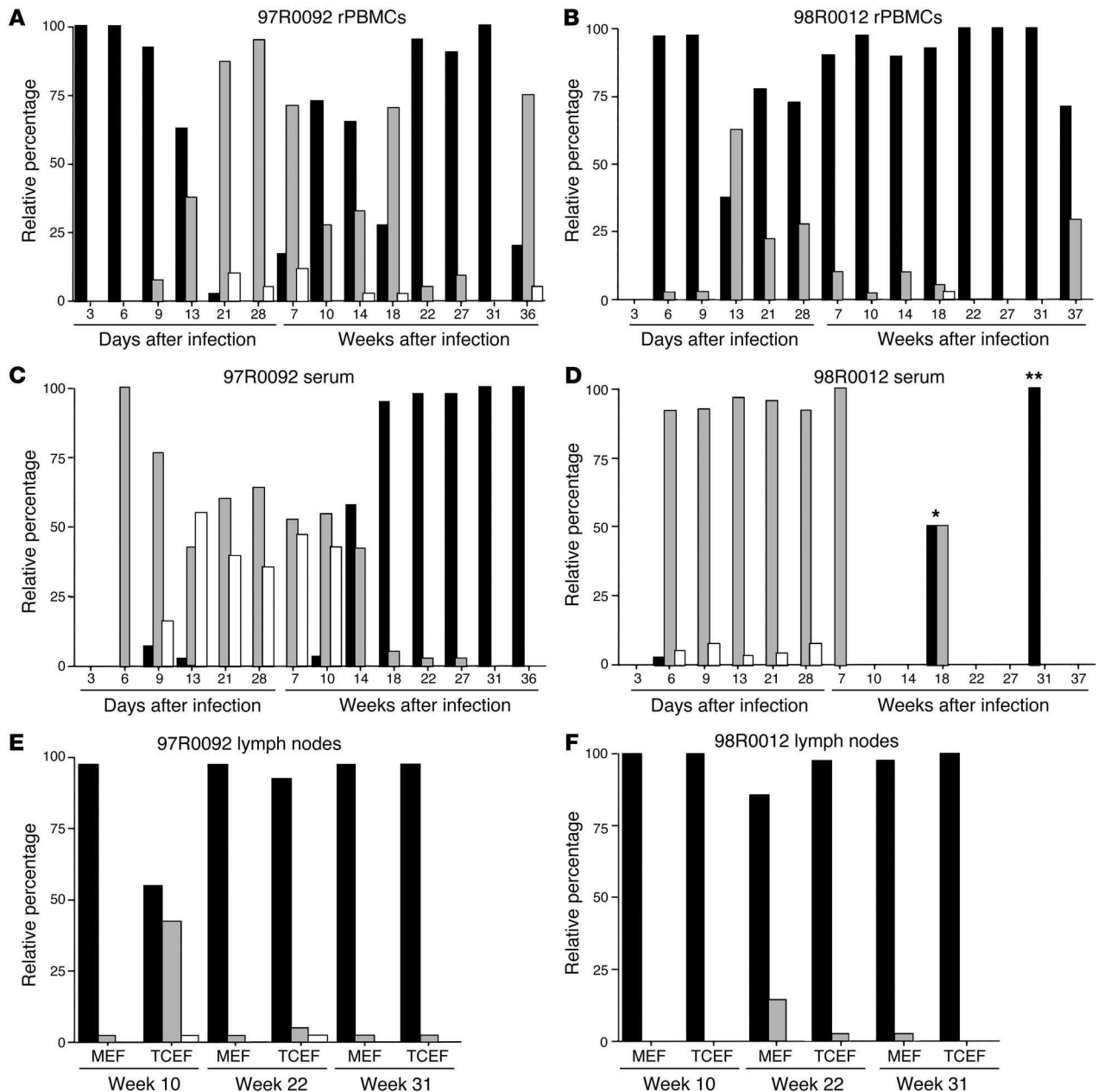


Figure 6

Immunological and virological parameters after infection of RhMs 97R0092 and 98R0012. (A) Blood CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte counts. (B) Serum viral RNA loads (lower limit of detection, 200 copies/ml). (C) Serum antibody responses to infection by STR chimeras (lower limit of detection, 100-fold dilution). In C, y axis values represent the reciprocal of experimental values.

**Figure 7**

Relative frequency of STR chimeras. Relative frequencies were determined in rPBMCs of monkey 97R0092 (A) and monkey 98R0012 (B); in serum of monkey 97R0092 (C) and monkey 98R0012 (D) (* and ** correspond to a viremia of 740 copies/ml and to a value just at the cut-off, respectively); and in MEFs and TCEFs obtained from the lymph nodes of monkey 97R0092 (E) and monkey 98R0012 (F).

(Figure 8, A and D). Indeed, a normal distribution of LCs in skin and vaginal epithelium in both infected animals was shown using CD1a as a specific marker for LCs (Figure 8, B and E). The skin epidermis was completely devoid of T cells (Figure 8C). Nevertheless, in the vaginas from both RhMs, many CD4⁺ T lymphocytes were found in the lamina propria and few T cells were found in the epidermis and dermis (Figure 8F). By immunomagnetic bead sorting and propidium iodide exclusion of dead cells, 90% LC-enriched fractions were obtained from epidermis and vaginal epithelium taken at sacrifice of the infected RhMs (Figure 8, G and H), completely devoid of CD3⁺ cells (data not shown). The LC fractions obtained

were used to determine the relative proportion of STR viruses in this cell compartment. STR-B predominated in LC fractions derived from skin and vagina of both animals (Table 1). To further characterize LC viral DNA, we sequenced the *env* V1-V2 regions in parallel with corresponding sequences from rPBMCs at days 21, 120, and 246 (Supplemental Figure 3). For monkey 98R0012, there were so few mutations that useful information could not be obtained (data not shown). However, phylogenetic analysis of sequences from monkey 97R0092 showed that the V1-V2 sequences from vaginal LCs clustered with those from rPBMCs of day 246, suggesting relatively recent infection of those epithelial LCs. We have previously demon-



strated that human epidermal LCs may be locally infected by underlying infected T cells while their precursors are colonizing the epidermis (32). The present data confirm the notion that LCs analyzed 8 months after infection may not have derived from CD34⁺ progenitors infected in bone marrow but may have derived from peripheral precursors that are infected while they colonize the epidermis.

Discussion

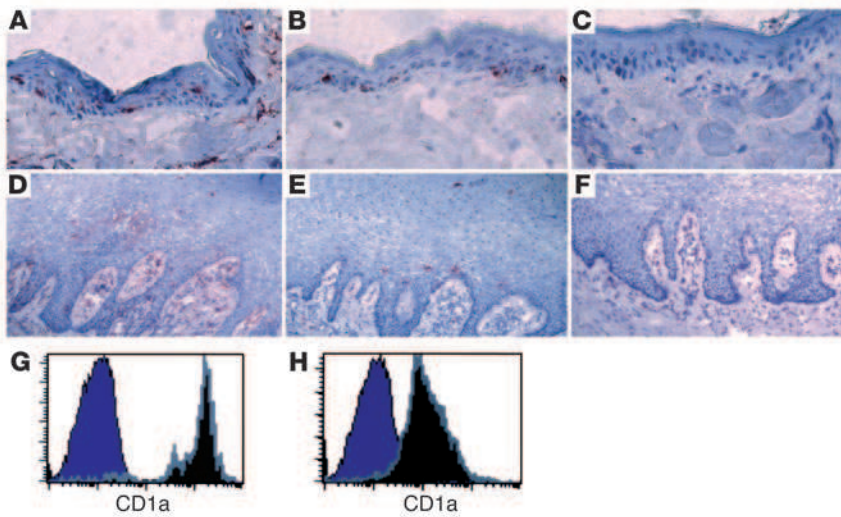
Our data here show that HIV-1 M clade-specific promoter polymorphisms translate into strikingly different phenotypes depending upon the environment of viral replication. As the chimeras used in our study are isogenic aside from the promoter, they share the same probability of entering a target cell. After provirus formation, promoter polymorphisms may result in differential replication depending on the cellular environment (6, 13). Our work here provides 3 such examples. First, when propagated individually on CEMx174 or rPBMCs, the chimeras proved to be indistinguishable (Figure 3), whereas when propagated together ex vivo using the same cellular substrates, the STR-B virus dominated, indicative of subtle fitness differences (Figure 4). Second, when growth competition was performed on human thymic histocultures, the STR-C virus dominated in the culture supernatant (Figure 5). Finally, when the competition was performed in vivo, striking temporal fluctuations were observed: STR-C virus dominated in primary infection in both animals and was supplanted by STR-B after seroconversion (Figure 7). Despite this, STR-C persisted and replicated throughout the 8 months of observation, as revealed by V1-V2 sequence analysis (Supplemental Figure 3). Notably, the mutation fixation rate of the V1-V2 *env* sequences recovered at sacrifice in 97R0092 rPBMCs varied between 1×10^{-2} and 1.8×10^{-2} substitutions/base/year. Based on estimations made for HIV-1 mean mutation rates in the range of 3.5×10^{-5} per base per cycle (33), it can be assumed that STR proviral genomes analyzed at day 246 resulted from 200–340 replication cycles. Hence, the viruses underwent 0.8–1.4 rounds of replication per day. These values correlate with those determined for kinetics of HIV/SIV replication (34). Wild-type V1-V2 *env* sequences were 40% at day 21 and 21% at week 18 and were absent at sacrifice. As at these time points STR-C massively predominates over STR-B and STR-E (Figure 7A); these data taken together seem to indicate that STR-C proviruses in rPBMCs are the integrated forms of viruses that have been constantly replicating and spreading in specific host niches.

The striking predominance of STR-C in serum, and to a lesser extent, STR-E, during primary infection and their eclipse after seroconversion merit explanation (Figure 7). It is more surprising in that the analysis of the cell-associated virus in rPBMCs and lymph node samples revealed a much higher proportion of STR-B. Sequencing of the 5' STR regions at weeks 10, 22, and 31 from lymph nodes, rPBMCs, and serum showed no significant modification in the promoter regions compared with input STR viruses, excluding the emergence of a recombinant with a replication advantage due to a reorganized promoter, as shown previously (35). This raises the question of where serum or plasma viremia is coming from in primary infection. The differential sensitivity of STR-C to IL-7 in the thymic histocultures (Figure 5) suggests that the polymorphism in the AP-1 and NF-κB binding sites may be involved (Figure 1). It has been shown that HIV-1 replication is regulated at the transcriptional level by NF-κB activity through the thymic microenvironment that provides TNF-α,

Table 1
Relative frequency of STR chimeras in various tissues at sacrifice

RtM	STR virus	Blood rPBMCs	Serum	Gut		Mesenteric LN		Thymus	Peripheral LN		Respiratory tract		Spleen	LCS	
				Duod	Ileum	Cecum	Colon		Cecum	Colon	Axillary	Inguinal		Lung	Tonsil
97R0092	B	20	100	95	100	92	100	96	96	100	95	100	97	97.5	100
	C	75	0	5	0	8	0	4	0	0	5	0	15	3	0
	E	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98R0012	B	71	ND	100	100	85	100	97.5	97.5	97.5	92.5	100	100	90	100
	C	29	ND	0	0	15	0	2.5	2.5	2.5	7.5	0	23	0	0
	E	0	ND	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

For each data point, the analysis was performed on 10⁷ cells. ND, not detectable; Duod, duodenum.

**Figure 8**

Immunohistochemical analysis of LCs in skin and vagina. Representative data from monkey 98R0012 are given. (A–F) HLA-DR expression in skin (A) and vagina (D); CD1a expression in skin (B) and vagina (E); and CD3 expression in skin (C) and vagina (F). Magnification, $\times 400$ (A–C) and $\times 200$ (D–F). (G and H) Representative histograms of CD1a⁺ cells (gray peaks) and CD1a⁻ cells (purple peaks) from LC-enriched fractions in skin (G) and vagina (H).

IL-1, and IL-7 (23, 24). Previous studies have also shown that the AP-1 and NF- κ B pathways are activated and that AP-1 binding is increased in T lymphocytes stimulated with IL-7 (25). Moreover, it has been shown that nuclear factor of activated T cells (NFAT), which binds to NF- κ B binding sites, acts synergistically with AP-1 if binding sites are juxtaposed (36). In an environment enriched in IL-7, this could be at the origin of the predominance of STR-C, which harbors a functional AP-1 binding site close to the NF- κ B elements. In contrast, the AP-1 binding site in the STR-E promoter is separated by a spacer of approximately 12 nt from the other enhancer elements, which are a GABP site and a single NF- κ B binding site targeted by Ets and NF- κ B/NFAT transcription factors, respectively (37) (Figure 1A). Finally, STR-B completely lacks an AP-1 binding site. Altogether it is tempting to speculate that, in addition to NF- κ B and NFAT, a third key transcription factor differentially targeted by T cell receptor signaling, namely AP-1, is also able to modulate HIV-1 transcription, with important implications for the spatial and temporal dynamics of viral replication in vivo. Given that the HIV life cycle is tightly linked to the T cell signaling machinery, this implies a means by which this retrovirus can exploit various cellular microenvironments and/or differentiation/activation states for its propagation and maintenance. Moreover, HIV-1 strains have been isolated that completely lack NF- κ B binding sites, and a SIVmac239 mutant containing deletions of all NF- κ B and Sp1 binding sites was shown to replicate with kinetics similar to those of the parental strain in lymphoid cells and caused AIDS in RhMs (38). Hence, the high degree of flexibility in responding to various cellular conditions correlates well with the longstanding notion that the HIV-1 LTR tolerates many mutations in important transcription factor binding sites and possesses high functional redundancy (39). In our study here, the variables were already reduced by genetic separation of the core promoter/enhancer from *nef*/U3 overlapping sequences. This eliminated about 80% of the wild-type U3 region containing recognition motifs for myriad DNA-binding factors. Despite this simplification of the promoter, competition experiments were absolutely required to reveal the subtle fitness advantages of a given promoter in a specific environment. Here, in vitro and in vivo data provide the first evidence to our knowledge that AP-1 binding sites present in the promoter can powerfully influence viral replication and fitness. Yet the possibility that the observed

growth differences are also influenced by altered cooperativity for NF- κ B and/or NFAT binding cannot be excluded. Similarly, it has been shown recently that the subtype E CATAAAA motif confers a slight disadvantage in competition experiments compared with the CATATAA motif present in all other subtypes (9). This might have accounted for the limited activity of the STR-E promoter. Thus, it will be important to further investigate the influence of the main transcription factor response elements in appropriate viral culture systems that allow separation of the pathways leading to activation of AP-1, NF- κ B, and NFAT, an experimentally challenging goal in light of the extensive cross-talk between these key players during T cell activation.

The transitory nature of STR-C and STR-E viremia suggests that a cellular subset is involved that is rapidly depleted, allowing outgrowth of a more adapted variant (STR-B) in an environment in which IL-7 plays a limited role. The dominance of STR-B thereafter suggests that the compartment that supported STR-C and STR-E growth was not able to reconstitute itself to any significant degree. Given that the extensive analysis of lymphoid tissues was performed at sacrifice, some 8 months after primary viremia, it is not surprising that the sites of extensive STR-C and STR-E replication were not identified. Elucidation of this issue will need analysis during the peak of primary viremia. Nevertheless, it has been shown that like IL-7 (25), IL-15 has the ability to induce AP-1 and NF- κ B activation in PBMCs (40). It has also been shown that IL-15, together with the other γ c-dependent cytokines, IL-2 and IL-7, regulates the development of T lymphocyte subsets in the gastrointestinal tract (41). Investigation of SIV infection of RhMs has demonstrated that high viral replication and severe CD4⁺ T lymphocyte depletion occur within the gut-associated lymphoid tissue (GALT). CD4⁺ T lymphocytes are almost entirely and irreversibly depleted within 3 weeks of infection. Indeed, depletion of GALT CD4⁺ T lymphocytes occurs sooner and is by far more extensive than what is seen in peripheral blood, lymph node, or spleen (27, 28). Given the results of our study here, as well as published data (25, 27, 28, 40, 41), it could well be that the GALT environment results in differential strain replication during primary infection.

Even though the explanation for the predominance of serum-borne STR-C in primary viremia is not readily forthcoming, the finding is challenging. Among the HIV-1 M clade viruses, clade C has spread rapidly from central Africa down to South Africa.



Furthermore, it is invading regions where other clades preexisted among high-risk populations (<http://www.unaids.org>). That the promoter of STR-C is apparently better adapted to primary infection could correlate with the global dynamics of clade C viruses if the pandemic were being driven mainly by individuals with primary infection with high viremia (42). Nevertheless, while our data clearly show that functional promoter differences can affect replication *in vivo*, they do not exclude the possibility that other viral elements coevolving within each clade may attenuate such differences, such that on average each clade is differently but optimally adapted. Yet it has been extensively demonstrated that the genetic profiles of elements playing a role in viral entry (22, 43) and transactivation (44) can differentially modulate the dynamics of the viral life cycle. A particular element, however, may dominate in a specific environment and/or during a particular step of the viral life cycle. Hence, it is possible that the promoter activity plays a major role in differential colonization of tissue compartments, notably in primary infection. Although our data suggest that functional promoter differences mapped *ex vivo* can affect replication *in vivo*, this does not *a priori* indicate that it is the sole determinant. In particular, a critical role for coreceptor usage in pathology has been reported in studies using simian HIVs bearing CCR5 (R5) or CXCR4 (X4) HIV-1 envelopes, which replicated with similar kinetics and at comparable levels as those in monkeys (45). It is noteworthy, however, that both *env* sequences used in this study (45) derived from clade B viruses. Importantly, in studies using simian HIVs bearing R5-tropic *env* genes from clade B and C viruses, it has been reported that R5-mediated lymphopenia in the gut CD4⁺ compartment was likely to be completely independent of HIV-1 entry and hence of *env* genotypes (46). Thus, even an element as fundamental to the viral life cycle as *env* can become secondary, leaving the primary role to another viral element affecting replication dynamics.

In our system, important spatial and temporal differences were clearly due to promoter polymorphisms, implying differential interactions among viral promoters and cellular transcription factors in a specific tissue environment *in vivo*. Viremia, a simple and widely used marker, may arise from viral cycling between different tissues and perhaps subtly different cell subsets, as well as reflecting bursts resulting from antigenic stimulation (47–49). Hence, in addition to entry and transactivation elements, LTR genetic polymorphisms can contribute substantially to the differential replication and dissemination of HIV/SIV *in vivo*. Studies are currently in progress to identify the source of STR-C virus production in primary infection and to better understand the subtle synergic effect of transcription factors on viral promoters and environments favoring selective rescue of specific viral strains.

Methods

Gel-shift and competition assays. TRE, B, C, and E dsDNA was obtained by hybridization of B-sense/B-antisense, C-sense/C-antisense, E-sense/E-antisense, and TRE-sense/TRE-antisense oligonucleotide pairs (for oligonucleotide sequences, see Supplemental Table 1) and was used as described previously (14, 15).

STR virus production. The 3' portion of the STR-WT genome (p3' STR-WT) was engineered from p239SpE3' (18) by 4 PCR steps using the following primer pairs: first, 293-3'-8998/293-9680-PPT; second, 239-935-XhoI/239-650-MluI; third, STR-MLU/NARSALECOSIV3', and fourth, 293-3'-8998/239-650-MluI. By subcloning steps, *PspAI* and *PstI* sites were introduced into p3' STR-WT using primers SPHSMASIV5/NARSALECOSIV3' and PSTSIV5/NARSALECOSIV3'. PCR with primers SMAHIV5/PSTHIV3,

PSPAIHIV5/PSTHIV3, and PSPAIHIV5/PSTHIVE3 on the respective pBlue3'LTR-luc (13) gave the HIV-1 B, C1, and E core promoter/enhancer fragments, which were cloned into p3' STR-WT via *PspAI* and *PstI*. Each of the p3' STR plasmids was digested with *SphI* and ligated to p239Sp5' (18). After transfection with the products of these ligations, STR viruses stocks were prepared on the CEMx174 cell line, derived from the fusion of a 174 human B cell line and the CEM human T cell line (19), and were treated with DNase I (100 U/ml; Amersham). Viral stocks were quantified for antigen p27 with the Coulter SIV Core Antigen Assay kit (Immunotech). TCID₅₀ values were determined as described previously (50).

***In vitro* and *ex vivo* replication kinetics and growth competition experiments.** Infections were performed in triplicate. CEMx174 (2×10^6) or rPBMCs (3×10^6) that had been pretreated for 2 days with phytohemagglutinin (2 μ g/ml; Sigma-Aldrich) and maintained with IL-2 (25 U/ml Gibco; Invitrogen Corp.) were incubated for 3 h at 37°C with 10 ng p27 of each STR virus. Cells were then extensively washed with PBS and were cultured at a density of 1×10^6 to 1.5×10^6 cells/ml in complete RPMI medium (19). In replication kinetics assays performed over 31 days, 0.5 ml of 2 ml of cell-free supernatants was collected and p27 content was quantified. In growth competition experiments, 80% of the supernatant was withdrawn and half of the cells were collected and resupplied with fresh medium and cells every 2–3 days over a follow-up of 39 days.

Growth competition experiment on thymic histocultures. Thymus was obtained from elective cardiac surgery on an HIV-1-seronegative human newborn. Nine thymus fragments per well were coinfecting with a total of 9,000 TCID₅₀/well (3,000 TCID₅₀ per STR virus) of the 3 STR chimeras for 5 hours at 37°C. Thymus fragments were then maintained as described previously (26). Every 2–3 days, cultures were resupplied with completely fresh medium. Collected supernatants were filtrated and thymus fragments were lysed before determination of the relative frequency of STR viruses.

Infection of RhMs. RhMs (*Macaca mulatta*) of Chinese origin were serologically negative for SIV, type D retrovirus, herpes B virus, and simian foamy virus. They were housed and cared for in accordance with European guidelines. Blood samples for estimation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes counts by flow cytometry analysis were treated as described previously (51) with antibodies against CD3, CD4, CD8, and CD20 (Supplemental Table 2). Viral RNA copies per ml were measured by real-time quantitative RT-PCR (52). SIV-specific antibody responses were determined as described previously (19).

Relative frequency of STR chimeras. CEMx174 and rPBMC samples from *in vitro* infections were washed in PBS before lysis as described previously (32). The rPBMCs from *in vivo* coinfection were purified from blood on a Ficoll gradient (Amersham). One-third of RNA extracted from 250 μ l of serum was reverse transcribed by avian myeloblastosis virus (AMV RT; Promega) using the primer R3OUT. Of 30 μ l of this reaction, 10 μ l was amplified with STRSMAP5/R3OUT for the first PCR round and BCE5ON/R3ON for the second. Organs were homogenized and resuspended in complete RPMI medium. To obtain TCEFs and MEFs, 3×10^6 cells/ml were layered on Petri dishes for 1 hour at 37°C in complete RPMI medium. Then the nonadherent cell fraction was collected (TCEFs), while MEFs were recovered by scraping of adherent cells (53). After flow cytometry analysis, MEFs showed enrichment in macrophages of at least 2 to 5 times that of TCEFs. Pulmonary and splenic homogenates before adhesion and rPBMCs were purified on a Ficoll gradient (Amersham). All these samples were then subjected to nested PCR spanning the HIV-1 promoter sequences coupled to screening by clade-specific radiolabeled probes. The 5' STR was then amplified with STRSMAP5/gag1201 for the first PCR round and BCE5ON/NARSIV3 for the second. PCR products were purified on gels, extracted with a Qiagen Extraction kit, and cloned using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen Corp.). An average of 40 white colonies were picked from 3 replica plates and were transferred



to nitrocellulose membrane filters (Schleicher & Schuell). Filters were selectively hybridized with γ -³²P-labeled clade-specific probes (COMPB, PSPAI-HIVC5, and ECOMP, for STR-B, STR-C, and STR-E, respectively), allowing relative percentage determination of clade-specific STR chimeras.

Sequencing analysis. STR promoter/enhancer regions were amplified by nested PCR with STRSMAP5/gag1201 for the first PCR round and BCE5ON/NARSIV3 for the second. V1-V2 sequences were obtained by amplification of SIV DNA using the primers SIVOUT5239/C3OUT3 for the first round of PCR and SIVIN5/C3IN3 for the second. Amplified products were purified on gels, extracted with a Qiagen Extraction kit, and cloned using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen Corp.). An average of 40 white colonies for the promoter/enhancer and 19–26 for the V1-V2 regions were sequenced and aligned by Clustalw1.83. Sequences of 600 bp spanning the V1-V2 regions were subjected to SplitsTree2.3.1 analysis as described previously (54).

Isolation of LCs. Skin slices from legs and arms were incubated overnight at 4°C in 0.1% trypsin (Sigma-Aldrich). Biopsies of vaginal mucosal tissues were incubated for 90 minutes at 37°C in 1 mg/ml collagenase IV S (Sigma-Aldrich) and then overnight at 4°C in trypsin-EDTA 1X (Invitrogen Corp.). Epidermis was then separated from dermis with fine forceps. Epidermal fragments were pooled in Hank's balanced salt solution (Invitrogen Corp.) supplemented with 10% fetal calf serum and were subjected to rounds of pipetting and filtration through sterile gauzes. LCs were enriched on a Ficoll gradient and then were positively purified by 2 rounds of immunomagnetic sorting: 30 minutes of incubation at 4°C with anti CD1a and 15 minutes of incubation with bead-conjugated anti-mouse immunoglobulin (MACS reagent kit; Miltenyi Biotec). For flow cytometry analyses, cells were incubated for 30 minutes at 4°C with a goat anti-mouse IgG. Indirect

immunohistochemistry staining was performed with monoclonal antibodies (Supplemental Table 2) and was visualized using a labeled streptavidin-biotin-peroxidase assay (LSAB2 Kit; Dako).

Acknowledgments

This paper is dedicated to the memory of Bruno Hurtrel. We would like to thank Susanna Celli, Rémi Cheyrier, Colette Dezutter-Dambuyant, Elisabetta Dondi, Nicole Israel, Nicolas Legrand, and Mike McCune for discussions, technical support, and comments on the manuscript. We would also like to thank the NIH for providing pBlue3'LTR-lucB, pBlue3'LTR-lucC, and pBlue3'LTR-lucE (13). This research was supported by the Institut Pasteur, Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS), and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). M. Centlivre and P. Sommer were recipients of ANRS fellowships, and N. Schmitt of a SIDACTION fellowship. M. Centlivre has developed this work in the context of her thesis at the University of Paris VI.

Received for publication July 30, 2004, and accepted in revised form December 12, 2004.

Address correspondence to: Monica Sala, Unité de Rétrovirologie Moléculaire, CNRS UFA1930, Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75015 Paris, France. Phone: 33-140-61-33-09; Fax: 33-145-68-88-74; E-mail: joo@pasteur.fr.

Bruno Hurtrel is deceased.

- McIlroy, D., et al. 1995. Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Virol.* **69**:4737–4745.
- Collman, R.G., Perno, C.F., Crowe, S.M., Stevenson, M., and Montaner, L.J. 2003. HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *J. Leukoc. Biol.* **74**:631–634.
- Pierson, T.C., and Doms, R.W. 2003. HIV-1 entry and its inhibition. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **281**:1–27.
- Fulcher, J.A., et al. 2004. Compartmentalization of human immunodeficiency virus type 1 between blood monocytes and CD4+ T cells during infection. *J. Virol.* **78**:7883–7893.
- Roof, P., et al. 2002. Differential regulation of HIV-1 clade-specific B, C, and E long terminal repeats by NF-kappaB and the Tat transactivator. *Virology.* **296**:77–83.
- Van Opijnen, T., et al. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes have a distinct Long Terminal Repeat that determines the replication rate in a host-cell-specific manner. *J. Virol.* **78**:3675–3683.
- Roebuck, K.A., and Saifuddin, M. 1999. Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Expr.* **8**:67–84.
- Lu, Y., et al. 1990. Identification of cis-acting repressive sequences within the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **64**:5226–5229.
- van Opijnen, T., Kamoschinski, J., Jeeninga, R.E., and Berkhout, B. 2004. The human immunodeficiency virus type 1 promoter contains a CATa box instead of a TATA box for optimal transcription and replication. *J. Virol.* **78**:6883–6890.
- Henderson, A.J., Zou, X., and Calame, K.L. 1995. C/EBP proteins activate transcription from the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in macrophages/monocytes. *J. Virol.* **69**:5337–5344.
- Verhoef, K., Sanders, R.W., Fontaine, V., Kitajima, S., and Berkhout, B. 1999. Evolution of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat promoter by conversion of an NF-kappaB enhancer element into a GABP binding site. *J. Virol.* **73**:1331–1340.
- Naghavi, M.H., Schwartz, S., Sonnerborg, A., and Vahlne, A. 1999. Long terminal repeat promoter/enhancer activity of different subtypes of HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **15**:1293–1303.
- Jeeninga, R.E., et al. 2000. Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J. Virol.* **74**:3740–3751.
- Bouallaga, I., Teissier, S., Yaniv, M., and Thierry, F. 2003. HMG-I(Y) and the CBP/p300 coactivator are essential for human papillomavirus type 18 enhanceosome transcriptional activity. *Mol. Cell. Biol.* **23**:2329–2340.
- Thierry, F., Spyrou, G., Yaniv, M., and Howley, P. 1992. Two API sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. *J. Virol.* **66**:3740–3748.
- Kestler III, H.W., et al. 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell.* **65**:651–662.
- Münch, J., et al. 2001. Simian immunodeficiency virus in which nef and U3 sequences do not overlap replicates efficiently in vitro and in vivo in Rhesus macaques. *J. Virol.* **75**:8137–8146.
- Kestler, H., et al. 1990. Induction of AIDS in Rhesus monkeys by molecularly cloned simian immunodeficiency virus. *Science.* **248**:1109–1112.
- Blancou, P., et al. 2004. Simian immunodeficiency virus promoter exchange results in a highly attenuated strain that protects against uncloned challenge virus. *J. Virol.* **78**:1080–1092.
- Quiñones-Mateu, M., and Arts, E.J. 2001. HIV-1 fitness: implications for drug resistance, disease progression, and global epidemic evolution. In *HIV sequence compendium*. C. Kuiken et al., editors. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory. Los Alamos, New Mexico, USA. 134–170.
- Painter, S.L., Biek, R., Holley, D.C., and Poss, M. 2003. Envelope variants from women recently infected with clade A human immunodeficiency virus type 1 confer distinct phenotypes that are discerned by competition and neutralization experiments. *J. Virol.* **77**:8448–8461.
- Ball, S.C., et al. 2003. Comparing the ex vivo fitness of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates of subtypes B and C. *J. Virol.* **77**:1021–1038.
- Chene, L., et al. 1999. Thymocyte-thymic epithelial cell interaction leads to high-level replication of human immunodeficiency virus exclusively in mature CD4(+) CD8(-) CD3(+) thymocytes: a critical role for tumor necrosis factor and interleukin-7. *J. Virol.* **73**:7533–7542.
- Chene, L., Nugeyre, M.T., Barre-Sinoussi, F., and Israel, N. 1999. High-level replication of human immunodeficiency virus in thymocytes requires NF-kappaB activation through interaction with thymic epithelial cells. *J. Virol.* **73**:2064–2073.
- Gringhuis, S.I., de Leij, L.F., Verschuren, E.W., Borger, P., and Vellenga, E. 1997. Interleukin-7 upregulates the interleukin-2-gene expression in activated human T lymphocytes at the transcriptional level by enhancing the DNA binding activities of both nuclear factor of activated T cells and activator protein-1. *Blood.* **90**:2690–2700.
- Glushakova, S., Baibakov, B., Margolis, L.B., and Zimmerberg, J. 1995. Infection of human tonsil histocultures: a model for HIV pathogenesis. *Nat. Med.* **1**:1320–1322.
- Ling, B., et al. 2002. SIV(mac) pathogenesis in rhesus macaques of Chinese and Indian origin compared with primary HIV infections in humans. *AIDS.* **16**:1489–1496.
- Veazey, R.S., et al. 1998. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science.* **280**:427–431.
- Miller, C.J., and Shattock, R.J. 2003. Target cells in vaginal HIV transmission. *Microbes Infect.* **5**:59–67.
- Zimmer, M.I., et al. 2002. Disrupted homeostasis

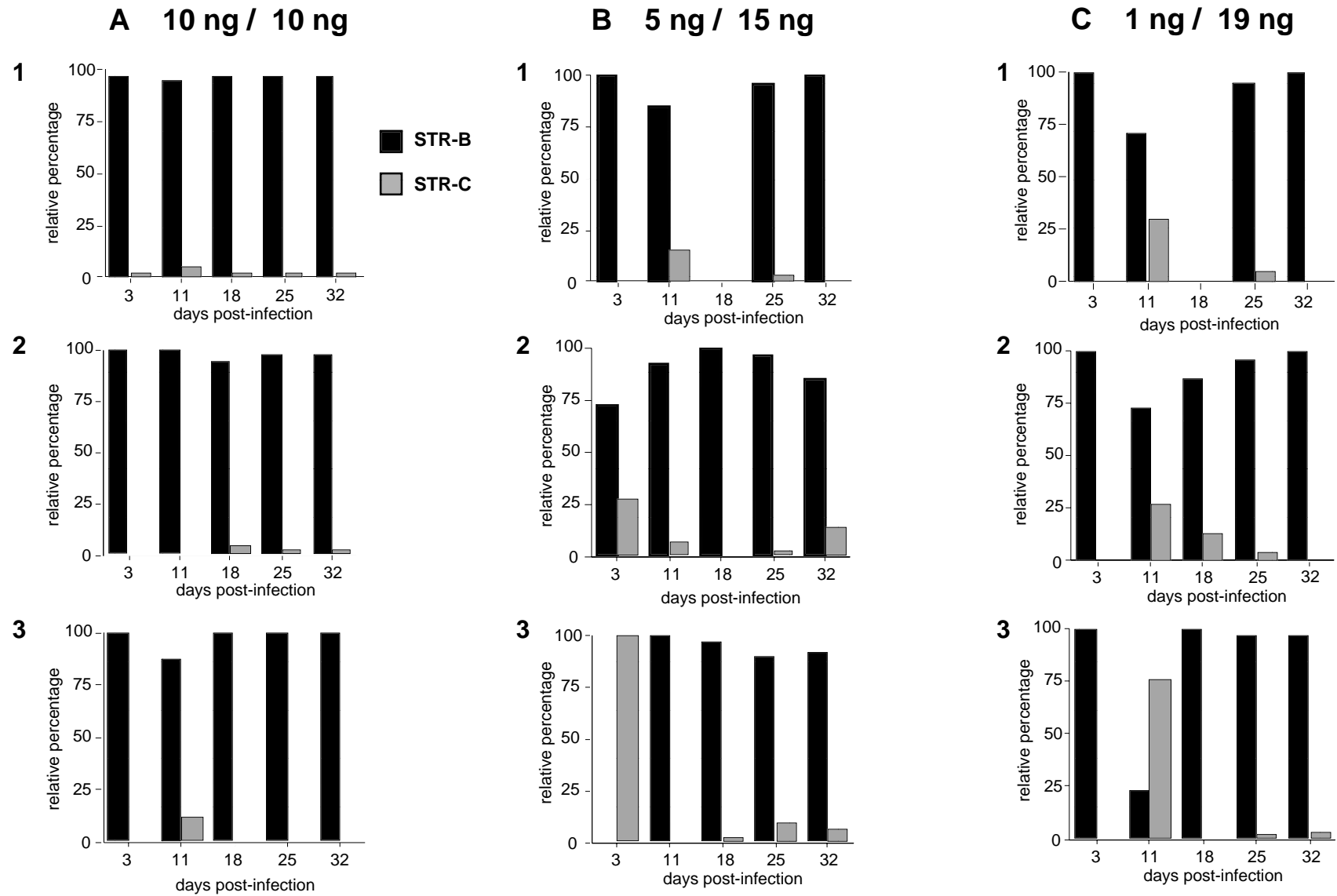


- of Langerhans cells and interdigitating dendritic cells in monkeys with AIDS. *Blood*. **99**:2859–2868.
31. Ma, Z., Lu, F.X., Torten, M., and Miller, C.J. 2001. The number and distribution of immune cells in the cervicovaginal mucosa remain constant throughout the menstrual cycle of rhesus macaques. *Clin. Immunol.* **100**:240–249.
32. Sala, M., et al. 1994. Spatial discontinuities in human immunodeficiency virus type 1 quasispecies derived from epidermal Langerhans cells of a patient with AIDS and evidence for double infection. *J. Virol.* **68**:5280–5283.
33. Mansky, L.M., and Temin, H.M. 1995. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.* **69**:5087–5094.
34. Pelletier, E., Saurin, W., Cheynier, R., Letvin, N.L., and Wain-Hobson, S. 1995. The tempo and mode of SIV quasispecies development in vivo calls for massive viral replication and clearance. *Virology*. **208**:644–652.
35. Blackard, J.T., et al. 1999. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 viruses with intersubtype recombinant long terminal repeat sequences. *Virology*. **254**:220–225.
36. Macian, F., Lopez-Rodriguez, C., and Rao, A. 2001. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene*. **20**:2476–2489.
37. Bassuk, A.G., Anandappa, R.T., and Leiden, J.M. 1997. Physical interactions between Ets and NF-kappaB/NFAT proteins play an important role in their cooperative activation of the human immunodeficiency virus enhancer in T cells. *J. Virol.* **71**:3563–3573.
38. Ilyinskii, P.O., Simon, M.A., Czajak, S.C., Lackner, A.A., and Desrosiers, R.C. 1997. Induction of AIDS by Simian Immunodeficiency Virus lacking NF- κ B and Sp1 binding elements. *J. Virol.* **71**:1880–1887.
39. Sommer, P., et al. 2004. Anti-termination by SIV Tat requires flexibility of the nascent TAR structure. *J. Mol. Biol.* **344**:11–28.
40. McDonald, P.P., Russo, M.P., Ferrini, S., and Casatella, M.A. 1998. Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils. *Blood*. **92**:4828–4835.
41. Porter, B.O., and Malek, T.R. 2000. Thymic and intestinal intraepithelial T lymphocyte development are each regulated by the gamma-c dependent cytokines IL-2, IL-7, and IL-15. *Semin. Immunol.* **12**:465–474.
42. Pilcher, C.D., et al. 2004. Frequent detection of acute primary HIV infection in men in Malawi. *AIDS*. **18**:517–524.
43. Rangel, H.R., et al. 2003. Role of the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene in viral fitness. *J. Virol.* **77**:9069–9073.
44. Reza, S.M., et al. 2003. A naturally occurring substitution in human immunodeficiency virus Tat increases expression of the viral genome. *J. Virol.* **77**:8602–8606.
45. Harouse, J.M., Gettie, A., Tan, R.C., Blanchard, J., and Cheng-Mayer, C. 1999. Distinct pathogenic sequela in rhesus macaques infected with CCR5 or CXCR4 utilizing SHIVs. *Science*. **284**:816–819.
46. Chen, Z., et al. 2002. CD4+ lymphocytopenia in acute infection of Asian macaques by a vaginally transmissible subtype-C, CCR5-tropic simian/human immunodeficiency virus (SHIV). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **30**:133–145.
47. Ho, D.D. 1992. HIV-1 viraemia and influenza. *Lancet*. **339**:1549.
48. Staprans, S.I., et al. 1995. Activation of virus replication after vaccination of HIV-1-infected individuals. *J. Exp. Med.* **182**:1727–1737.
49. Cheynier, R., et al. 1998. Antigenic stimulation by BCG vaccine as an in vivo driving force for SIV replication and dissemination. *Nat. Med.* **4**:421–427.
50. Johnson, V.A., and Byington, R.E. 1990. Quantitative assays for virus infectivity. In *Techniques in HIV research*. A. Aldovini, and B.D. Walker, editors. Stockton Press. New York, New York, USA. 71–76.
51. Monceaux, V., Ho Tsong Fang, R., Cumont, M.C., Hurtrel, B., and Estaquier, J. 2003. Distinct cycling CD4(+) and CD8(+) T-cell profiles during the asymptomatic phase of simian immunodeficiency virus SIVmac251 infection in rhesus macaques. *J. Virol.* **77**:10047–10059.
52. Hofmann-Lehmann, R., et al. 2000. Sensitive and robust one-tube real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to quantify SIV RNA load: comparison of one- versus two-enzyme systems. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. **16**:1247–1257.
53. Kuwana, M., et al. 2003. Human circulating CD14+ monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation. *J. Leukoc. Biol.* **74**:833–845.
54. Cheynier, R., Kils-Hutten, L., Meyerhans, A., and Wain-Hobson, S. 2001. Insertion/deletion frequencies match those of point mutations in the hypervariable regions of the simian immunodeficiency virus surface envelope gene. *J. Gen. Virol.* **82**:1613–1619.

Supplementary Figure 1

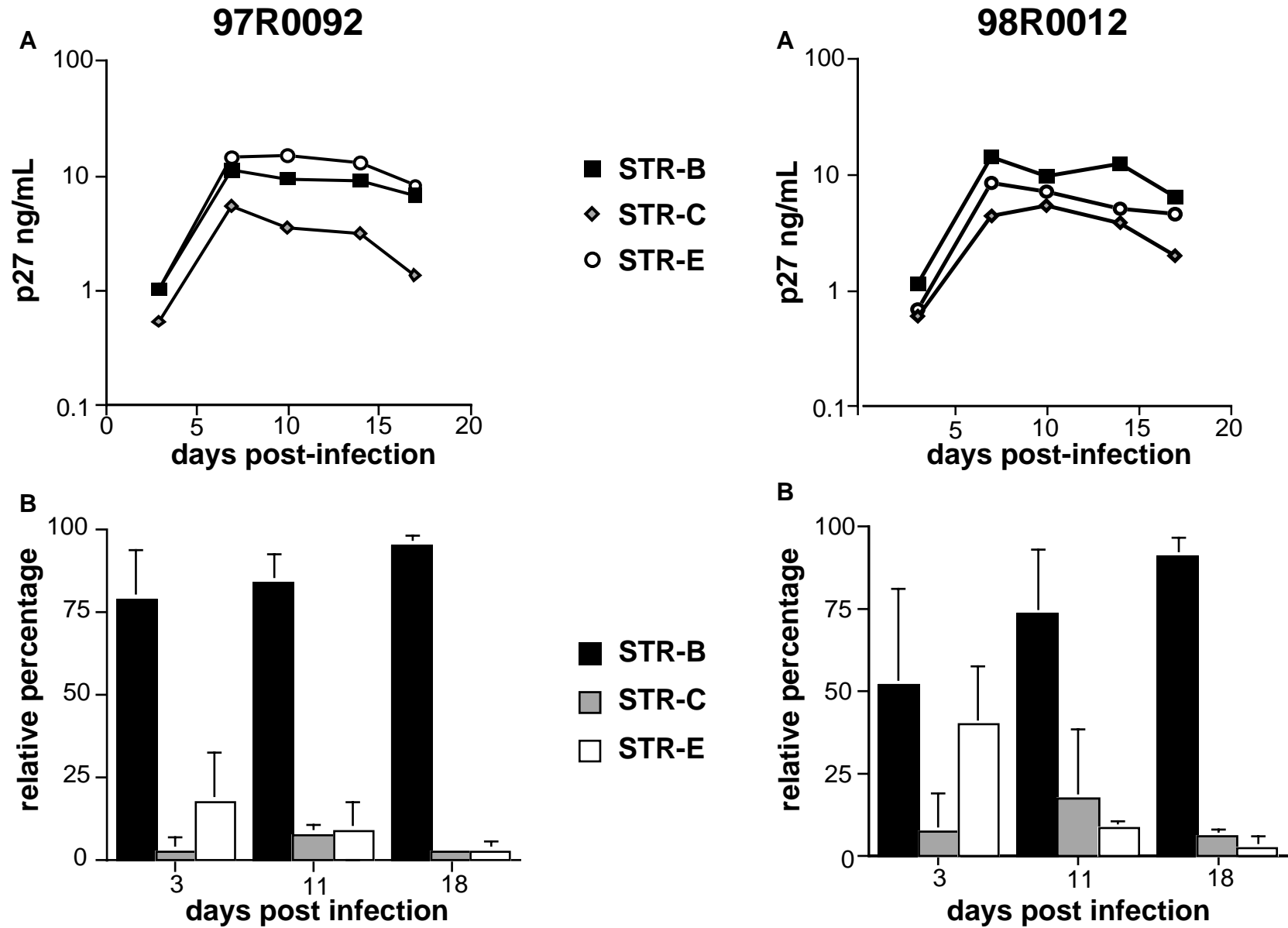
Growth competition experiments on pooled rPBMC. (A, B and C) Co-infections with different amount in ng of STR-B and STR-C chimeras. Experiment were performed in triplicate (1, 2 and 3)

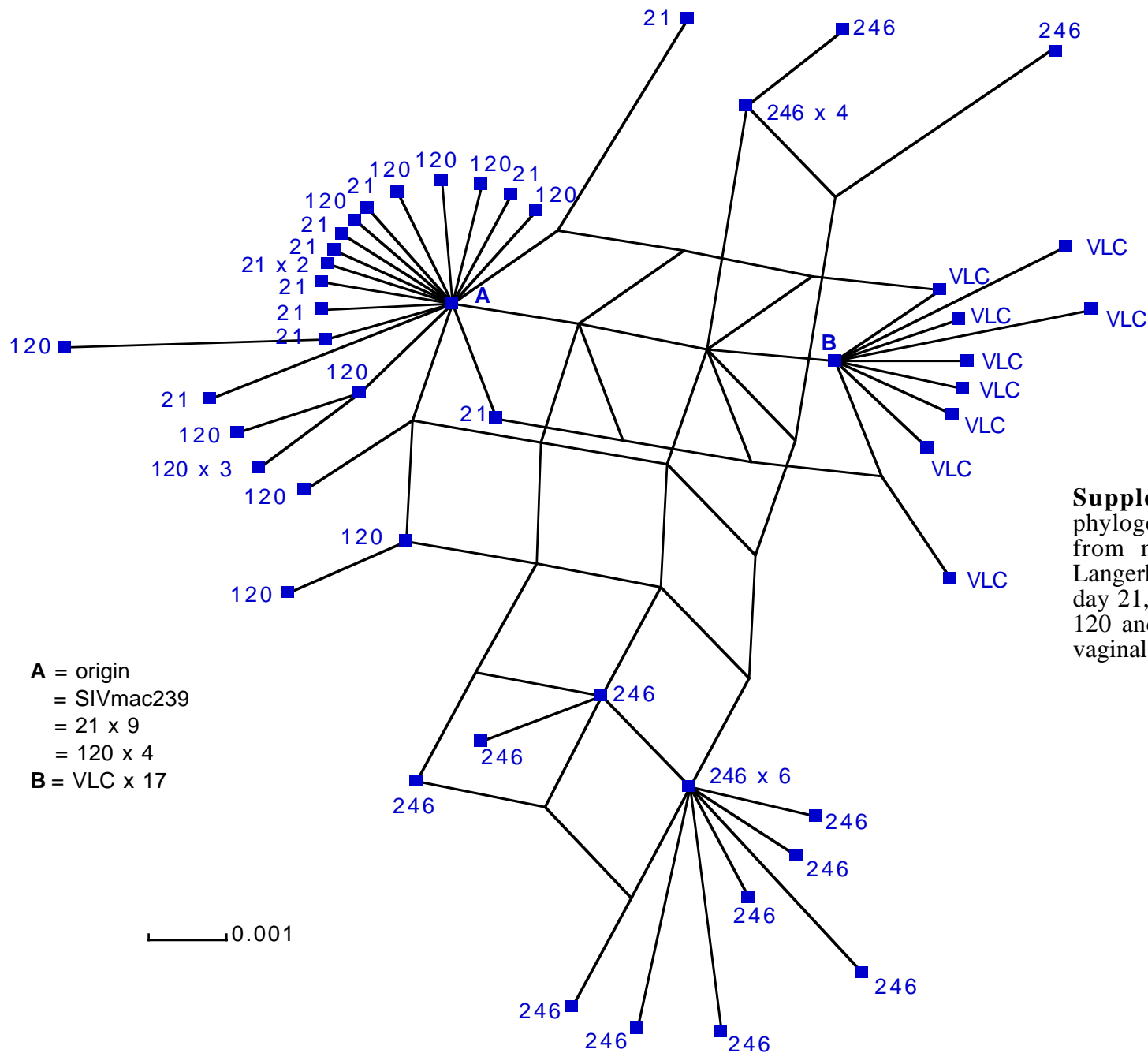
B / C (ng p27)



Supplementary Figure 2

(A) Replication kinetics and (B) growth competition experiment on rPBMc of macaques 97R0092 and 98R0012





Supplementary Figure 3 SplitsTree2.3.1 phylogenetic analysis of V1-V2 *env* sequences from monkey 97R0092 rPBMC and vaginal Langerhans cells. Each sequence from rPBMC of day 21, week 18 and week 36 is indicated by 21, 120 and 246, respectively. Each sequence from vaginal Langerhans cells is named VLC.

Supplementary Table 1 Oligonucleotides used for gel shift and competition assays, PCR, RT-PCR, screening of clade specific clones

Oligonucleotide	Sequence
B-sens	5' -CTAGATGCTGACATCGAGCT-3'
B-antisens	5' -CTAGAGCTCGATGTCAGCAT-3'
C-sens	5' -CTAGATGCTGACACAGAAGT-3'
C-antisens	5' -CTAGACTTCTGTGTCAGCAT-3'
E-sens	5' -CTAGATGCTGACAAAAGAAGT-3'
E-antisens	5' -CTAGACTTCTTTGTCAGCAT-3'
TRE-sens	5' -AGCTAGCTGACTCAGATGTCCT-3'
TRE-antisens	5' -AGCTAGGACATCTGAGTCAGCT-3'
293-3'-8998	5' -GGACGGAATTCAATGCTAGCTAAGTTAAGG-3'
293-9680-PPT	5' -ATACCCTCGAGACCACCTTTCCTTAATGAAGTGAGACATGTCTATTG-3'
239-935-XhoI	5' -GGTGGTCTCGAGGGTATATACTATAGTGCAAGAAGACATAG-3'
239-650-MluI	5' -ATAAAATACGCGTTATTAGCGAGTTTCCTTCTTGTCAG-3'
STR-MLU	5' -GCTAATAACGCGTATTTTATAAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGATTTAAACAGCAGGGACTTTCACAAG-3'
NARSALECOSIV3'	5' -ACTCGGAATTCGTCGACGGCGCAATCTGCTAGGGATTTTCCTGCTTCGG-3'
SPHSMASIV5	5' -ATATAGCATGCACGCGTATTTTATAAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGATTTAAACCCGGGCAGCAGGGACTTTCACAA-3'
PSTSIV5	5' -ACTCGCTGCAGTCGCTCTGCGGAGAGGCTGG-3'
SMAHIV5	5' -ACTCGCCCCGGTCCGGCGTACTTCAAGAACTGCT-3'
PSTHIV3	5' -ACTCGCTGCAGTACAGGCAAAAAGCAGCTGCT-3'
PSPAIIHVC5	5' -TCTCGCCCCGGTCCGGACTTTTACAAAAGACTGCT-3'
PSTHIVC3	5' -TCTCGCTGCAGTACAAGCGAAAAGCAGCTGCT-3'
PSPAIIHIVE5	5' -TCTCGCCCCGGTCCGGAGTACTATAAAAAGACTGCT-3'
PSTHIVE3	5' -TCTCGCTGCAGTACAAGCGAAAAGCGGCTGCT-3'
STRSMAP5	5' -TGGAAGGGATTTAAACCCGGG-3'
gag1201	5' -TCTTCCTCTCCCGCTCCTCACGCCGT-3'
BCE5ON	5' -GGATTTAAACCCGGGTCCGGA-3'
NARSIV3	5' -ACTCGGGCGCCAATCTGCTAGGGATTTTCCTGCTTCGG-3'
COMPB	5' -GCTGACATCGAGCTTGCTACAA-3'
ECOMP	5' -ATAAAGACTGCTGACAAAGAAGTTTCTAACTAGG-3'
R3OUT	5' -ACCTGCTAGTGCTGGAGAGA-3'
R3ON	5' -AATCTGCCAGCCTCTCCGCAGAG-3'
SIVOUT5239	5' -GAGGATGTATGGCAACTCTTTGAG-3'
C3OUT3	5' -CCTGGGATGTTTGACAAATGGTCTG-3'
SIVIN5	5' -TTGAGACCTCAATAAAGCCTTGTTG-3'
C3IN3	5' -GGTCTGCTTACCTCTTTTATTG-3'

Supplementary Table 2

Antibodies used for flow cytometric analysis and indirect immunohistochemistry staining

Antibody	clone	dilution	Source
anti-human CD4-PE	M-T477	-	BD Biosciences
anti-human CD8-PerCP	SK1	1/100	BD Biosciences
anti-rhesus monkey CD3-FITC	FN18	1/100	Biosource
anti-human CD20-APC	2H7	-	BD Biosciences
anti-human CD1a	SK9	1/200	BD Biosciences
anti-human HLA DR	L243	1/300	BD Biosciences
anti-human CD68	EBM11	1/400	Dako
F(ab') ₂ goat anti-mouse IgG (H+L)-FITC	62-6311	1/50	Zymed

ARTICLE 2

“ The HIV-1 clade C promoter is particularly well adapted to replication in the gut in primary infection ”

**Mireille Centlivre, Peter Sommer, Marie Michel, Raphaël Ho Tsong Fang,
Sandrine Gofflo, Jenny Valladeau, Nathalie Schmitt,
Simon Wain-Hobson, and Monica Sala**

(Soumis, 2005)

Dans l'article précédent (**article 1**), nous avons mis en évidence qu'il existe une discordance entre le virus produit lors de la primo-infection (STR-C et -E) et celui produit lors de la phase asymptomatique (STR-B). De plus, une discordance entre le virus associé aux rPBMCs et le virus libre dans le sérum peut également être observée en primo-infection. Ces données nous ont conduits à nous poser la question de la source principale de production de la virémie, lors de la primo-infection. Les données *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, obtenues précédemment (**article 1**), supportent l'hypothèse selon laquelle le compartiment soutenant la production en primo-infection du STR- C, et dans une moindre mesure du STR-E, n'a pas été capable de se reconstituer à un niveau significatif après l'infection et la réplication virale massive. Le tissu lymphoïde associé à l'intestin est proposé comme candidat.

Pour déterminer la source de production de la virémie, nous avons co-infecté deux nouveaux macaques rhésus avec les trois virus chimères STR et nous avons sacrifié ces animaux en primo-infection, près du pic de virémie. En utilisant le polymorphisme des promoteurs des chimères STR comme marqueur moléculaire, il a été possible de suivre la réplication et la dissémination virale dans les compartiments du corps.

Sur les 18 jours de suivi de l'infection, nous avons observé une discordance entre les virus associés aux rPBMCs (STR-B) et les virus libres dans le sérum (STR-C et -E), en accord avec les résultats obtenus précédemment (**article 1**). Le sacrifice des singes au jour 18 nous a permis d'avoir accès à différents compartiments tissulaires et nous avons alors déterminé la répartition des virus STR dans ces compartiments. Nous avons ainsi mis en évidence que le STR-C est présent de façon prédominante dans les organes lymphoïdes secondaires (les ganglions lymphatiques périphériques et mésentériques, et la rate) et dans certaines fractions lymphocytaires de l'intestin.

Durant les 18 jours d'infection, nous avons également collecté le matériel fécal des singes. Il a alors été possible d'extraire l'ARN viral de ces selles afin de déterminer la répartition des virus STR. Le virus retrouvé dans les selles est globalement le reflet de la production virale intestinale. Nous avons ainsi mis en évidence que les virus majoritairement produits par l'intestin, lors de la primo-infection, sont le STR-C et le STR-E.

Nos résultats montrent que la virémie en primo-infection est majoritairement le produit d'une intense réplication virale intestinale. Ces données sont en accord avec des études déjà publiées sur la forte déplétion des lymphocytes T CD4⁺ mémoires/activés intestinaux dans les premières semaines suivant l'infection et sur l'absence de restauration de

ce compartiment lors de la phase asymptomatique. Ces résultats confirment ainsi que le suivi de l'infection du VIH-1 à travers le sang n'est sûrement pas représentatif de ce qui se passe dans les différents compartiments du corps. De plus, des expériences de compétition virale sur des histocultures thymiques montrent que l'IL-7 influence directement la réplication des différentes chimères STR. Ces données suggèrent que cette cytokine, également présente en concentration élevée dans l'intestin, pourrait sélectivement activer la réplication de souches virales spécifiques sur la base du polymorphisme associé au promoteur sous-type-spécifique du VIH-1, et notamment celle du VIH-1 C.

**The HIV-1 CLADE C PROMOTER IS PARTICULARLY WELL ADAPTED
to REPLICATION in the GUT in PRIMARY INFECTION**

Mireille Centlivre¹, Peter Sommer^{1,2}, Marie Michel¹, Raphaël Ho Tsong Fang³,

Sandrine Gofflo⁴, Jenny Valladeau⁴, Nathalie Schmitt⁵,

Simon Wain-Hobson¹ and Monica Sala¹

¹Unité de Rétrovirologie Moléculaire, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

²Unité de Biologie Cellulaire du Noyau, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

³Unité de Recherche et d'Expertise Physiopathologie des Infections Lentivirales, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

⁴Université Claude Bernard, Lyon 1EA 3732, Hôpital Edouard Herriot, 69437 Lyon, France

⁵Unité de Biologie des Retrovirus, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

Address correspondence to: Dr Monica Sala, Unité de Rétrovirologie Moléculaire, CNRS URA 1930, Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75015 Paris, France. Tel: +33 1 40 61 33 09; Fax: +33 1 45 68 88 74; e-mail: joo@pasteur.fr

Abbreviations: GALT, gut-associated lymphoid tissue; HIV-1, human immunodeficiency virus type 1; IEL, intestinal epithelial lymphocyte; LC, Langerhans cell; LPL, lamina propria lymphocyte; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; RhM, rhesus macaque; rPBMC, RhM PBMC; SIV, simian immunodeficiency virus; STR, short terminal repeat; TCID₅₀, 50% tissue culture infectious dose.

Running head: CLADE C PROMOTER and HIV-1 REPLICATION in the GUT

Abstract

BACKGROUND: Co-infection of rhesus macaques with human/simian immunodeficiency virus chimeras harboring the minimal core-promoter/enhancer elements from HIV-1 clade B, C and E viral prototypes (STR-B, STR-C and STR-E) revealed a remarkable dichotomy in terms of spatio-temporal viral replication. The clade C chimera (STR-C) predominated in primary infection only to be eclipsed by the clade B chimera (STR-B) in the asymptomatic phase.

METHODOLOGY/PRINCIPAL FINDINGS: The present study was aimed at identifying the origin of STR-C plasma viremia in primary infection. By co-infecting rhesus macaques with the three chimeras and using the promoter polymorphisms as genetic marker, it was possible to follow viral dissemination *in vivo*. It is demonstrated here that at the peak of primary infection preferential replication of STR-C was supported by the gut-associated lymphoid tissue (GALT), an IL-7 rich microenvironment. This was shown by the correlation of the RNA viral genotype in blood and stools, compartments directly draining virions from the GALT. Moreover, growth competition experiments in thymic histocultures enriched in IL-7 revealed that replication of STR-C is particularly susceptible to this cytokine, compared to its STR-B and STR-E counterparts.

CONCLUSIONS/SIGNIFICANCE: Peak viremia of STR-C was supported by the GALT, an IL-7 rich microenvironment. This suggests that IL-7 immunotherapy may be detrimental to patients infected by HIV-1 clade C viruses.

Introduction

The gut-associated lymphoid tissue (GALT) constitutes the largest pool of lymphoid cells in the body, accounting for 50 to 60% of the total [1-3]. By 1 week post-infection SIV-infected macrophages and T lymphocytes can be detected in the GALT [4-6]. By 2-3 weeks following HIV-1/SIV infection, the intestinal CD4⁺ T lymphocytes are extensively depleted, before any reduction in the CD4⁺ T cells count can be detected in the blood or lymphoid organs [2,3,7-10]. The profound depletion of the GALT could be explained by the peculiar phenotype of the intestinal CD4⁺ T lymphocytes. Indeed, the main cellular target for HIV-1/SIV replication is represented by activated memory CD4⁺ T lymphocytes expressing CCR5 (R5). This sub-population is found in higher proportion in the GALT than in peripheral blood, spleen or lymph nodes [2,11].

The mucosal immune system of the gut is organized into several interconnecting compartments representing either inductive (Peyer's patches) or effector sites [12,13]. Effector sites consist of the lamina propria lymphocytes (LPLs) and the intra-epithelial lymphocytes (IELs). Two-thirds of the T lymphocytes isolated from human LPLs are CD4⁺ T lymphocytes and one-third CD8⁺ T lymphocytes. This ratio is similar to that estimated for T lymphocytes from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). However, LPLs are substantially different from peripheral blood T cells in that most present the CD45RO⁺CD45RA⁻ phenotype characteristic of memory cells, whereas the converse is true for peripheral blood T cells. LPLs are in a permanent high state of activation, which leads to production of cytokines (IL-2, IL-4, IL-5 and interferon- γ). IELs are located within the epithelial layer of the intestinal mucosa [14]. The predominant cell type among human intestinal IELs is represented by CD8⁺ T lymphocytes [12]. The mesenteric lymph nodes draining the bowel lymph, although outside the intestine proper, are considered as a compartment directly interconnected to the intestinal immune system [13]. The intestinal mucosa presents a complex cytokine network mainly

generated by the epithelial cells of the gut mucosa and the microvascular endothelium [15]. Among these cytokines, IL-7 is permanently released by the intestinal epithelial cells and exhibits modulatory effects on mucosal T cells [16,17].

We have previously shown that HIV-1 clade promoters strongly influence spatial and temporal dynamics of viral replication *in vivo* [18]. The SIVmac239 clone was engineered in which it was possible to freely exchange the viral promoter without altering *nef* (clone named STR for short terminal repeat). Based on this STR clone, isogenic chimeras were generated differing only in their minimal promoter sequences derived from HIV-1 clade B, C and E prototypes (STR-B, STR-C and STR-E). In two rhesus macaques (RhMs) co-infected by the three STR chimeras, it was possible to demonstrate a discrepancy between the genotypes of the cell-associated viruses and the free viruses in the serum in primary viremia. A shift in viral genotype was also highlighted between primary viremia and the asymptomatic phase of the infection.

The aim of the present study was to determine the origin of STR-C plasma viremia in primary infection. Following co-infection of two RhMs with the three STR chimeras, STR relative frequencies were determined in serum, fecal specimens, tissues and different cell populations that are targets for infection. *In vivo* data obtained illustrate that in primary infection the main source of STR-C virion production is the GALT. To understand the role played by IL-7 on viral replication in the GALT, growth competitions were performed in thymic histocultures, an experimental *ex vivo* system where viral replication is strictly dependent on the presence of this cytokine. Results revealed that IL-7 selectively enhances the STR-C chimera replication versus its STR-B and STR-E counterparts. These findings suggest that immunotherapy based on IL-7 may boost clade C HIV-1 replication by a selective activation of its promoter in the GALT, particularly in primary infection.

Results

Discrepancy between cell-associated viral DNA and plasma viremia in primary infection

In a previous study [18], two RhMs had been co-infected with three isogenic STR chimeras (STR-B, STR-C, and STR-E) differing only in their promoter sequences which were derived from the HIV-1 clade B, C and E core promoters/ enhancers of the respective viral prototypes (Figure 1), [19]. In order to identify the main source of viral production at primary infection and to describe the dynamics of early viral dissemination in the body, two RhMs were intravenously co-infected with 100 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose) of each of the three STR viruses and were sacrificed 18 days post-infection around peak viremia. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte counts (Figure 2A) and plasma RNA viral loads (Figure 2B) were typical for SIVmac239-infected Chinese RhMs [20]. The two RhMs were efficiently infected by the STR chimeras having their peak viremia between days 14 and 18 (Figure 2B), consistent with previous observations [18]. Over 18 days after infection plasma IL-7 levels were determined in both animals at regular intervals (Figure 2C). Plasma IL-7 concentrations before and after infection were comparable to those described for uninfected and SIVmac239-infected RhMs [21].

Polymorphisms in the enhancer region of the isogenic STR chimeras (Figure 1) provided a genetic marker for the identification of STR genotypes at early infection events and viral dissemination in target tissues. As described, the relative frequency of STR chimeras in rPBMCs and serum was determined by nested PCR spanning the HIV-1 promoter sequences coupled to screening by clade-specific radiolabeled probes [18]. In both animals, STR-B predominated in rPBMCs since the first days of infection until sacrifice. The only exception was at the peak viremia (day 14) of monkey 98R0026, where there was a transient rebound of STR-C over STR-B (Figure 3A and 3B). At the same time points, the analysis of the relative frequencies of chimera RNA in the serum yielded the converse. STR-C and STR-

E were predominant in the serum over STR-B, STR-C dominating STR-E at most data points (Figure 3C and 3D). These results correlated perfectly with previous data obtained from two RhMs co-infected with the same three STR chimeras [18]. Taken together these data showed that at primary infection, the actively replicating viral form present in the serum (Figure 3C and 3D) did not correspond to the cell-associated viral genotype present in the circulating rPBMCs (Figure 3A and 3B).

Predominance of STR-C in different compartments at primary infection

The discrepancy between serum- and cell-associated viral genotypes in the blood at primary infection led to the question as to where primary viremia comes from. To determine this, the RhMs were sacrificed at day 18, around peak viremia, where in the GALT CD4⁺ T lymphocyte depletion has been documented to be strong but still incomplete [10]. At sacrifice a large number of tissues was analyzed. As far as the gastrointestinal tract was concerned, IELs and LPLs were extracted and purified from different intestinal portions. Then, the relative percentage of STR DNA associated to IELs and LPLs cellular fractions was determined (Figure 4A and 4B). The analysis of the relative STR chimera frequencies as a function of gut sections and/or IELs or LPLs cellular fractions in both monkeys did not reveal any significant differences. Nevertheless, STR-C was clearly the predominant viral form in many of the analyzed samples.

Analysis of secondary lymphoid centers showed a predominance of STR-C in mesenteric and peripheral lymph nodes (Figure 4C and 4D) and spleen (Figure 4E and 4F). The distribution observed at day 18 after infection differed significantly from that reported earlier for the asymptomatic phase of the infection [18], where STR-B appeared as the predominant virus in secondary lymphoid centers. By contrast, at primary infection, (Figure 4E and 4F) as well as in the asymptomatic phase [18], STR-B predominated in the lungs,

tonsils, thymus, skin and vagina Langerhans cells (LCs). Data obtained here at primary infection and those corresponding to the asymptomatic phase [18] were obtained following the same experimental protocols. As a consequence, they supplied two snapshots of infection over time. This showed that between the acute and asymptomatic phases a switch in the STR chimera distribution occurred in the GALT and the secondary lymphoid centers. Elsewhere, STR-B persisted as the predominant viral form since the infection set up.

STR-C predominated in the fecal specimens at peak viremia

Previous studies had shown that feces from HIV-1-infected patients or SIV-infected monkeys were suitable specimens from which viral nucleic acids originated from the gastrointestinal tract could be isolated [22,23]. Moreover, for HIV-1 infection, it had been demonstrated that fecal specimens contained viral RNA molecules representative of local HIV-1 replication in the intestinal tissue [23]. Therefore, longitudinal collection of fecal specimens of the two monkeys was performed to evaluate the global kinetics of the STR chimeras production by the GALT at primary infection, without having to perform invasive intestinal biopsies.

Only samples from day 12 to sacrifice contained RNA levels over the limit of detection (60 copies/gram). In these fecal samples taken in duplicate, RT-PCR coupled to nested PCR was performed to selectively amplify the viral 5' STR promoter sequence. The relative frequency of the STR chimeras was then determined (Figure 5A and 5B). Results showed that STR-C was clearly the predominant viral form present in the fecal specimens at time points corresponding to both monkeys serum peak viremia (Figure 2B). Therefore, around peak viremia the gut on the whole mainly released in the feces STR-C chimera, which was also the predominant viral form found in the serum over the same time period (Figure 3C and 3D).

Langerhans cells at primary infection

Langerhans cells (LCs) are myeloid cells derived from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells which have a sentinel role in detecting pathogenic invasion and/or damage of epithelial surfaces of skin and mucosa. LCs are of major interest as they can be infected by HIV-1 and SIV and may play a primary role in sexual transmission of infection [24-26]. At sacrifice, skin patches from the two monkeys were recovered and stained for the HLA-DR marker. In agreement with previous observations [27], data showed that homeostasis of cutaneous dendritic cells populations (LCs and dermal DCs) was not altered at primary infection (Figure 6A and 6D). A normal distribution of LCs in skin epidermis and vaginal epithelium in both infected animals was highlighted using CD1a as a specific marker for LCs (Figure 6B and 6E). The skin epidermis and vagina epithelium were completely devoid of T cells (Figure 6C and 6F).

In parallel to immunohistochemical analyses, LCs were separated from epidermis and vaginal epithelium sheets (Figure 6G and 6H) by immunomagnetic bead sorting and propidium iodide exclusion of dead cells. The 90% LCs-enriched fractions, completely devoid of CD3⁺ cells (data not shown), were then used to determine the relative proportion of STR viruses in LCs compartment. STR-B predominated in all samples (Figure 4E and 4F).

The LCs are more likely to be infected as CD34⁺ progenitors trafficking from the blood through the dermis to the epidermis or the epithelium [28]. In intact dermis, T lymphocytes are rare or absent while macrophages are highly represented. Notably, the STR-B chimera is the only STR variant bearing the C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) transcription factor binding site in the promoter enhancer (Figure 1). The C/EBP family proteins are induced during monocyte/macrophage differentiation and are important activators of HIV-1 transcription in macrophages [29-32]. Taken together, these data supported the

hypothesis that from the onset of infection, mainly macrophage-associated STR-B chimera colonized dermis. Previous observations on LCs populations from the same tissues would suggest that this picture lasted over the asymptomatic phase of the infection [18].

IL-7-dependent differential replication of STR chimeras.

IL-7 plays a key role in the GALT as well as in the thymus: it is locally released by stromal epithelial cells and exhibits different modulatory effects on T cells [16,17]. In *ex vivo* thymic histocultures, IL-7 is essential to sustain HIV/SIV replication in thymocytes [18,33]. Growth competition experiments were performed in human thymic histocultures in the presence of IL-7 to reveal the influence of this cytokine on differential replication of STR chimera in the GALT (Figure 7). As expected IL-7 enrichment sustained viral replication in thymocytes, as increased p27 levels were detectable out to 20 days of culture followed by tissue necrosis (Figure 7A). The analysis of the relative frequency of STR viruses in the cellular extracts showed STR-B as the predominant viral form as of day 8 (Figure 7B), when viral production, quantified by p27 content, was still at the limit of detection (Figure 7A). By contrast, in culture supernatants STR-C predominated at the first significant time points for viral production (day 13 and day 15) and persisted. This viral form was overtaken by STR-B from day 17 (Figure 7C). Despite the intrinsic variability in the initial quantity of thymic tissue per well, data obtained were homogenous and reproducible as shown by narrow standard deviations. Globally, the results showed that in the presence of IL-7, the STR C chimera was earlier and preferentially replicated. Over time, the cellular compartment sustaining this active replication seemed to be progressively eliminated in favor of that hiding the less virulent viral form, the STR-B.

Discussion

Data presented here support the major role of the gut in sustaining HIV/SIV replication in primary viremia and demonstrate a preferential activation in the GALT of the clade C HIV-1 promoter. The correlation between viral RNA genotypes in two compartments draining viruses produced by the GALT, serum and stools, shows that in primary infection plasma viremia was mainly sustained by this lymphoid tissue (Figures 3 and 5). As SIV and HIV-1 replicate within activated memory CD4⁺ T lymphocytes, and most lymphocytes in the intestinal lamina propria are of this phenotype, this partially explains why the gut is the preferred target for viral replication and early CD4⁺ T cell loss [2,11,34,35]. Nevertheless, the predominance of the STR-C chimera in the serum and the stools clearly shows that the intestinal microenvironment, enriched in γ c-dependent cytokines, such as IL-2, IL-7 and IL-15 [36], can actively select for viral variants to be replicated according to promoter enhancer polymorphism.

While the analysis of fecal specimens reflected active STR-C production (Figure 5A and 5B), STR-C was not homogeneously recovered as the predominant form in the intestinal IELs and LPLs cellular fractions (Figure 4A and 4B). Experiments on thymic histocultures have shown that high-level of STR-C virions production can be sustained by cellular populations where STR-C DNA is underrepresented (Figure 7B and 7C). It has been demonstrated that massive HIV-1 replication leads infected cells to apoptosis [37-39] and that SIV-specific CD8⁺ T cells can be detected in the GALT as early as 14 days post-infection [40]. Thus, elevated viral replication in the gut could lead to selective depletion of highly virus-replicating cellular subsets due to cell damage and/or increase of viral epitopes exposure on infected cells eliciting CTL lysis. This could also be at the origin of the almost complete disappearance of STR-C DNA two months after infection [18] in those compartments which

are completely colonized by STR-C at primary infection as mesenteric and peripheral lymph nodes and spleen (Figure 4C-F). Moreover, the gut IELs and LPLs cellular fractions were collected at day 18 after co-infection, such as slightly after when the massive depletion of intestinal CD4⁺ T lymphocytes has been demonstrated to occur [2,3,7-10]. Indeed, in RhMs, it has been calculated that while CD4⁺ T lymphocytes comprised 50 to 60% of the total intestinal T cell population before infection, only 5 to 10% of cells express the CD4 marker by 14 days of infection [3]. The profound depletion of memory CD4⁺ T lymphocytes is followed by incomplete repopulation by T lymphocytes of thymic origin which never reconstitute the GALT compartment in cell number and type [11]. *Ex vivo* data on cellular extracts from thymic histocultures (Figure 7B) and *in vivo* data on thymus from both co-infected RhMs (Figure 4E and 4F) have shown that the STR-B chimera very soon dominates in most thymocytes. This may explain that the recolonization of the gut leads to the increase of the relative frequency of STR-B-infected cells in the most depleted GALT cellular fractions (Figure 4A and 4B).

The relative low frequency of STR-C DNA in rPBMCs deserves comment (Figure 3A and 3B). Lymphocytes stimulated in the intestinal inductive sites (e.g. Peyer's patches) are drained to mesenteric lymph nodes via efferent lymphatics where they may undergo further division and differentiation [12]. STR-C is still predominant at these sites 18 days after infection (Figure 4C and 4D). From mesenteric lymph nodes, T lymphocytes can reach the blood via the thoracic duct. However, these cells express homing signals addressing them back to the intestine and other mucosal sites [41]. Indeed, it has been observed that CD4⁺ T lymphocytes with a mucosal homing phenotype were essentially absent from the peripheral blood of SIV infected rhesus macaques at their primary infection phase [42]. Thus, dilution of GALT-derived lymphocytes in the blood could explain that the STR-C chimera actively

replicating in the gut is almost undetectable in rPBMCs at the same time points (Figure 4A and 4B). Moreover, this clearly shows that in the same tissue, cell-free and cell-associated viral genomic variants may display a differential compartmentalization.

The GALT microenvironment is enriched in γ c-dependent cytokines, such as IL-2, IL-7 and IL-15 [36]. In particular, IL-7 deserves most attention as this cytokine has not only modulatory effects on T cells confined to the gut, but is one of the key cytokines involved in the regulation of global T lymphocyte homeostasis. IL-7 administration to SIV-infected non-human primates induces both a central renewal and a peripheral expansion of T lymphocytes associated to cell activation [43]. Moreover, IL-7 treatment does not alter naive and memory phenotype of T lymphocytes undergoing proliferation [44]. In addition, IL-7 can maintain T cells numbers through increased survival of T lymphocytes [45,46] mediated by the induction of Bcl-2-expression [47]. Notably, the augmentation in the number of CD4⁺ T lymphocytes is not paralleled by any increase in the viral load either in the blood or lymph nodes [21,43,48]. IL-7 can also induce the expression of latent HIV-1 genomes by the activation of resting CD4⁺ T lymphocytes [49-51]. Based on these data, it has been suggested to combine HAART (highly active anti-retroviral therapy) with IL-7 to recover a healthier T lymphocytes homeostasis and activate latent HIV-1 reservoirs. Nevertheless, from an immunological point of view, the positive role of IL-7 on T lymphocytes survival has been recently reassessed. It has been demonstrated that IL-7 enhances HIV-1_{LAI}-induced Fas sensitization of both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes [52]. And while IL-7 may inhibit spontaneous apoptosis by increasing the level of the anti-apoptotic Bcl-2, Bcl-2 has a poor preventive effect on Fas-mediated T lymphocytes cell death [53,54].

Recent data have shown that different stimuli (PHA and IL-2 versus IL-7) may induce divergent proviral expression from the same CD4⁺ T lymphocytes reservoirs obtained from PBMCs of patients infected by clade B HIV-1 ([51] and Pomerantz, RJ, personal communication). Clade B strains HIV-1 NL4-3 and NLAD8 had been used in a study in which it was shown that IL-7 can induce an enrichment of CXCR4 (X4) viruses after replication in thymocytes initially infected with a mixture of X4 (NL4-3) and R5 (NLAD8) HIV-1 strains [55]. Selective IL-7-induced cellular modifications have been evoked to explain the impact of this cytokine on HIV-1 quasispeciation [51,55].

Data presented in the present work show that superposed on a direct IL-7 effect on a specific cellular sub-population, a second mechanism can impinge on selective viral replication. By means of growth competition experiments in *ex vivo* thymic histocultures, it is shown that IL-7 may activate the replication of HIV-1 strains on the basis of their clade-specific promoter polymorphism. Moreover, *in vivo* data show that the GALT environment, which is enriched in IL-7 [16,17,36], induces the replication enhancement of clade C STR chimera versus the clade B and E counterparts. Implications are that IL-7 treatment is not neutral from the viral point of view. Therefore, if the pandemic is mainly driven by individuals with high viremic primary infection [56], IL-7 treatment could favor global clade specific drift, particularly towards a further predominance of HIV-1 C. It might be necessary to take into account this in setting up anti-viral treatment protocols including IL-7.

Methods

Animal studies. RhMs (*Macaca mulatta*) of Chinese origin, housed and cared for in accordance with European guidelines, were serologically negative for SIV, type D retrovirus and simian foamy virus. Two RhMs, 97R0350 and 98R0026, were intravenously co-inoculated with 100 TCID₅₀ of each cell-free STR-B, STR-C and STR-E chimeras for a total amount of 300 TCID₅₀. Blood, serum and fecal specimens were collected from each animal at regular intervals. Feces samples were placed in individual sterile tubes and were immediately frozen at -80°C until analysis.

Flow cytometry. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were quantified by flow cytometry with the following fluorochrome-labeled monoclonal antibodies: anti-rhesus monkey CD3-Fluorescein IsoThioCyanate (FITC), (clone FN18; Biosource International), anti-human CD4-PhycoErythrin (PE), (clone M-T477; BD Biosciences), anti-human CD8-Peridinin Chlorophyll Protein (PercP), (clone SK1; BD) and anti-human CD20-AlloPhycoCyanin (APC), (clone 2H7, BD Biosciences). 100 µl of EDTA-treated blood was incubated for 15 min at room temperature with the four antibodies. Erythrocytes were lysed by the addition of 2 ml of diluted IOTest 3 lysing solution (Beckman Coulter). The cells were washed three times in 1X PBS and fixed in 1X PBS containing 1% paraformaldehyde. All analyses were performed with a FACScalibur flow cytometer and Cellquest software (BD Biosciences).

Quantification of serum viral loads and plasma IL-7 levels. Serum was recovered as the upper phase after centrifugation of blood samples at 2200 rpm for 30 min. The global STR chimera viral loads in the serum were measured by real-time quantitative RT-PCR. The standard RNA was obtained from the pGEM-5Zf+ GAG plasmid [57]. Blood for IL-7 estimation was collected in heparin-containing tubes and centrifuged at 1400 rpm for 10 minutes allowing the

isolation of plasma as the upper phase. IL-7 levels in the plasma were determined using a commercial sandwich enzyme immunoassay kit available for humans (R&D Systems). The lower limit of detection for IL-7 was 0.10 pg/ml.

Blood, serum and feces samples. To obtain relative frequencies of cell-associated viral DNA, rPBMCs were separated from heparin-treated blood on a Ficoll-Paque density gradient and aliquoted at 10×10^6 per tube. rPBMCs were then pelleted, extensively washed with 1X PBS and lysed as described [58]. To analyze cell-free circulating viruses from 250 μ l of serum total RNA was extracted in a final volume of 25 μ l. Then, reverse transcription was performed in 30 μ l final reaction volume on 8 μ l of the extracted RNA, using AMV RT (Promega) and the R3OUT primer (5'-ACCTGCTAGTGCTGGAGAGA-3'). Total RNA was extracted from fecal specimens using the RNAqueous-Midi kit (Ambion, Austin, Tex.). Briefly, 6 ml of lysis-binding solution was added to 0.5 g of fecal sample and vigorously vortexed until the sample was thoroughly homogenized. The suspension was clarified by centrifugation at 8000 rpm for 10 min, and then an equal volume of 64% ethanol was added. The solution was passed through a glass fiber filter unit to bind nucleic acids and washed three times with wash buffer. The nucleic acids were eluted in 1 ml, precipitated with LiCl_2 to enrich for RNA and to remove potential PCR inhibitors, and then pelleted. Pellets were washed with cold 70% ethanol, air-dried and then resuspended in 30 μ l of DEPC H_2O . Five μ l of this solution was used for determination of viral RNA copies per gram of fecal sample by quantitative RT-PCR.

Isolation of IEL and LPL fractions. At sacrifice, the gut was harvested, and IELs and LPLs were isolated separately, as previously described [59,60]. Briefly, sections of duodenum, jejunum, ileum, caecum and colon were removed from monkeys immediately after euthanasia

and put in RPMI 1640 medium containing penicilin 200 U/ml and streptomycin 200 µg/ml. After flushing with 1X PBS, the intestinal sections were opened longitudinally. Mucosal surfaces were scraped with a scalpel, then dissociated by stirring in RPMI 1640 medium containing 5% fetal calf serum (RPMI-5) with a 20 ml syringe. After centrifugation, the pellet was resuspended in RPMI-5 and passed through a glass wool column, previously buffered by RPMI-5 (0.7 g of glass wool was packed in a 20 ml syringe; Fisher Scientific). IELs were stored on ice until further purification on Percoll gradient. Following epithelial removal, LPLs were collected by cutting the remaining intestinal segments into 1 to 2 mm pieces. Fragments were transferred into sterile glass cylinders embedded in RPMI 1640 medium supplied with 20 U/ml collagenase (type II, Sigma), penicillin 100 U/ml, streptomycin 100 µg/ml, 10 mM Hepes buffer pH 7.0, and 5% fetal calf serum. The cylinders were gently shaken at 37°C for two rounds of 30 min, until the intestinal pieces had completely dissociated into small fragments. At the end of each interval, the medium (containing LPLs) was separated from tissue fragments by passage through cell strainers and centrifuged at 1400 rpm for 15 min. Pellets were then washed twice in RPMI-5, resuspended in RPMI-5 and stored on ice. To enrich both IEL and LPL preparations, discontinuous Percoll (Sigma) density-gradients were made. Isotonic Percoll was diluted to 35 % (v/v) and 60 % (v/v) with RPMI-5, and then 2 ml of 35 % Percoll was upperlayered onto 2ml of 60 % Percoll in 15-ml centrifuge tubes. The LPL and IEL fractions were resuspended in 2 ml of RPMI-5, layered on the Percoll gradient and centrifuged at 3000 rpm for 20 min at 4°C. Lymphocytes were collected by pipetting at the interface between the 35 % and 60% gradients. Cells were then washed twice in 1X PBS and aliquoted at 10×10^6 cells per tube and lysed [58].

Cellular suspensions from organs. At sacrifice, the analyzed organs were harvested, mechanically muddled and resuspended in RPMI 1640. Resuspended pulmonary and splenic

cells were passed on Ficoll-Paque density gradients in order to eliminate red cells. All cellular fractions were washed twice in 1X PBS and aliquoted at 10×10^6 cells per tube and lysed [58].

Relative frequencies determination of STR chimeras. Cellular samples obtained from blood, serum, feces and different organs as described before, relative percentage of STR viruses was measured employing a nested PCR approach coupled to Southern blot hybridization. Briefly, the 5'STR promoter regions were amplified on lysed cellular fractions using primer STRSMAP5 (5'-TGGAAGGGATTAAACCCGGG-3') and gag1201 (5'-TCTTCCTCTCCCGCTCCTCACGCCGT-3') for the first round of PCR, and primer BCE5ON (5'-GGATTAAACCCGGGTCCGGA-3') and NARSIV3 (5'-ACTCGGGCGCCAATCTGCTAGGGATTTTCCTGCTTCGG-3') for the second round. On one third (10 μ l) of the reverse transcription reactions made on the extracted RNA samples, DNA amplification was performed by nested PCR with STRSMAP5 and R3OUT for the first round of PCR and BCE5ON and R3ON (5'-AATCTGCCAGCCTCTCCGCAGAG-3') for the second. PCR products were purified on low melting agarose gel, extracted by Qiagen Extraction kit (Qiagen S.A., Courtaboeuf, France), cloned using the TOPO TA cloning kit (Invitrogen SARL). 40 white clones were picked on three replica plates and transferred to nitrocellulose membrane filters (Protran BA85, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Bacterial DNA was denatured with 0.5 M NaOH and covalently linked to the membrane at 80 °C for 2 h. Filters were hybridized with one of the γ -³²P-labeled subtype-specific probes: COMPB (5'-GCTGACATCGAGCTTGCTACAA-3'), PSPAIHIVC5 (5'-TCTCGCCCGGGTCCGGACTTTTACAAAGACTGCT-3') and ECOMP (5'-ATAAAGACTGCTGACAAAGAAGTTTCTAACTAGG-3') for STR-B, STR-C and STR-E, respectively and revealed by film (Kodak, Chalon-sur-Saône, France). Since 40 colonies were

picked, the number of colonies positive to a clade-specific probe multiplied by 2.5 gave relative percentages.

Skin and vaginal LCs isolation. LCs from skin epidermis were obtained from RhMs legs and arms. Skin samples freed of fatty tissue were split-cut with a keratome set and skin slices were then incubated with 0.1% trypsin (Sigma) overnight at 4°C. Mucosal tissues obtained from vaginal biopsies were cut into small pieces and incubated for 90 min at 37°C with 1mg/ml collagenase IV S (SIGMA). A second incubation was then performed with trypsin-EDTA (Invitrogen) overnight at 4°C. Epidermis from skin and epithelium from vagina samples was separated from dermis throughout fine forceps. Epidermal and epithelial sheets of each sample were collected in Hanks' balanced saline solution (HBSS) (Invitrogen) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). By repeated pipetting of the epidermal and epithelial sheets and filtration through sterile gaze homogenous cell suspensions were obtained. Epidermal and epithelial cell suspensions were then passed on Ficoll paque density gradients. Then purification of LCs was achieved by two rounds of immunomagnetic sorting: cells were incubated for 30 min with a mouse monoclonal antibody directed to CD1a (clone SK9, BD Biosciences), washed in HBSS solution supplemented with 10% FCS and incubated for 30 min with bead-conjugated anti mouse immunoglobulin (Macs reagent kit, Miltenyi Biotec). LCs were eluted as CD1a⁺-positive cell fractions. Purity was checked by flow cytometry. To reveal previously immunolabelled CD1a⁺ cells, LCs-enriched fractions were incubated with the F(ab')₂ goat anti-mouse IgG (H+L)-FITC (clone 62-6311; Zymed) diluted 1/50 for 30 min at 4°C. LCs-enriched samples were pellet, washed and lysed [58].

Immunohistochemistry analysis. Skin and vagina biopsies were embedded in OCT Tissus-Tek (Miles, Elkheart, USA) and then cryofixed. Vertical sections of 5 mm were cut, air-dried,

fixed in acetone and then store at -20°C . Indirect immunohistochemistry staining was performed as described [18] for 30 min at room temperature. Revelation was performed by a labelled streptavidin-biotin-peroxidase assay (LSAB2 Kit, Dako, Carpinteria, California, USA). Negative controls were conducted using unrelated isotype-matched mouse immunoglobulins.

Thymic histoculture and growth competition experiment. Thymus was obtained from the elective cardiac surgery on a four months old HIV-1 seronegative human newborn. For p27 content and the determination of the STR relative frequency in supernatants and cellular extracts, 18 wells were prepared. At each data point, thymic histoculture of 3 wells was stopped and the supernatants and cellular materials were used for analysis. Per well, nine thymus fragments were co-infected with a total of 9000 TCID₅₀/well (3000 TCID₅₀ per STR virus) of the three STR chimeras for 3 h at 37°C. Thymus fragments were then maintained as describe [18] and every 2-3 days, the culture medium was completely renewed. Collected supernatants were filtrated through a filter with 0.45 μm pores. Then, RT-PCR was performed as described before. Thymic fragments were lysed as previously described [58].

Acknowledgments

This paper is dedicated to the memory of Dr Bruno Hurtrel who contributed to the initial phases of the study. We would like to thank Dr Colette Dezutter-Dambuyant for discussions, technical support and comments on the manuscript. This research was supported by the Institut Pasteur, the Agence National de Recherches sur le SIDA (ANRS) and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). M. Centlivre was recipient of an ANRS and a CANAM fellowship (Caisse Nationale d'Assurance Maladie et Maternité des Travailleurs Non Salariés des Professions Non Agricoles). P. Sommer acknowledges the ANRS and SIDACTION for fellowships. M. Michel was recipient of a Research Ministry fellowship and N. Schmitt of a SIDACTION fellowship. M. Centlivre has developed this work in the context of her thesis at the University of Paris VI.

References

1. Mowat AM, Viney JL (1997) The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 156: 145-166.
2. Veazey RS, Mansfield KG, Tham IC, Carville AC, Shvetz DE, et al. (2000) Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 74: 11001-11007.
3. Veazey RS, Marx PA, Lackner AA (2001) The mucosal immune system: primary target for HIV infection and AIDS. *Trends Immunol* 22: 626-633.
4. Heise C, Miller CJ, Lackner A, Dandekar S (1994) Primary acute simian immunodeficiency virus infection of intestinal lymphoid tissue is associated with gastrointestinal dysfunction. *J Infect Dis* 169: 1116-1120.
5. Heise C, Vogel P, Miller CJ, Halsted CH, Dandekar S (1993) Simian immunodeficiency virus infection of the gastrointestinal tract of rhesus macaques. Functional, pathological, and morphological changes. *Am J Pathol* 142: 1759-1771.
6. Heise C, Vogel P, Miller CJ, Lackner A, Dandekar S (1993) Distribution of SIV infection in the gastrointestinal tract of rhesus macaques at early and terminal stages of AIDS. *J Med Primatol* 22: 187-193.
7. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, et al. (2004) CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 749-759.
8. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, et al. (2003) Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 77: 11708-11717.
9. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, et al. (2004) Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 761-770.
10. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, et al. (1998) Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 280: 427-431.
11. Veazey RS, Tham IC, Mansfield KG, DeMaria M, Forand AE, et al. (2000) Identifying the target cell in primary simian immunodeficiency virus (SIV) infection: highly

- activated memory CD4(+) T cells are rapidly eliminated in early SIV infection in vivo. *J Virol* 74: 57-64.
12. Cheroutre H, Madakamutil L (2004) Acquired and natural memory T cells join forces at the mucosal front line. *Nat Rev Immunol* 4: 290-300.
 13. Elson CO, Mestecky JF (2001) The mucosal immune system. In: Blaser MJ, P.D. S, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL, editors. *Infections of the gastrointestinal tract*. Second edition ed: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 127-139.
 14. Lefrancois L, Puddington L (1999) Basic aspects of intraepithelial lymphocytes biology. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamn ME, al e, editors. *Mucosal immunology*. Second edition ed. New York: Academic Press. pp. 413-428.
 15. Nilsen NO (1984) Endothelial changes and microvascular leakage due to hyperthermia in chick embryos. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 46: 165-174.
 16. Spahn TW, Kucharzik T (2004) Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* 53: 456-465.
 17. Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, et al. (1995) Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest* 95: 2945-2953.
 18. Centlivre M, Sommer P, Michel M, Ho Tsong Fang R, Gofflo S, et al. (2005) HIV-1 clade promoters strongly influence spatial and temporal dynamics of viral replication in vivo. *J Clin Invest* 115: 348-358.
 19. Jeeninga RE, Hoogenkamp M, Armand-Ugon M, de Baar M, Verhoef K, et al. (2000) Functional differences between the long terminal repeat transcriptional promoters of human immunodeficiency virus type 1 subtypes A through G. *J Virol* 74: 3740-3751.
 20. Ling B, Veazey RS, Luckay A, Penedo C, Xu K, et al. (2002) SIV(mac) pathogenesis in rhesus macaques of Chinese and Indian origin compared with primary HIV infections in humans. *AIDS* 16: 1489-1496.
 21. Muthukumar A, Wozniakowski A, Gauduin MC, Paiardini M, McClure HM, et al. (2004) Elevated interleukin-7 levels not sufficient to maintain T-cell homeostasis during simian immunodeficiency virus-induced disease progression. *Blood* 103: 973-979.
 22. Santiago ML, Bibollet-Ruche F, Bailes E, Kamenya S, Muller MN, et al. (2003) Amplification of a complete simian immunodeficiency virus genome from fecal RNA of a wild chimpanzee. *J Virol* 77: 2233-2242.
 23. van der Hoek L, Boom R, Goudsmit J, Snijders F, Sol CJ (1995) Isolation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA from feces by a simple method and

- difference between HIV-1 subpopulations in feces and serum. *J Clin Microbiol* 33: 581-588.
24. Miller CJ, Shattock RJ (2003) Target cells in vaginal HIV transmission. *Microbes Infect* 5: 59-67.
 25. Soto-Ramirez LE, Renjifo B, McLane MF, Marlink R, O'Hara C, et al. (1996) HIV-1 Langerhans' cell tropism associated with heterosexual transmission of HIV. *Science* 271: 1291-1293.
 26. Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, et al. (1997) Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 3: 1369-1375.
 27. Ma Z, Lu FX, Torten M, Miller CJ (2001) The number and distribution of immune cells in the cervicovaginal mucosa remain constant throughout the menstrual cycle of rhesus macaques. *Clin Immunol* 100: 240-249.
 28. Sala M, Zambruno G, Vartanian JP, Marconi A, Bertazzoni U, et al. (1994) Spatial discontinuities in human immunodeficiency virus type 1 quasispecies derived from epidermal Langerhans cells of a patient with AIDS and evidence for double infection. *J Virol* 68: 5280-5283.
 29. Henderson AJ, Calame KL (1997) CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) sites are required for HIV-1 replication in primary macrophages but not CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8714-8719.
 30. Henderson AJ, Connor RI, Calame KL (1996) C/EBP activators are required for HIV-1 replication and proviral induction in monocytic cell lines. *Immunity* 5: 91-101.
 31. Henderson AJ, Zou X, Calame KL (1995) C/EBP proteins activate transcription from the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in macrophages/monocytes. *J Virol* 69: 5337-5344.
 32. Hogan TH, Krebs FC, Wigdahl B (2002) Regulation of human immunodeficiency virus type 1 gene expression and pathogenesis by CCAAT/enhancer binding proteins in cells of the monocyte/macrophage lineage. *J Neurovirol* 8: 21-26.
 33. Glushakova S, Baibakov B, Margolis LB, Zimmerberg J (1995) Infection of human tonsil histocultures: a model for HIV pathogenesis. *Nat Med* 1: 1320-1322.
 34. Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, et al. (2005) Peak SIV replication in resting memory CD4(+) T cells depletes gut lamina propria CD4(+) T cells. *Nature* 434: 1148-1152.

35. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, et al. (2005) Massive infection and loss of memory CD4(+) T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434: 1093-1097.
36. Porter BO, Malek TR (2000) Thymic and intestinal intraepithelial T lymphocyte development are each regulated by the gamma-c-dependent cytokines IL-2, IL-7, and IL-15. *Semin Immunol* 12: 465-474.
37. Alimonti JB, Ball TB, Fowke KR (2003) Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol* 84: 1649-1661.
38. Estaquier J, Idziorek T, de Bels F, Barre-Sinoussi F, Hurtrel B, et al. (1994) Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9431-9435.
39. Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijster MJ, Keet RP, et al. (1992) Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* 257: 217-219.
40. Veazey RS, Gauduin MC, Mansfield KG, Tham IC, Altman JD, et al. (2001) Emergence and kinetics of simian immunodeficiency virus-specific CD8(+) T cells in the intestines of macaques during primary infection. *J Virol* 75: 10515-10519.
41. Kunkel EJ, Butcher EC (2002) Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity* 16: 1-4.
42. Mattapallil JJ, Letvin NL, Roederer M (2004) T-cell dynamics during acute SIV infection. *AIDS* 18: 13-23.
43. Nugeyre MT, Monceaux V, Beq S, Cumont MC, Ho Tsong Fang R, et al. (2003) IL-7 stimulates T cell renewal without increasing viral replication in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Immunol* 171: 4447-4453.
44. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrancois L (2000) Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1: 426-432.
45. Khaled AR, Li WQ, Huang J, Fry TJ, Khaled AS, et al. (2002) Bax deficiency partially corrects interleukin-7 receptor alpha deficiency. *Immunity* 17: 561-573.
46. Kim K, Lee CK, Sayers TJ, Muegge K, Durum SK (1998) The trophic action of IL-7 on pro-T cells: inhibition of apoptosis of pro-T1, -T2, and -T3 cells correlates with Bcl-2 and Bax levels and is independent of Fas and p53 pathways. *J Immunol* 160: 5735-5741.
47. Akashi K, Kondo M, von Freeden-Jeffrey U, Murray R, Weissman IL (1997) Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* 89: 1033-1041.

48. Fry TJ, Moniuszko M, Creekmore S, Donohue SJ, Douek DC, et al. (2003) IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates. *Blood* 101: 2294-2299.
49. Scripture-Adams DD, Brooks DG, Korin YD, Zack JA (2002) Interleukin-7 induces expression of latent human immunodeficiency virus type 1 with minimal effects on T-cell phenotype. *J Virol* 76: 13077-13082.
50. Unutmaz D, KewalRamani VN, Marmon S, Littman DR (1999) Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J Exp Med* 189: 1735-1746.
51. Wang FX, Xu Y, Sullivan J, Souder E, Argyris EG, et al. (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.
52. Lelievre JD, Petit F, Arnoult D, Ameisen JC, Estaquier J (2005) Interleukin 7 increases human immunodeficiency virus type 1 LAI-mediated Fas-induced T-cell death. *J Virol* 79: 3195-3199.
53. Huang DC, Hahne M, Schroeter M, Frei K, Fontana A, et al. (1999) Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 14871-14876.
54. Huang DC, Tschopp J, Strasser A (2000) Bcl-2 does not inhibit cell death induced by the physiological Fas ligand: implications for the existence of type I and type II cells. *Cell Death Differ* 7: 754-755.
55. Schmitt N, Chene L, Boutolleau D, Nugeyre MT, Guillemard E, et al. (2003) Positive regulation of CXCR4 expression and signaling by interleukin-7 in CD4+ mature thymocytes correlates with their capacity to favor human immunodeficiency X4 virus replication. *J Virol* 77: 5784-5793.
56. Pilcher CD, Price MA, Hoffman IF, Galvin S, Martinson FE, et al. (2004) Frequent detection of acute primary HIV infection in men in Malawi. *AIDS* 18: 517-524.
57. Hofmann-Lehmann R, Swenerton RK, Liska V, Leutenegger CM, Lutz H, et al. (2000) Sensitive and robust one-tube real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction to quantify SIV RNA load: comparison of one-versus two-enzyme systems. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 1247-1257.
58. Sala M, Pelletier E, Wain-Hobson S (1995) HIV-1 gp120 sequences from a doubly infected drug user. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 653-655.

59. Smit-McBride Z, Mattapallil JJ, McChesney M, Ferrick D, Dandekar S (1998) Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4(+) T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes. *J Virol* 72: 6646-6656.
60. Veazey RS, Rosenzweig M, Shvetz DE, Pauley DR, DeMaria M, et al. (1997) Characterization of gut-associated lymphoid tissue (GALT) of normal rhesus macaques. *Clin Immunol Immunopathol* 82: 230-242.

Figure Legends

Figure 1 Schematic representation of the genome 3' end of the STR chimeras. In the SIVmac239 genome backbone, the U-box (Ub), the 3' polypurine tract (3'PPT) and the viral attachment site (*att*) present in *nef* are inactivated by 13 silent point mutations (crossed box), [18]. The functional elements are inserted just downstream the *nef* stop codon, shifting the 5' extremity of the 3' viral promoter downstream this stop codon. The SIVmac239 U3 promoter region is replaced by the U3 core promoters/enhancers of the clade B, C or E HIV-1 viral prototypes (GenBank accession numbers K02013, AF127567 and AF127570, respectively). Core promoters/enhancer polymorphisms in transcription factor binding sites are detailed in the inset.

Figure 2 Immunological and virological parameters of the infection of RhMs 97R0350 and 98R0026. **(A)** Blood CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte counts. **(B)** Serum viral RNA loads (lower limit of detection was 200 copies/ml). **(C)** Mean values and standard deviations of two independent determinations of plasma IL-7 levels (lower limit of detection was 0.10 pg/ml).

Figure 3 Relative frequency of STR chimeras. **(A and B)** Viral DNA in rPBMCs of **(A)** monkey 97R0350 and **(B)** monkey 98R0026. **(C and D)** Viral RNA in serum of **(C)** monkey 97R0350 and **(D)** monkey 98R0026.

Figure 4 Relative frequency of STR chimeras at sacrifice in different organs. **(A and B)** IELs and LPLs fractions from different gut portions of **(A)** monkey 97R0350 and **(B)** monkey 98R0026. **(C and D)** Peripheral and mesenteric lymph nodes of **(C)** monkey 97R0350 and **(D)** monkey 98R0026. **(E and F)** Cellular fractions from lung, spleen, tonsil, thymus, skin and

vagina LCs of **(E)** monkey 97R0350 and **(F)** monkey 98R0026. Duod: duodenum; jej: jejunum; ile: ileum; caec: caecum.

Figure 5 Relative frequency of STR chimeras in feces. **(A and B)** Mean values and standard deviations from two independent analyses on fecal specimens. Samples were taken at the indicated time points in the daily-cleaned cages of **(A)** monkey 97R0350 and **(B)** monkey 98R0026.

Figure 6 Immunohistochemical analysis of LCs in skin and vagina biopsies. Representative data from monkey 97R0350 are shown. **(A-F)**. HLA-DR expression in skin **(A)** and vagina **(D)**; CD1a expression in skin **(B)** and vagina **(E)**; and CD3 expression in skin **(C)** and vagina **(F)**. Magnification: x400 **(A-C)** and x200 **(D-F)**.

Figure 7 Growth competition experiments on human thymus fragments in the presence of 5 ng/ml of IL-7. **(A)** Global viral replication kinetics are measured by the determination of viral p27 content in the supernatant of three independent experiments/wells. Mean values and standard deviations are indicated (lower level of detection was 0.06 ng/ml). **(B and C)** Relative frequency of STR chimeras is given for each time point as mean values determined from the three independent experiments/wells described in **A**. Frequencies correspond to the analysis of **(B)** cellular extracts and **(C)** supernatants.

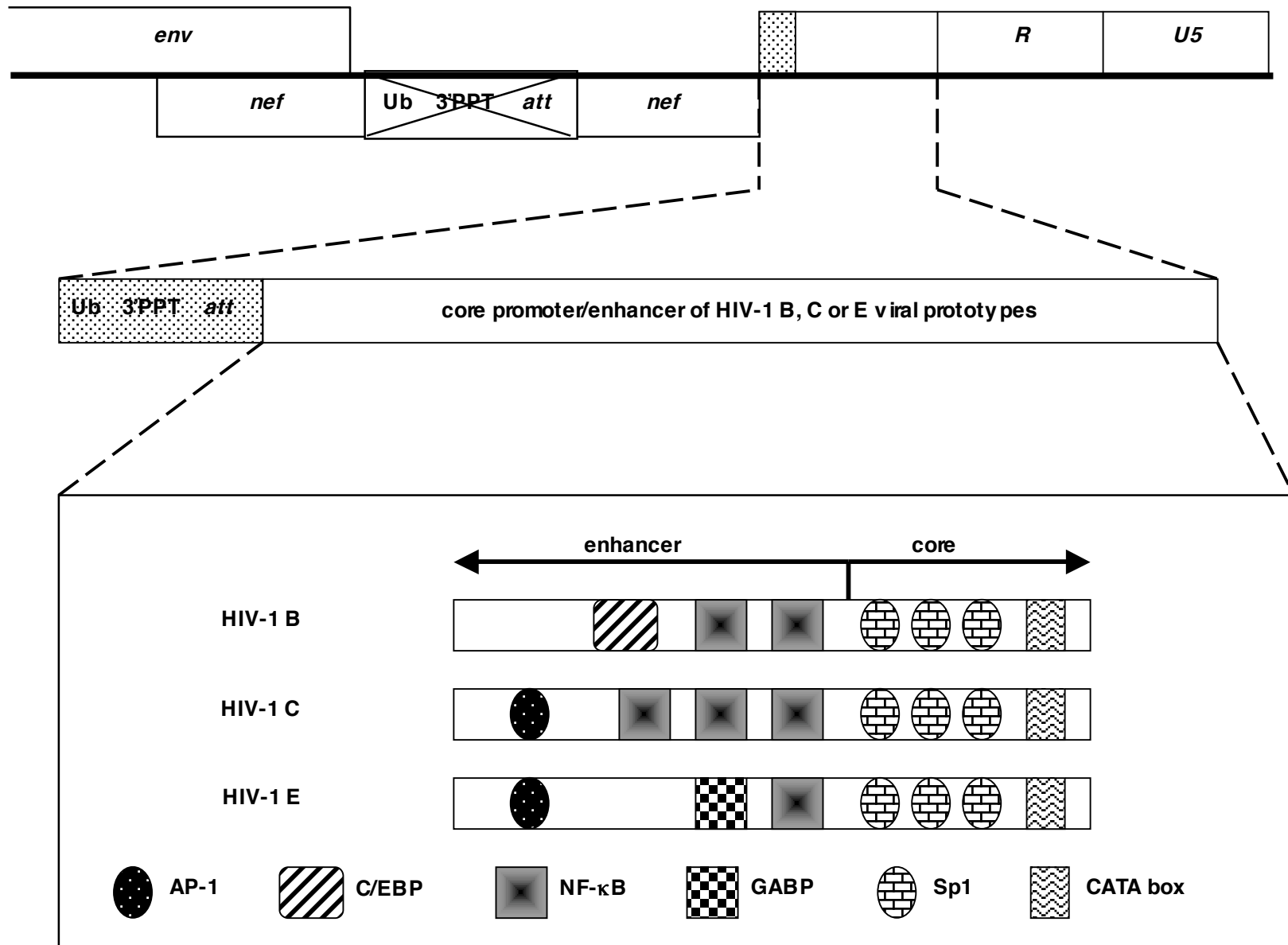


Figure 1

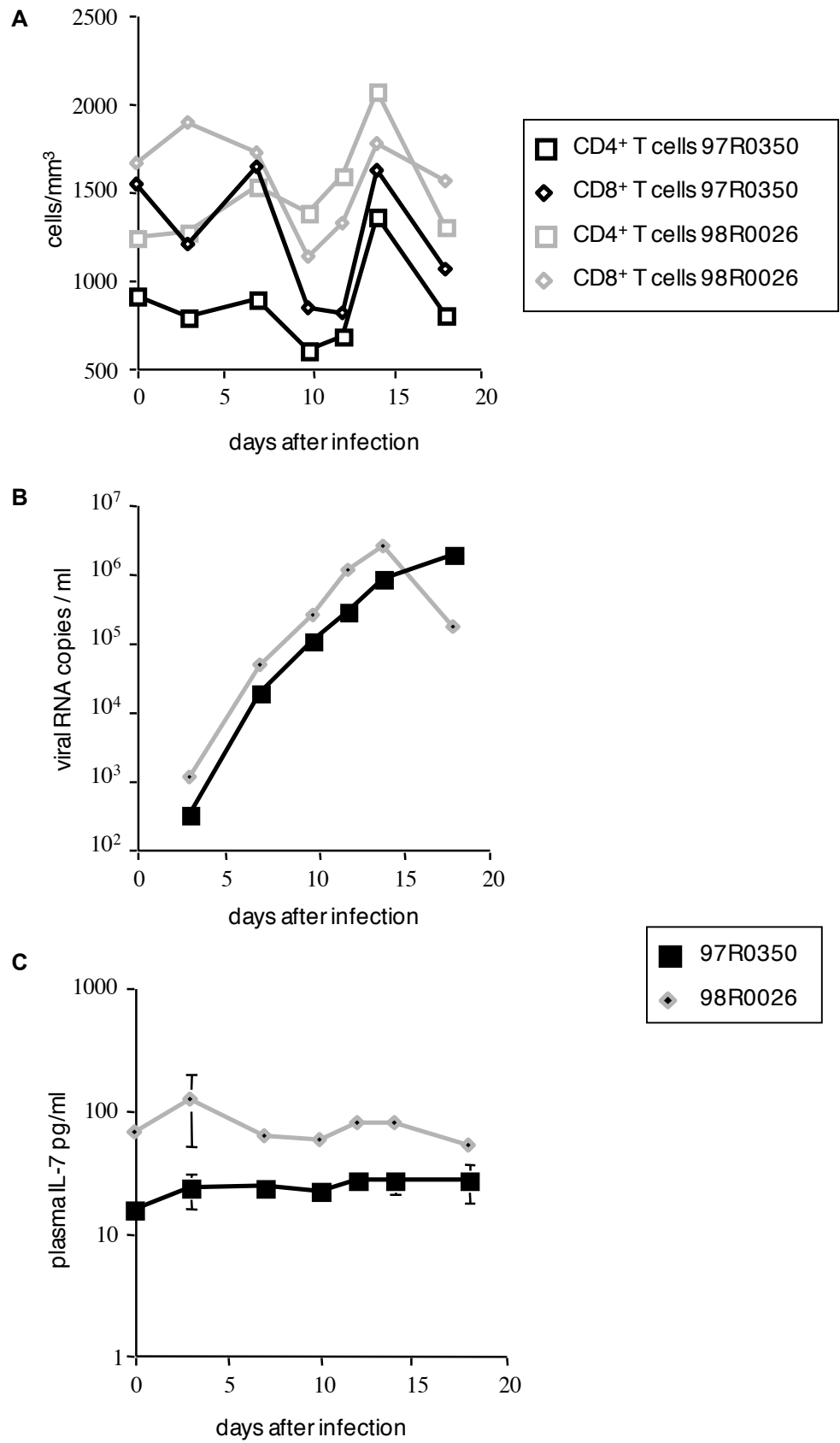


Figure 2

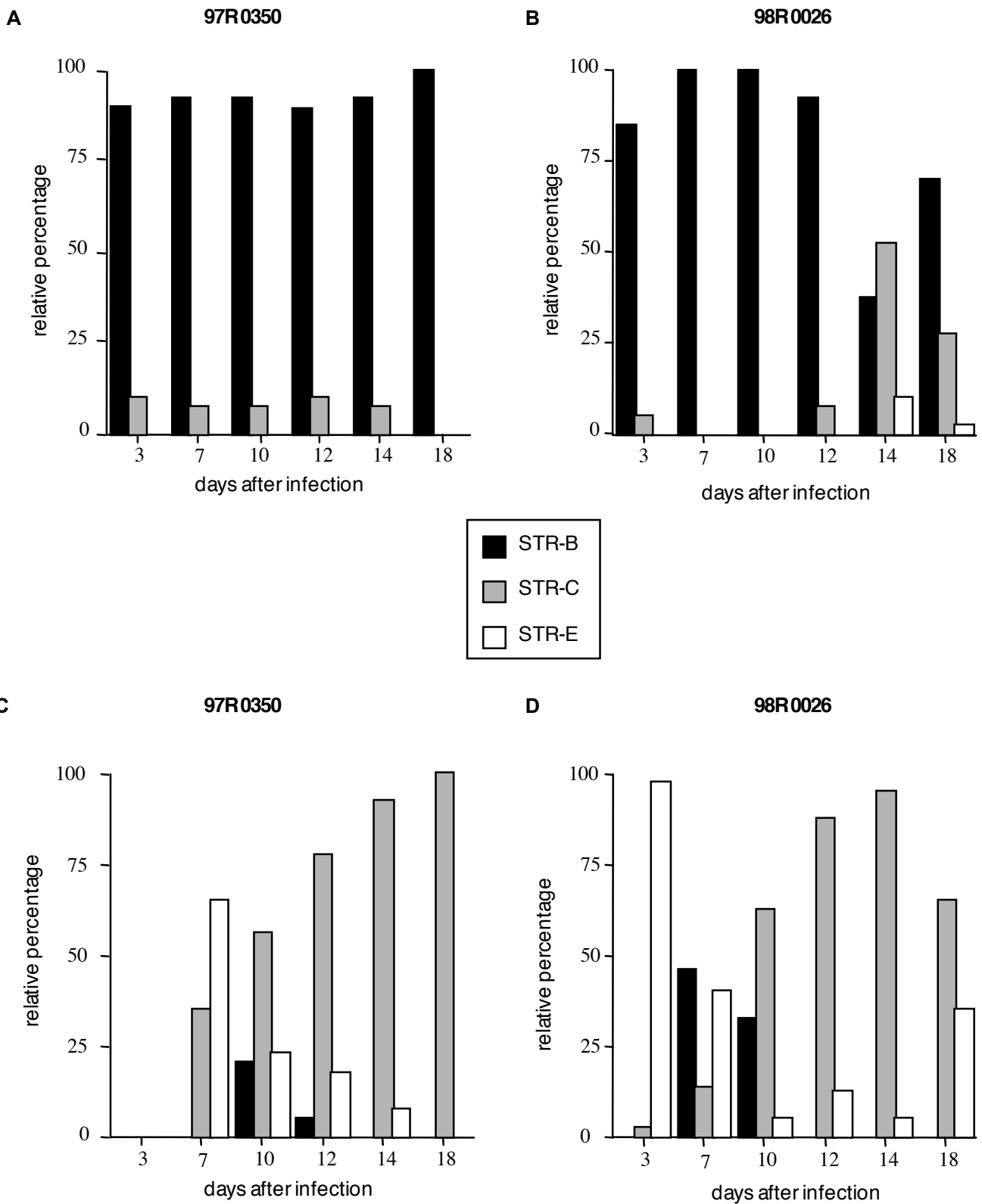


Figure 3

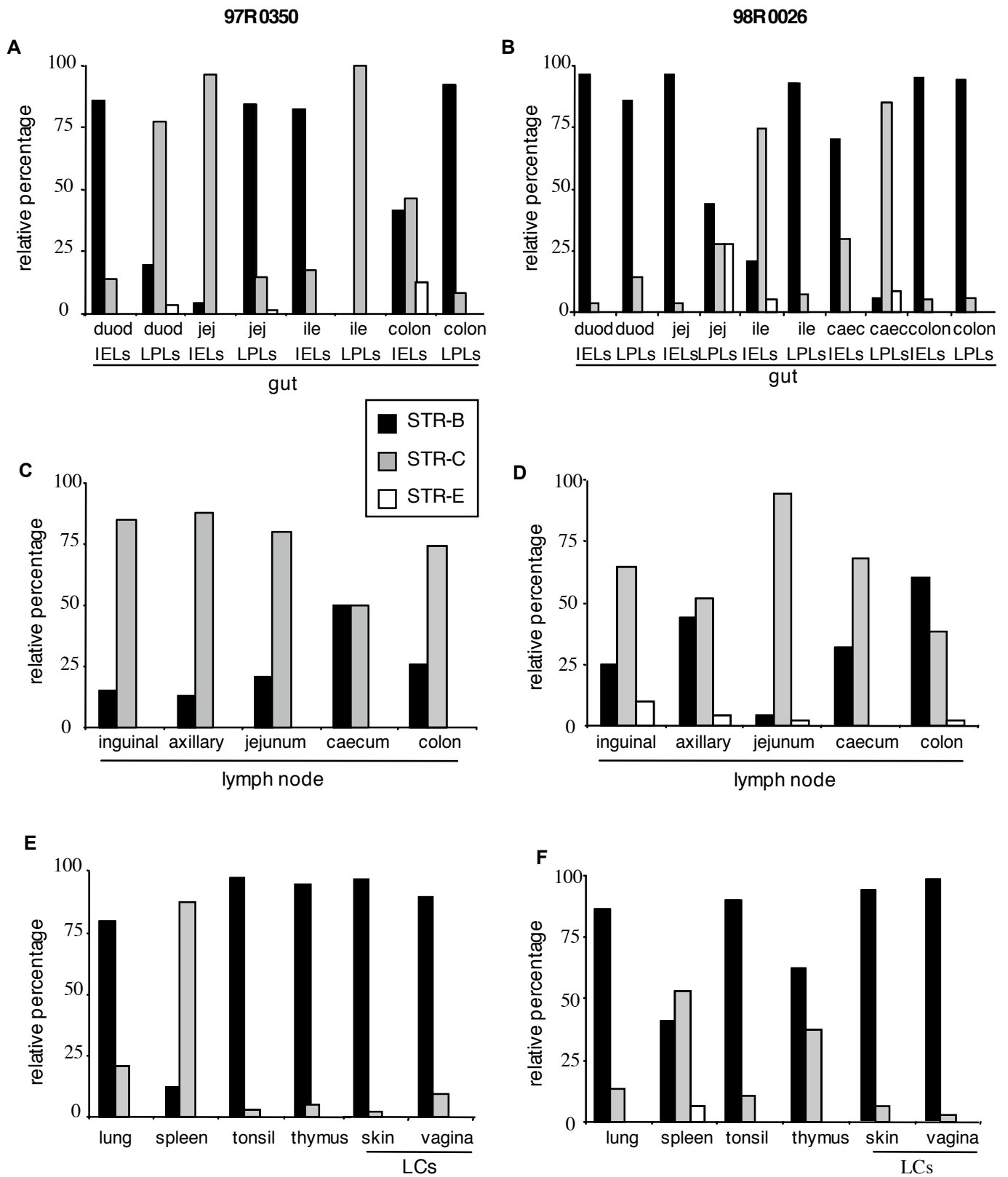
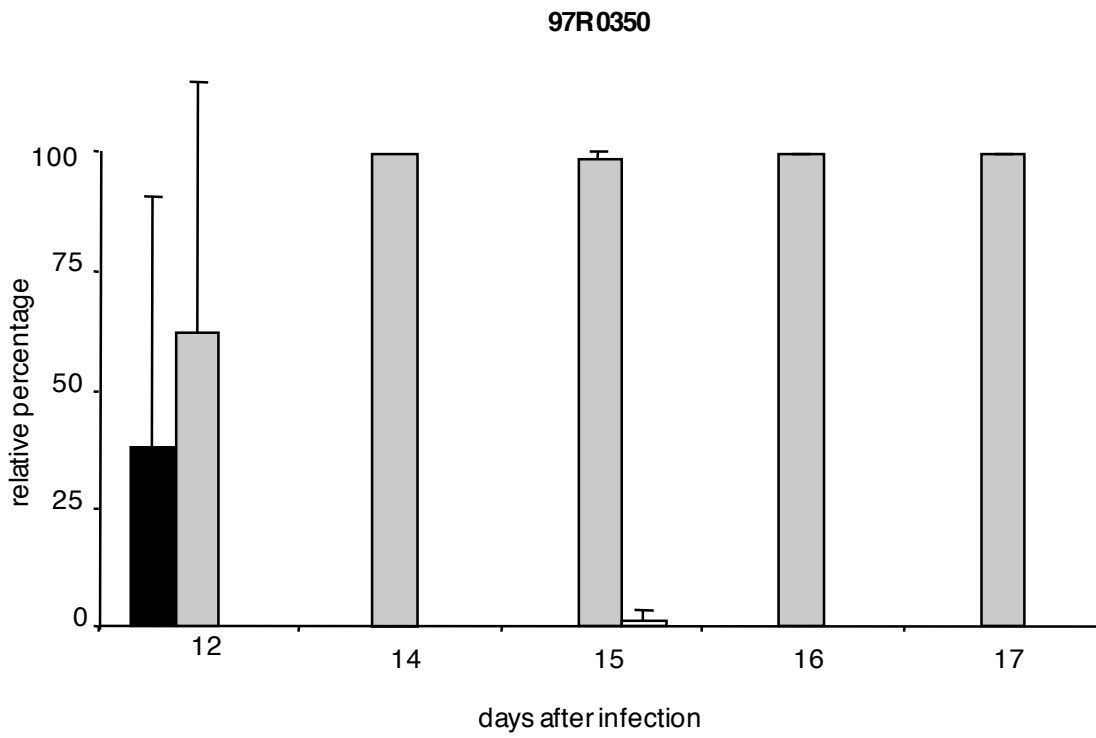


Figure 4

A



B

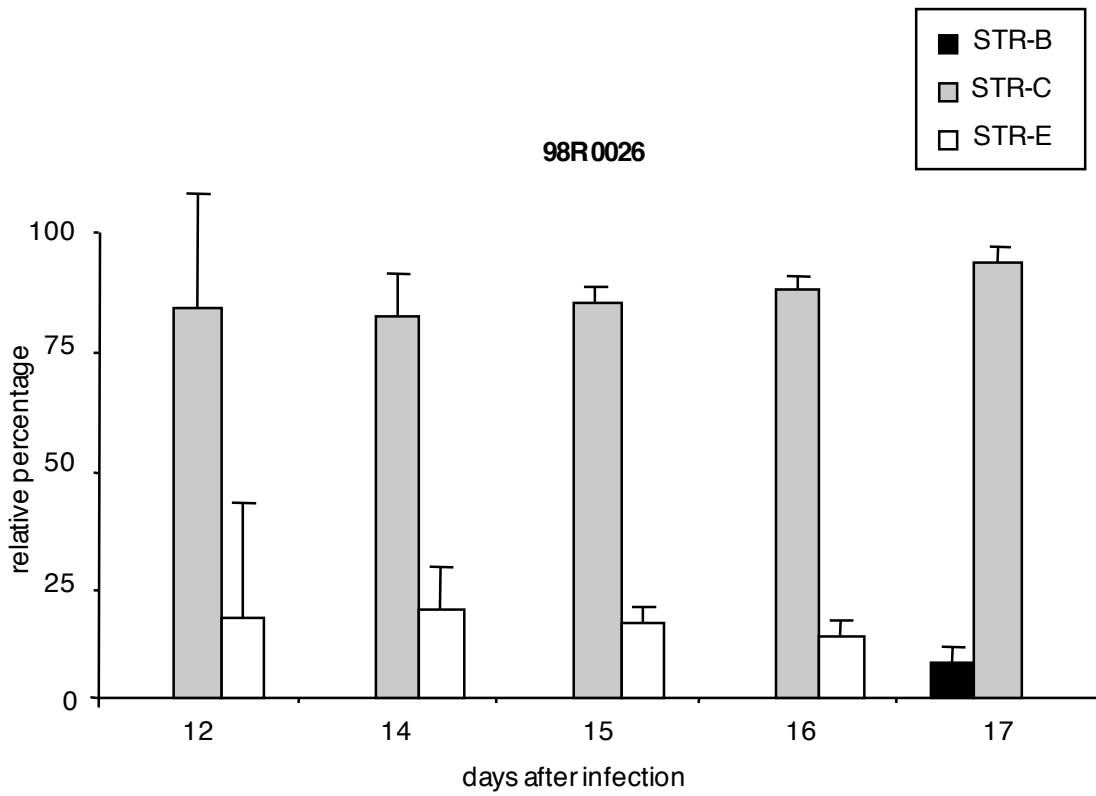
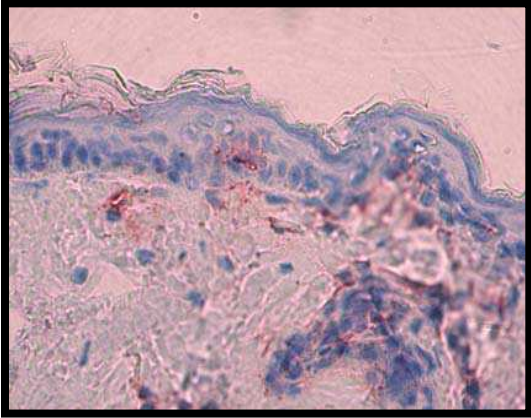
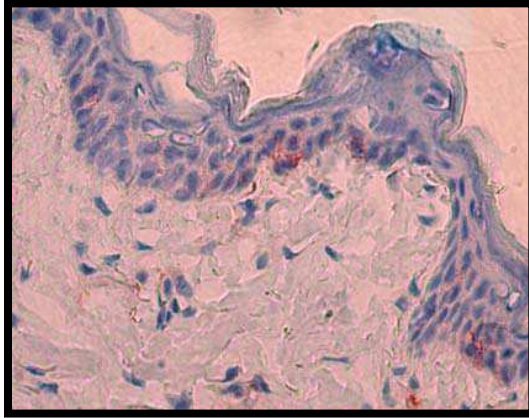


Figure 5

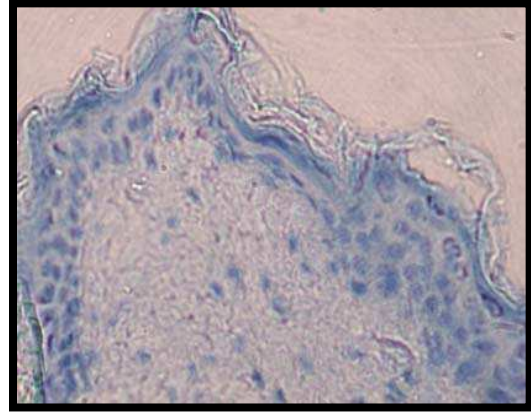
A



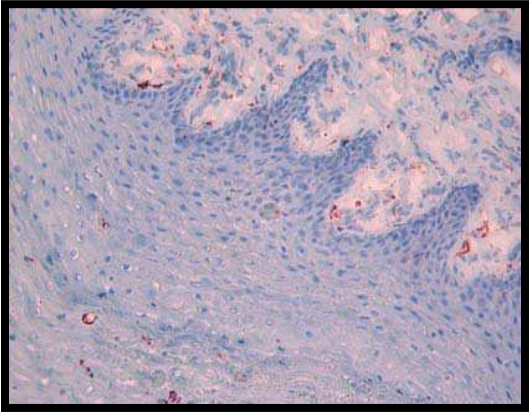
B



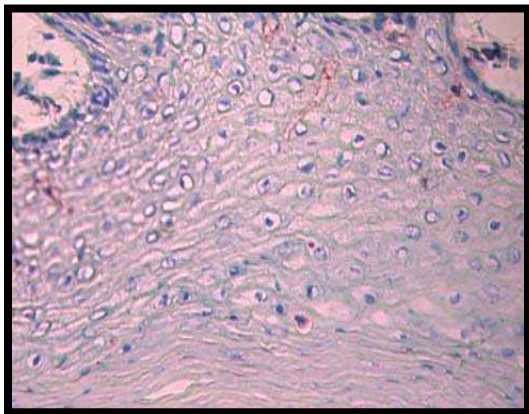
C



D



E



F

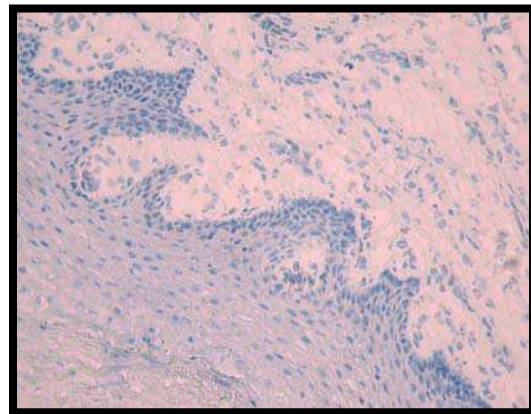


Figure 6

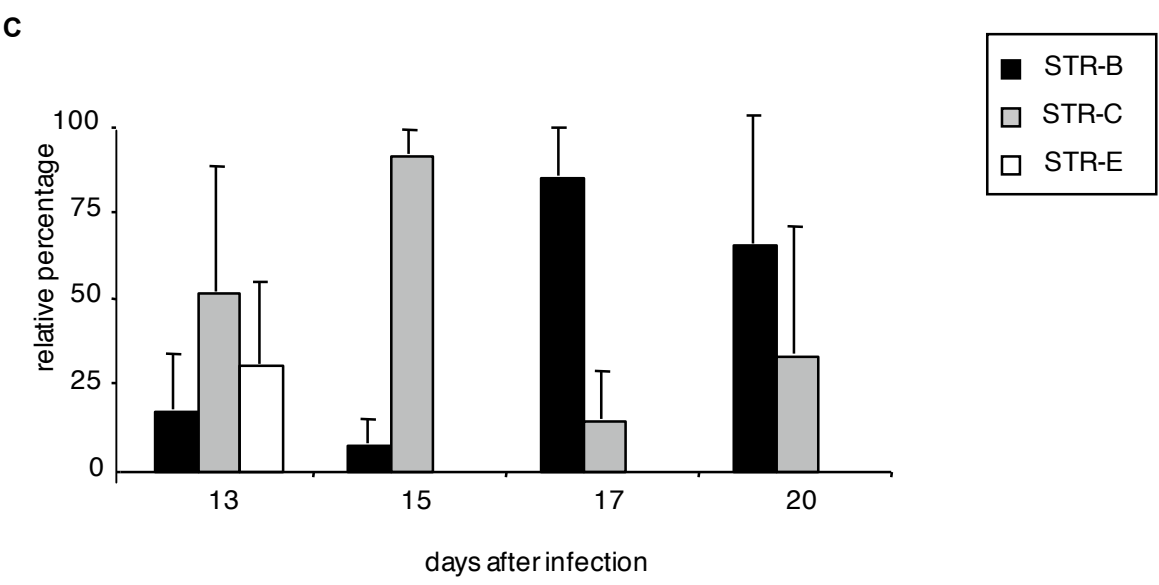
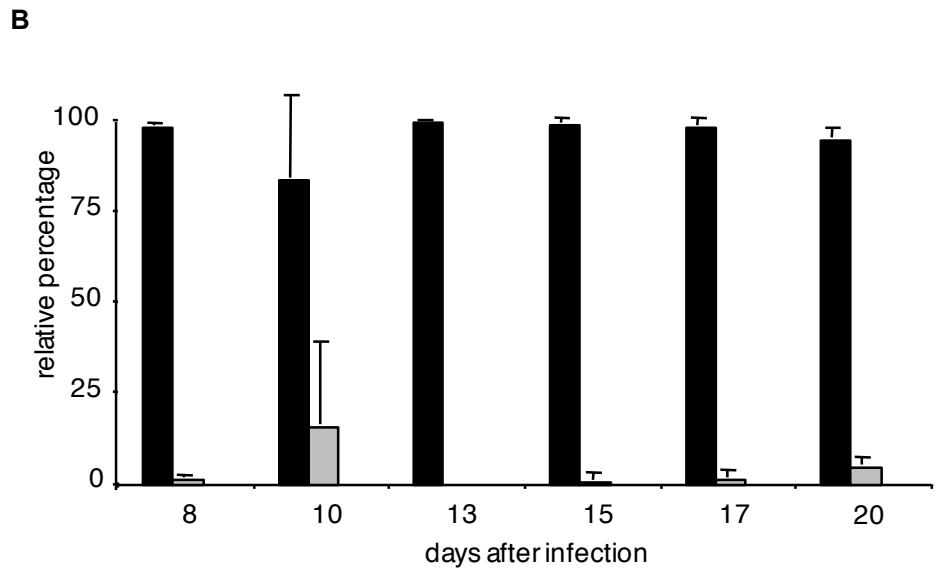
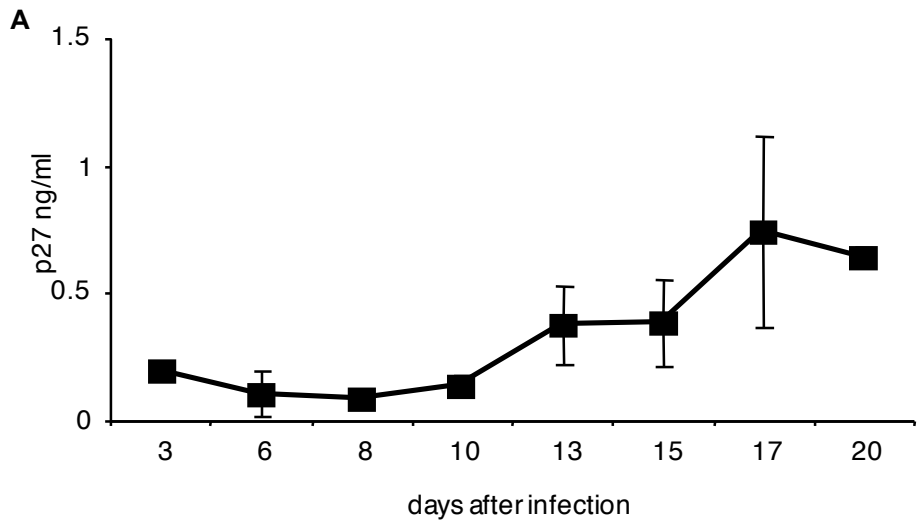


Figure 7

DISCUSSION

La pandémie actuelle de SIDA est caractérisée par une multitude de souches du VIH-1 du groupe M, proches génétiquement, et classées en sous-types. La variabilité génétique de ces sous-types est répartie tout au long du génome viral, dans les régions codantes et non codantes. Toutefois, la question de l'impact du polymorphisme génétique sur les propriétés biologiques du virus n'est toujours pas élucidée. Nous nous sommes intéressés à cette problématique au niveau du promoteur viral. En effet, le promoteur module la transcription du génome viral et a donc une influence sur la dynamique de la réplication virale et potentiellement sur la pathogenèse du VIH-1.

Plusieurs groupes ont déjà comparé le promoteur minimal/activateur des différents sous-types du VIH-1, afin de mettre en évidence un phénotype différentiel en fonction du génotype (Jeeninga et al., 2000; Kurosu et al., 2002; Lemieux et al., 2004; Montano et al., 1998; Montano et al., 2000; Montano et al., 1997; Naghavi et al., 1999b; Roof et al., 2002; Verhoef et al., 1999). Toutefois, ces études se sont surtout limitées à l'évaluation des différences entre les forces promotrices des différents sous-types, dans des essais de transcription de gène rapporteur, CAT ou luciférase, sous le contrôle des régions promotrices spécifiques des différents sous-types du VIH-1. Or, la force d'un promoteur ne corrèle pas forcément avec une cinétique de réplication plus accrue (Marzio et al., 2002).

Dans le cadre de mon travail de thèse, nous avons voulu comparer l'influence du polymorphisme du promoteur du VIH-1 de différents sous-types du VIH-1 dans le contexte d'un virus complet, se répliquant *in vivo*. Pour cela, nous avons construit un nouveau virus chimère VIS/VIH-1, qui permet d'éviter deux points faibles des études réalisées précédemment sur le promoteur minimal/activateur du VIH-1, dans un contexte de virus complet (Jeeninga et al., 2000; van Opijnen et al., 2004a; Verhoef et al., 1999). En effet, dans ces expériences, le promoteur minimal/activateur n'est jamais dissocié de sa région modulatrice, dont l'effet *in vivo* sur la réplication n'est toujours pas élucidé. De plus, le promoteur minimal/activateur est replacé dans un génome du VIH-1 de sous-type B (VIH-1 B). On ne peut donc pas exclure que les éléments du génome du VIH-1 B aient évolué en parallèle de son promoteur, et que le virus VIH-1 B portant son propre promoteur pourrait par conséquent avoir un avantage sélectif par rapport aux autres du fait du fond génomique utilisé.

Nous avons construit un nouveau virus STR (Short Terminal Repeat) où ces deux biais de manipulation sont évités :

- Tout d'abord, sur le fond génétique du VISmac239, nous avons déstructuré les éléments Ubox, 3'PPT, IR et IN par mutation silencieuse et nous les avons replacés en aval du codon stop du gène *nef* afin de créer un virus (STR-WT) dont le promoteur est restreint au

promoteur minimal/activateur. Nous évitons ainsi tout effet de la région modulatrice, et comme le gène *nef* reste intact, la virulence innée du virus n'est pas altérée.

- Par ailleurs, nous avons remplacé le promoteur minimal/activateur du VIS par ceux des sous-types du VIH-1 B, C et E, ce qui permet d'étudier l'activité du promoteur en l'absence d'éléments ayant co-évolué. De plus, le choix du génome du VIS nous permet d'avoir accès au modèle animal du macaque rhésus, ce qui rend possible l'analyse *in vivo* de l'influence du promoteur sur la réplication virale.

La création de nouveaux virus chimères STR (STR-B, STR-C et STR-E) a donc permis la mise en place d'un outil précieux pour l'analyse du polymorphisme du promoteur minimal/activateur dans un contexte de virus complet et *in vivo*.

A. Une réplication différentielle dépendante de l'environnement cellulaire

Puisque les trois chimères construites dans le cadre de ce projet de recherche (STR-B, STR-C et STR-E) sont isogéniques, elles expriment les mêmes protéines virales et notamment celles de l'enveloppe, elles ont donc la même potentialité à entrer dans une cellule cible. Après intégration du génome proviral, le promoteur devient l'acteur principal dans la réplication virale, qui va être dépendante de l'environnement cellulaire dans lequel le virus se réplique, du fait de concentrations différentes en facteurs de transcription cellulaires. Par conséquent, dans un même environnement, des différences observées entre les virus chimères STR dans leur cinétique de réplication ne peuvent être imputables qu'au polymorphisme du promoteur minimal/activateur.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* que le polymorphisme du promoteur spécifique des sous-types du VIH-1 se traduit par des phénotypes différentiels marqués de la réplication virale, dépendant de l'environnement tissulaire dans lequel le virus se réplique.

1) Un impact marqué du polymorphisme du promoteur in vitro

Quand les virus se propagent individuellement sur lignée cellulaire établie (CEMx174) ou sur rPBMC (PBMC de macaque rhésus), leurs cinétiques de réplication sont semblables alors que lorsqu'ils se propagent *ex vivo* en compétition pour le même substrat cellulaire, le STR-B est la forme provirale dominante (*article 1*). Par ces expériences, nous avons ainsi pu mettre en évidence de subtiles différences de "fitness", indiscernables en mono-infection. Ces données confirment le fait que la compétition virale *ex vivo* est une méthode efficace pour

détecter des différences phénotypiques minimales entre virus et mettre en évidence des capacités différentes de réplication dans un environnement donné.

Le STR-B prédomine sur les autres virus *ex vivo* lors d'expériences de compétition, même s'il est en proportion minimale au début de l'expérience (STR-B 1 ng p27 / STR-C 19 ng p27). Ce phénomène est remarquable et hautement reproductible, mais il n'est pas facile de lui trouver une explication évidente. Il est possible que le promoteur du sous-type B utilisé dans cette étude soit particulièrement adapté en culture. En effet, le promoteur du sous-type B de notre étude provient de la souche VIH-1 B LAI, qui a été isolée après une culture prolongée sur des lymphocytes humains (Wain-Hobson et al., 1991), tandis que les promoteurs des sous-types C et E proviennent d'isolats primaires (Jeeninga et al., 2000). Un tel scénario n'est pas sans précédent, et une adaptation du LTR à des conditions spécifiques de culture a déjà été décrite. Ainsi, lorsque des éléments (TetO) du système Tétracycline-dépendant sont insérés dans le promoteur du VIH-1, le virus, dans lequel 8 éléments TetO ont été introduits, subit un réarrangement drastique de son promoteur lors de cultures prolongées (Marzio et al., 2002). Toutefois, l'alignement de la séquence du VIH-1 B LAI avec d'autres isolats primaires et d'autres souches adaptées en laboratoire de sous-type B ne montre aucune modification majeure dans la région du promoteur minimal/activateur, ni même de mutations ponctuelles au niveau de la boîte CATA, des deux sites NF- κ B et du site RBEIII, suggérant que l'adaptation de cette souche n'a pas véritablement modifié la région d'intérêt. Par ailleurs, nous avons suivi les cultures des trois chimères STR sur plus de deux mois et, après séquençage, nous n'avons observé aucun changement significatif du promoteur minimal/activateur, suggérant qu'*in vitro* et *ex vivo* il n'y pas eu d'adaptation des virus STR (notamment C et E) à leur environnement cellulaire.

L'équipe de Eric Arts a également réalisé des expériences de compétition virale avec différents isolats du VIH-1 et a mis en évidence *ex vivo* le même phénotype que le nôtre (Ball et al., 2003) : le VIH-1 B domine sur le VIH-1 C en compétition aussi bien dans les lymphocytes T CD4⁺ primaires que dans les macrophages. L'avantage sélectif du VIH-1 B en compétition avec le VIH-1 C serait dû à un bénéfice lors des premières étapes suivant l'entrée du virus dans la cellule cible. Or, si ces données sont comparées aux nôtres, il s'avère que le promoteur minimal/activateur confère à lui seul le même phénotype dans notre analyse. Toutefois, on peut se demander, si le STR-B a gagné un avantage par rapport aux autres chimères STR, par exemple lors de l'étape de transcription inverse ou d'intégration qui implique toutes deux la région promotrice du LTR. Cela pourrait expliquer la prédominance

très rapide du STR-B en culture et même s'il est quantitativement en défaut par rapport aux autres virus compétiteurs.

2) *In vivo, une multitude d'environnements juxtaposés, une dynamique complexe*

Les données obtenues *in vitro* nous ont confirmé l'importance des expériences de compétition virale pour mettre en évidence des différences phénotypiques potentielles entre des souches virales proches génétiquement. En effet, *in vitro*, les expériences de mono-infection n'ont pas révélé de différences dans les taux de réplication des différentes chimères STR (*article 1*). Il est probable que, lors de mono-infections avec nos chimères STR chez le macaque rhésus, les différences dans les dynamiques de réplication virales soient inférieures à la variabilité inter-individuelle, observée selon les singes (Ling et al., 2002). Pour obtenir des résultats significatifs en mono-infection, il faudrait donc prévoir conceptuellement un nombre significatif de singes dans chaque groupe d'analyse. Ainsi, nous avons décidé de procéder à une analyse *in vivo* du phénotype des chimères STR, basée sur le principe de la compétition virale, dans un souci d'obtenir une réponse à la problématique scientifique posée et en infectant le minimum possible d'animaux. Nous avons donc co-infecté quatre singes avec les trois virus chimères (STR-B, STR-C et STR-E). Ainsi, comme dans toute expérience de compétition virale, si un virus devait mieux se répliquer dans un compartiment cellulaire donné, la compétition ne générerait pas l'apparition de ce phénotype, au contraire, elle ne pourrait que l'amplifier.

Il est évident que cette expérience de compétition virale *in vivo* est plus complexe à analyser que celle *in vitro* ou *ex vivo* car elle met en jeu une multitude de paramètres juxtaposés qui vont également être modifiés selon la cinétique de l'infection. Il est à noter que cette expérience de compétition virale est une des toutes premières à être réalisée *in vivo*. Deux équipes ont réalisé une expérience similaire *in vivo* en infectant des macaques rhésus avec deux souches de SHIV ayant un tropisme différent (X4 et R5). Ils ont cherché d'une part à comprendre les mécanismes qui favorisent la transmission et la réplication des virus de tropisme R5 sur ceux de tropisme X4 (Harouse et al., 2003), et d'autre part à étudier l'impact d'une molécule inhibitrice spécifique de CCR5 sur la réplication des virus de tropisme X4 dans le cadre de l'utilisation de cette molécule dans un traitement antirétroviral (Wolinsky et al., 2004). Ces études se sont focalisées sur l'impact du tropisme lié au polymorphisme de l'enveloppe virale sur la pathogenèse du VIH-1.

Le tropisme lié au polymorphisme du promoteur virale n'a jamais été abordé *in vivo* et dans un contexte de compétition virale. Il est donc très difficile de pouvoir comparer nos résultats avec des données déjà publiées. En effet, chez des patients, les cas d'infections d'une même personne par plusieurs souches de sous-types différents du VIH-1 n'ont pas conduit à l'étude des différences potentielles de dissémination et de compartimentation des différentes souches à l'intérieur du corps humain (Artenstein et al., 1995; Becker-Pergola et al., 2000; Grobler et al., 2004; Hu et al., 2005; Janini et al., 1996; Ramos et al., 2002). Ainsi, notre étude de l'influence du promoteur minimal/activateur des différents sous-types est une expérience pilote en la matière.

Quand la compétition est réalisée *in vivo*, des fluctuations temporelles marquées dans les cinétiques de réplication des chimères STR sont observées : dans le sérum, le virus STR-C domine en primo-infection dans les quatre animaux infectés (*articles 1 et 2*) et est ensuite supplanté par le STR-B post-séroconversion dans les deux animaux suivis sur huit mois (*article 1*). Les données obtenues dans le modèle animal montrent également qu'il existe une différence entre le génotype des virus associés aux rPBMCs (STR-B) et celui des virus libres dans le sérum (STR-C et STR-E) en primo-infection. Ainsi, le polymorphisme du promoteur des sous-types du VIH-1 constitue un déterminant majeur de la réplication et de la dissémination virale. L'analyse de la colonisation des organes suivant les phases de l'infection - primo-infection et phase asymptomatique - montre un phénotype différentiel marqué de la réplication virale, dépendant de l'environnement tissulaire dans lequel le virus se réplique.

Nous avons ainsi montré *in vivo*, en co-infectant 4 animaux avec les trois virus chimères, que le virus STR-C et dans une moindre mesure le STR-E prédominent en primo-infection dans le sérum. Nous pouvons en conséquence nous demander si ces données apportent une contribution à la compréhension de la pandémie actuelle. En effet, il a été montré que, bien que n'étant pas exclusive, une haute charge virale tend à corrélérer avec une transmission accrue chez des patients (Pilcher et al., 2004). Bien que brève, la primo-infection est caractérisée par une virémie très importante, ce qui suggère que la transmission de l'infection a plus de probabilité de se faire en primo-infection. Par conséquent, si la propagation de l'infection a lieu lors de la primo-infection, nous pouvons assumer que le STR-C sera alors le virus le plus transmis. Or, si nous regardons la pandémie actuelle, le VIH-1 C est le virus majoritaire, représentant environ 50% des cas d'infection à travers le monde (www.hiv.lanl.org).

Les données obtenues *in vivo* chez des patients corrélaient avec cette hypothèse. En comparant les paramètres immunologiques et virologiques de patients infectés par le VIH-1 E ou le VIH-1 B, il a été montré que, lors des trois premiers mois post-séroconversion - dans des temps proches de la primo-infection - la charge virale des patients infectés par le sous-type E est plus élevée que celle des patients infectés par le VIH-1 B (Hu et al., 2001). Par ailleurs, la charge virale ARN de patients infectés par le VIH-1 de sous-type C est plus élevée que celle de patients infectés par d'autres sous-types dans une cohorte de patients en Afrique (Neilson et al., 1999). De plus, dans une autre cohorte africaine, le risque de transmission de la mère à l'enfant semble plus élevé dans le cas d'une infection par le VIH-1 de sous-type C du fait notamment d'une charge virale plus élevée (Blackard et al., 2001; Renjifo et al., 2001). Toutes ces données semblent conforter l'idée de différences potentielles de transmission selon les sous-types, du fait d'une dynamique de réplication différente. Toutefois, nos données ne permettent pas de conclure sur la prédominance du VIH-1 C dans la pandémie actuelle étant donné qu'elles ne prennent en compte qu'un paramètre du polymorphisme des sous-types du VIH-1 : le promoteur minimal/activateur. En effet, d'autres éléments, tels que ceux influant sur l'entrée virale et la trans-activation, sont également impliqués dans la dynamique de la réplication virale (Ball et al., 2003; Rangel et al., 2003; Reza et al., 2003). Néanmoins, notre étude démontre un impact clair du promoteur sur la réplication virale en primo-infection, notamment dans un contexte de compétition virale.

Enfin, après séquençage, nous n'observons aucune recombinaison entre nos régions promotrices minimales/activatrices aussi bien *in vitro*, *ex vivo* qu'*in vivo*. Ceci montre qu'il existe une pression de sélection très forte sur cette courte région de U3 de 150 nucléotides, qui ne permet pas la recombinaison entre les génomes des chimères STR dans notre étude. La stabilité génomique des chimères STR souligne ainsi le fait que les résultats obtenus sont le reflet strict de l'impact du polymorphisme du promoteur de chaque sous-type sur sa réplication.

3) *Implication des cytokines sur la réplication virale via l'activation des facteurs de transcription cellulaires*

Quand l'expérience de compétition entre les trois chimères est réalisée dans des histocultures thymiques humaines, c'est-à-dire dans un environnement cellulaire riche notamment en IL-7, le STR-C prédomine dans le surnageant de culture (*articles 1 et 2*).

Cette expérience met en évidence le fait qu'une discordance entre le virus associé à la cellule (STR-B) et le virus libre nouvellement produit (STR-C) peut s'établir dans le même compartiment. Ces expériences de compétition virale *ex vivo* montrent que, comme dans le cas du VIH-1, les chimères STR ne peuvent pas se répliquer dans des histocultures thymiques en absence d'un enrichissement en IL-7. L'IL-7 garantit en effet la survie des thymocytes en culture en ralentissant le processus d'apoptose auquel ils sont sensibles. Toutefois, ces expériences montrent clairement que l'impact de l'IL-7 sur la réplication virale des trois chimères n'est pas équivalent, soulignant l'influence sélective de l'environnement cellulaire sur le phénotype viral.

La réplication active du STR-C dans les histocultures thymiques en présence d'IL-7 suggère que le polymorphisme des promoteurs au niveau des sites de fixation des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B pourrait être impliqué. En effet, lorsque les lymphocytes T sont stimulés par l'IL-7, les voies d'activation d'AP-1 et de NF- κ B sont favorisées et la fixation d'AP-1 sur son site de fixation est accrue (Gringhuis et al., 1997). De plus, il a été montré que la réplication du VIH-1 est régulée au niveau transcriptionnel par l'activité du NF- κ B suite à la production de TNF α , de l'IL-1 et de l'IL-7 par l'environnement thymique (Chene et al., 1999a; Chene et al., 1999b). Par ailleurs, le facteur de transcription NFAT, qui se fixe sur le site du facteur NF- κ B (Kinoshita et al., 1998), agit de manière synergique avec AP-1 si leurs sites de fixation sont juxtaposés, ce qui est le cas dans le promoteur minimal/activateur du STR-C (Macian et al., 2001). Dans un environnement riche en IL-7, cela pourrait être à l'origine de la prédominance du STR-C sur le STR-B, qui ne possède pas de site de fixation de AP-1, et sur le STR-E, qui présente un espacement d'environ 20 nucléotides entre le site AP-1 et son seul site NF- κ B.

Toutefois, il est extrêmement complexe de séparer les voies respectives menant à l'activation de AP-1, NF- κ B et NFAT pour déterminer quels paramètres conduisent à la production préférentielle du STR-C. Par exemple, le TNF α est bien connu pour induire aussi bien l'activation du facteur de transcription AP-1 que celle de NF- κ B (Natoli et al., 1997), le calcium celle des facteurs de transcription NFAT et AP-1 (Zhong et al., 2001), et la PHA peut conduire à l'activation des trois facteurs de transcription à la fois.

Ces données sont en accord avec celles obtenues par le groupe de Ben Berkhout qui a réalisé des expériences de compétition avec plusieurs virus isogéniques portant le promoteur minimal/activateur de différents sous-types du VIH-1 sur un fond génétique constant représenté par la souche virale VIH-1 B LAI (van Opijnen et al., 2004a). Dans six

environnements cellulaires variant suivant l'addition sélective de facteurs qui vont jouer sur l'ensemble nucléaire des facteurs de transcription cellulaires, comme le TNF α ou la PHA, cette équipe a mis en évidence *ex vivo* que l'environnement cellulaire change de manière drastique le "fitness" de chaque virus chimère.

En conclusion, le polymorphisme du promoteur est un élément qui influe de manière significative sur la réplication virale en fonction de l'environnement cellulaire et tissulaire dans lequel le VIH-1 se réplique.

B. Influence du polymorphisme sur la dynamique spatiale et temporelle

Dans le cadre de cette étude, nous avons co-infecté 4 macaques rhésus avec nos trois chimères STR (STR-B, STR-C et STR-E) en compétition. Deux singes ont été suivis sur 18 jours, quant à leurs paramètres d'infection et pour la répartition des chimères STR dans différents compartiments du corps, et ils ont été sacrifiés en primo-infection autour de leur pic de virémie (*article 2*). Les deux autres animaux ont été suivis sur huit mois de la même façon et sacrifiés en phase asymptomatique (*article 1*). Nous avons ainsi pu obtenir une image de la dynamique de la réplication et de la dissémination virale, selon les phases de l'infection, en utilisant le polymorphisme des promoteurs des chimères STR comme marqueur moléculaire. A partir de ces données, nous pouvons proposer un modèle de la dynamique spatiale et temporelle de la réplication virale.

Durant la primo-infection, le STR-C et dans une moindre mesure le STR-E sont prédominants dans le sérum, ils reflètent les virions circulants et donc produits récemment, car le temps de demi-vie des particules virales libres dans le sang est court (environ 6 heures) (Perelson et al., 1996). A l'opposé, le STR-B est prédominant dans les rPBMCs (*article 1 et 2*). Ainsi, les virus associés aux cellules et les virus libres montrent une compartimentation différentielle. Toutefois, dans les deux animaux suivis sur 8 mois, le STR-B est prédominant, dès deux mois post-infection, aussi bien dans le sérum que dans les rPBMCs (*article 1*).

L'expansion marquée du STR-C dans le sérum durant la primo-infection et son éclipse post-séroconversion, ainsi que la discordance entre les proportions des chimères STR entre les rPBMC et le sérum, posent la question de la source principale de production des virus présents dans le sérum en primo-infection.

La nature transitoire de la virémie du STR-C pourrait être due à une déplétion rapide du compartiment cellulaire, site de sa réplication. Par la suite, la dominance du STR-B

suggère que le compartiment qui supporte la réplication du STR-C en primo-infection n'a pas pu être reconstitué à un degré significatif après déplétion, ou a été reconstituée par des lymphocytes préalablement infectés dans le thymus par le STR-B. Le GALT, qui contient plus de 60% des LT CD4⁺ totaux, est un candidat potentiel pour soutenir avant sa déplétion une très forte réplication du STR-C. Ainsi, l'étude de macaques rhésus infectés par le VIS et de patients VIH⁺ en primo-infection a montré qu'une déplétion sévère en LT CD4⁺ a lieu dans les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT) (Li et al., 2005; Mehandru et al., 2004; Smit-McBride et al., 1998; Veazey et al., 1998) (cf. introduction, chapitre II.B). Les LT CD4⁺ sont presque entièrement et irréversiblement déplétés en l'espace de trois semaines post-infection. Cette déplétion des LT CD4⁺ du GALT intervient plus tôt et de manière plus drastique que celle dans le sang, les ganglions lymphatiques et la rate du fait de la forte présence de la cible préférentielle du virus, les LT CD4⁺ activés (Mattapallil et al., 2005; Veazey et al., 2000a). Par ailleurs, le GALT n'est jamais reconstitué lors de la phase asymptomatique (Brenchley et al., 2004; Veazey et al., 1998).

Lors du sacrifice des animaux, de nombreux tissus ont été analysés pour la répartition cellulaire des chimères STR. Ainsi à 18 jours post-infection, le STR-C est prédominant dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate) ainsi que dans certaines portions du GALT (*article 2*). Or, huit mois post-infection, dans ces organes, c'est cette fois-ci le STR-B qui prédomine (*article 1*). De plus, l'analyse de ganglions lymphatiques dès deux mois post-infection montre déjà le changement du STR-B sur le STR-C. Il est important de souligner que le STR-B est prédominant dans le thymus dès la primo-infection (tout comme dans les expériences d'infection d'histocultures thymiques *ex vivo*). La recolonisation de compartiments tissulaires peut par conséquent se faire avec des lymphocytes déjà infectés par le STR-B dans le thymus. Il n'est donc pas étonnant qu'au sacrifice des animaux huit mois post-infection, le STR-B prédomine dans tous les tissus.

A travers l'analyse des selles des animaux suivis sur 18 jours, nous avons pu mettre en évidence que le STR-C prédomine dans ces échantillons (*article 2*). Or, ceci est le reflet de la production virale ayant eu lieu dans le GALT (van der Hoek et al., 1996). Nous postulons donc que, dans les premières semaines suivant l'infection, la virémie plasmatique est la résultante d'une intense réplication virale ayant lieu dans le GALT. La réplication virale dans le GALT est certainement concomitante et également suivie par la réplication virale dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate). Ceci pourrait expliquer que la production virale du STR-C se prolonge pendant les deux premiers mois de l'infection, même si la déplétion intestinale a eu lieu dès les trois premières semaines suivant l'infection.