

Université de Montréal

Étude de la modulation de la cascade de l'interféron suite à  
l'infection par le VIH

Par

Élodie Martin

Département de Biologie Moléculaire  
Faculté des Études Supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du  
grade de la maîtrise en Biologie Moléculaire

Décembre 2005

©, Élodie Martin, 2005



QH  
506  
U54  
2006  
v.026

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude de la modulation de la cascade de l'interféron suite à  
l'infection par le VIH

Présenté par :  
Élodie Martin

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Muriel Aubry  
Président rapporteur

Dr Ali Ahmad  
Directeur de recherche

Dr Alexey Pshezhetsky  
Membre du jury

**RÉSUMÉ**

À ce jour, plus de 47 millions de personnes ont été infectées par le VIH. Notre première protection contre les virus dont le VIH est la cascade de l'interféron (IFN) qui fait partie de nos défenses immunitaires innées. Cependant, la capacité du VIH à établir une infection permanente témoigne de son habilité à court-circuiter nos défenses naturelles. Nous savons que dans la plupart des individus infectés, la cascade de l'interféron est défectueuse. Cependant, peu d'études ont examiné les effets de l'infection par le VIH sur la réponse par l'IFN. Nous avons décidé d'étudier les effets de l'infection par le VIH sur la cascade de l'interféron. Nos expériences sur des micro puces commerciales contenant 100 gènes impliqués dans la cascade de l'IFN ont révélé que l'infection par le VIH mène à la diminution de l'expression de 5 gènes et l'activation de 32 gènes. H19, un gène impliqué dans l'inhibition de la croissance induite par l'IFN est réprimé par l'infection, et les gènes SOCS1 et SOCS3, des inhibiteurs de la signalisation des cytokines, sont activés. Le VIH active plusieurs autres gènes impliqués dans la résistance à l'IFN et dans la propagation du virus des cellules dendritiques aux lymphocytes T. De plus, nous avons déterminé que la transfection des cellules par le plasmide NL3.4, contenant le génome complet du VIH, mène à une diminution de l'expression des gènes de l'IFN- $\alpha$  et de l'IFN- $\beta$  ainsi que du gène PML qui a des propriétés antivirales. Ces résultats démontrent la capacité du VIH à moduler la réponse antivirale afin d'y échapper. Des études approfondies pour déterminer les mécanismes utilisés par le virus nous permettraient de mettre au point des thérapies qui complémenteraient la cascade de l'IFN là où elle est perturbée par le virus.

Mots clés : VIH, Cascade de l'interféron, Réponse antivirale, Évasion de la réponse immunitaire.

**ABSTRACT**

To this day, the HIV virus has infected over 43 million people worldwide. Our immune defences against viruses and pathogens are initiated by the interferon (IFN) pathway. However, the ability of HIV to establish persistent infection in hosts is an indicator of its capacity to counter our innate defences. We know that in most infected individuals, the IFN pathway is defective. However, few studies have ever examined the effects of HIV on the IFN responses in the host cells. Therefore, we decided to study the effects of HIV infection on the expression of specific genes associated with the interferon response. We used commercially available microarrays with 100 genes implicated in the IFN response and demonstrated that HIV infection induces the up-regulation of 32 genes and the down-regulation of 5 genes (more than 2 fold). One of the down-regulated genes is H19, a gene associated with interferon-induced growth inhibition, and two of the up-regulated genes are the suppression of cytokine signalling genes SOCS1 and SOCS3. HIV also activated the transcription of several other genes involved in interferon resistance and the propagation of the virus from dendritic cells to T lymphocytes. We also determined the effects of the transfection of the NL3.4 plasmid containing the HIV genome into a human T cell line. We found that plasmid transfected cells exhibit a down-regulation of the IFN- $\alpha$  and IFN- $\beta$  genes as well of the PML genes, which is known to have antiviral functions. Our results demonstrate the ability of HIV to modulate the interferon pathway in order to counter our natural defences. Further study of the mechanisms used by the virus could lead the therapies specifically geared to complement the components of the interferon pathway that are suppressed by HIV.

Key words: HIV, Antiviral response, Immune evasion, Interferon pathway.

**TABLE DES MATIÈRES**

|   |      |
|---|------|
| RÉSUMÉ .....                                      | iii  |
| ABSTRACT .....                                    | v    |
| TABLE DES MATIÈRES .....                          | vii  |
| Liste des tableaux.....                           | xi   |
| Liste des figures.....                            | xiii |
| Liste des abréviations .....                      | xv   |
| DÉDICACES .....                                   | xxi  |
| INTRODUCTION .....                                | 1    |
| I. PROBLÉMATIQUE : .....                          | 2    |
| II. LE VIH.....                                   | 4    |
| II. 1 : La structure du VIH : .....               | 5    |
| II.1.1 : Le virus : .....                         | 5    |
| II.1.2 : Le génome viral : .....                  | 6    |
| II.1.3: Les protéines virales:.....               | 6    |
| II. 2. La pathogénèse:.....                       | 11   |
| II.2.1 : Cycle viral du VIH :.....                | 12   |
| II.2.2 : La progression de la maladie.....        | 14   |
| II.2.3. La réponse immunitaire au virus :.....    | 16   |
| II. 3 : Le traitement: .....                      | 18   |
| III. LES INTERFÉRONS : .....                      | 20   |
| III.1. La production de l'IFN : .....             | 21   |
| III.1.1. Les cellules qui produisent l'IFN :..... | 21   |

|  |    |
|--|----|
| III. 1.2. L'initiation de la cascade de l'IFN: .....                               | 22 |
| III. 2. Le récepteur à l'IFN, l'IFNAR .....  | 27 |
| III. 3. 1. Les facteurs de transcription impliqués dans la réponse antivirale..... | 31 |
| III. 3. 2. Les acteurs de la réponse antivirale : .....                            | 36 |
| IV. LE VIH ET LES INTERFÉRONES: .....  | 39 |
| IV. 1. Les effets de l'infection sur les patients .....                            | 39 |
| IV.1.1. Les effets de l'infection sur la production d'IFN chez les patients .....  | 39 |
| IV. 1. 2. Effets de l'infection sur les IPC.....                                   | 40 |
| IV. 2. Les effets de l'IFN sur les cellules infectées. ....                        | 43 |
| IV. 3. L'IFN et le traitement de l'infection par le VIH chez les patients. ....    | 44 |
| MATÉRIELS ET MÉTHODES: .....   | 52 |
| I. Culture cellulaire:.....  | 53 |
| II. Isolation des PBMC .....   | 54 |
| III. Identification et propagation des plasmides.....                              | 54 |
| IV. Miniprep ou Lyse et extraction de plasmide par lyse alcaline.....              | 56 |
| V. Transfection .....  | 57 |
| VI. Immunobuvardage (Western blot) .....   | 57 |
| VII. Extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires : .....                 | 60 |
| VIII. Anticorps utilisés. ....   | 60 |
| IX. Production du virus Sendai .....   | 61 |
| X. Production du VIH : .....   | 62 |
| XI. Infection par le virus Sendai. ....  | 62 |
| XII. Infection par le virus HIV-1.....   | 62 |

|   |     |
|---|-----|
| XIII. Traitement des cellules avec le poly (I; C) .....                   | 63  |
| XIV. Extraction de l'ARN total .....                                      | 63  |
| XV. Production de la sonde radioactive .....                              | 64  |
| XVI. Hybridation de la sonde à la membrane, numérisation et analyse ..... | 64  |
| RÉSULTATS: .....  | 65  |
| DISCUSSION .....  | 83  |
| CONCLUSIONS .....   | 100 |
| BIBLIOGRAPHIE .....   | 103 |
| ANNEXES .....   | 132 |
| ANNEXE 1 : LISTE DES GÈNES ET PLAN DE LA MICRO PUCE .....                 | II  |
| ANNEXE 2: RECETTES DES SOLUTIONS UTILISÉES. ....                          | VII |

**LISTE DES TABLEAUX**

|   |    |
|---|----|
| Tableau 1 : Interférons humains et les emplacements de leurs gènes.....                         | 21 |
| Tableau 2 : Les TLR et leurs ligands PAMP viraux.....   | 25 |
| Tableau 3 : Les différents facteurs de transcription et les séquences auxquelles ils se lient.. | 32 |
| Tableau 4: Liste des gènes modulés suite à l'infection par le VIH. ....                         | 80 |
| Tableau 5 : Liste des gènes modulés par la transfection du plasmide NL3.4.....                  | 82 |

**LISTE DES FIGURES**

|   |    |
|---|----|
| Figure 1 : Représentation schématique de la particule virale du VIH-1 .....           | 7  |
| Figure 2 : Représentation schématique de la structure du génome viral. ....           | 8  |
| Figure 3 : L'induction de l'IFN par les virus.....                                    | 23 |
| Figure 4 : La cascade de signalisation de l'IFN via le IRFAR. ....                    | 29 |
| Figure 5 : Structure de base des IRF.....   | 33 |
| Figure 6 : Activation de IRF-3 induite par le virus Sendai.....                       | 67 |
| Figure 7 : Activation de IRF-7 induite par le virus Sendai.....                       | 68 |
| Figure 8: Activation de IRF-3 avec le Poly (I: C): .....                              | 69 |
| Figure 9 : Comparaison d'un anticorps monoclonal avec un anticorps polyclonal.....    | 70 |
| Figure 10 : Activation d'IRF-3 avec du SeV fraîchement préparé.....                   | 72 |
| Figure 11 : Optimisation des conditions de transfection de p-Flag-IRF-3 .....         | 73 |
| Figure 12 : Effets du virus Sendai et du poly (I; C) sur l'activation de IRF-3. ....  | 74 |
| Figure 13 : Effets de la concentration des cellules sur IRF-3.....                    | 75 |
| Figure 14 : Prolongation du temps d'incubation avec le virus Sendai .....             | 76 |
| Figure 15 : Effets de la concentration de sérum sur la phosphorylation de IRF-3 ..... | 78 |

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

|              |   |
|--------------|---|
| <b>aa</b>    | Acide aminé   |
| <b>Ac</b>    | Anticorps   |
| <b>ADAR</b>  | <i>Double stranded RNA- specific adenosine deaminase protein</i> , adénosine désaminase spécifique à l'ARN à double brins |
| <b>ADCC</b>  | <i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> , cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps                        |
| <b>ADN</b>   | Acide désoxyribonucléique   |
| <b>ADNc</b>  | ADN complémentaire  |
| <b>AMP</b>   | Adénosine mono phosphate  |
| <b>AP-1</b>  | <i>Activating protein 1</i> , protéine activatrice 1  |
| <b>ARN</b>   | Acide ribonucléique   |
| <b>ARNdb</b> | ARN à double brin   |
| <b>ARNm</b>  | ARN messenger   |
| <b>ARNsb</b> | ARN à simple brin   |
| <b>ATF</b>   | <i>Activating transcription factor</i> , facteur de transcription activateur  |
| <b>ATP</b>   | Adénosine triphosphate  |
| <b>BMDC</b>  | <i>Bone marrow derived dendritic cells</i> , cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse                          |
| <b>bZIP</b>  | <i>Basic region leucine zipper protein</i> , protéine à région « zipper » basique   |
| <b>CARD</b>  | <i>Caspase recruitment domain</i> , domaine de recrutement des caspases   |
| <b>CBP</b>   | <i>CREB binding factor</i> , facteur de liaison au CREB (voir CREB)   |
| <b>CMV</b>   | Cytomégalovirus   |

|                |   |
|----------------|---|
| <b>CRE</b>     | <i>Cyclic AMP responsive element</i> , élément réactif à l'AMP cyclique   |
| <b>CREB</b>    | <i>Cyclic AMP-response element binding protein</i> , protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMP cyclique                              |
| <b>DMEM</b>    | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , milieu de culture Eagle modifié par Dulbecco.   |
| <b>DC-SIGN</b> | <i>Dendritic Cell-Specific ICAM-3 grabbing non-integrin</i> , lectine de surface non-intégrine des cellules dendritiques qui se lie à ICAM-3. |
| <b>EDTA</b>    | <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Acide éthylènediaminetétra acétique  |
| <b>eIF2</b>    | <i>Eukaryotic translation initiation factor 2</i> , facteur d'initiation eucaryotique 2.  |
| <b>GAS</b>     | <i>Gamma-interferon activated sites</i> , sites d'activation par l'IFN gamma.   |
| <b>GCSF</b>    | <i>Granulocyte colony stimulating factor</i> , facteur de stimulation de colonies des granulocytes.   |
| <b>GDP</b>     | Guanosine diphosphate   |
| <b>GTP</b>     | Guanosine triphosphate  |
| <b>HA</b>      | Hæmagglutinine  |
| <b>HCV</b>     | <i>Hepatitis C virus</i> , virus de l'hépatite C  |
| <b>HHV8</b>    | <i>Human herpes virus 8</i> , virus de l'herpès humain 8  |
| <b>HSV</b>     | <i>Herpes simplex virus</i> , virus de l'herpès simplex.  |
| <b>IFN</b>     | Interféron  |
| <b>IFNAR</b>   | Récepteur à l'interféron de type 1  |
| <b>IKK</b>     | <i>IκB kinase</i> , kinase de l'IκB   |
| <b>IL</b>      | Interleukine  |
| <b>IP-10</b>   | <i>IFN-gamma inducible protein-10</i> , protéine inductible par l'IFN-gamma   |
| <b>IPC</b>     | <i>Interferon producing cells</i> , cellules productrices d'interféron.   |

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>IRAK</b>                    | <i>IL-1R associated kinase</i> , kinase associée au récepteur à l'IL-1.                              |
| <b>IRF</b>                     | <i>Interferon regulatory factor</i> , facteur régulateur des interférons                             |
| <b>ISG</b>                     | <i>Interferon stimulated gene</i> , gènes stimulés par l'interféron                                  |
| <b>ISGF3</b>                   | <i>Interferon stimulated gene factor-3</i> , facteur génétique stimulé par l'IFN 3                   |
| <b>ISRE</b>                    | <i>Interferon stimulated responsive element</i> , élément de réponse stimulé par l'IFN               |
| <b>JAK</b>                     | <i>Janus family of tyrosine kinases</i> , famille Janus des kinases de tyrosines                     |
| <b>JNK</b>                     | <i>c-Jun kinase</i> , kinase de c-Jun  |
| <b>Kb</b>                      | Kilo bases   |
| <b>kDa</b>                     | KiloDaltons  |
| <b>LTR</b>                     | <i>Long terminal repeats</i> , longues répétitions terminales  |
| <b>MAPK</b>                    | <i>Mitogen activated protein kinase</i> , kinase de MAP  |
| <b>MDA5</b>                    | <i>Melanoma differentiation associated gene 5</i> , gène associé à la différenciation du mélanome 5. |
| <b>MMTV</b>                    | <i>Mouse mammary tumour virus</i> , virus de tumeurs mammaires de la souris                          |
| <b>MyD88</b>                   | <i>Myeloid differentiation factor 88</i> , facteur de différenciation myéloïde 88.                   |
| <b>NCR</b>                     | <i>Natural cytotoxicity receptors</i> , récepteurs de cytotoxicité naturelle.                        |
| <b>NF-<math>\kappa</math>B</b> | <i>Nuclear factor <math>\kappa</math>B</i> , facteur nucléaire $\kappa$ B                            |
| <b>NK cells</b>                | <i>Natural killer cells</i> , cellules tueuses naturelles  |
| <b>NPLT</b>                    | Non progresser à long terme  |
| <b>OAS</b>                     | Oligoadenylate synthétase  |
| <b>PAMP</b>                    | <i>Pathogen associated molecular pattern</i> , motif moléculaire associé à un pathogène              |
| <b>PBL</b>                     | <i>Peripheral blood lymphocytes</i> , lymphocytes du sang périphérique.                              |
| <b>Pb</b>                      | Paire de bases   |

|               |  |
|---------------|--|
| <b>PBMC</b>   | <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , cellules mononuclées du sang périphérique  |
| <b>pDC</b>    | <i>Plasmacytoid precursor dendritic cells</i> , précurseurs de cellules dendritiques<br>plasmocytaires   |
| <b>PI3K</b>   | <i>Phosphatidyl Inositol-3 kinase</i> , kinase de l'inositole phosphatidyle-3  |
| <b>PKR</b>    | <i>RNA dependent protein kinase R</i> , kinase protéique R dépendante sur l'ARN  |
| <b>PRD</b>    | <i>Positive regulatory domain</i> , domaine de régulation positive   |
| <b>PRD-LE</b> | <i>PRD-like element</i> , élément semblable à PRD  |
| <b>PRR</b>    | <i>Pattern recognition receptors</i> , récepteurs d'identification de motifs   |
| <b>RE</b>     | Réticulum endoplasmique  |
| <b>RIG-1</b>  | <i>Retinoic acid inducible gene 1</i> , gène inductible à l'acide rétinoïde 1  |
| <b>RIP</b>    | <i>Receptor interacting proteins</i> , protéines interagissant avec le récepteur.  |
| <b>RNP</b>    | <i>Ribonucleoprotein</i> , ribonucléoprotéines   |
| <b>RPMI</b>   | <i>Roswell Park Memorial Institute cell growth medium</i> , milieu de culture cellulaire<br>développé au Roswell Park Memorial Institute         |
| <b>RSV</b>    | <i>Respiratory syncytial virus</i> , virus syncytial respiratoire  |
| <b>SEN</b>    | Signal d'export nucléaire  |
| <b>SLN</b>    | Signal de localisation nucléaire   |
| <b>STAT</b>   | <i>Signal transducers and activators of transduction</i> , activateur de transcription et<br>transducteur de signaux                             |
| <b>TANK</b>   | <i>TRAF family member associated NF-<math>\kappa</math>B activator</i> , activateur du NF- $\kappa$ B associé aux<br>membres de la famille TRAF. |
| <b>TBK</b>    | <i>TANK binding kinase</i> , kinase de liaison à TANK  |
| <b>TIR 1</b>  | <i>Toll-Interleukin-1 receptor domain</i> , domaine de Toll et récepteur de l'interleukine 1   |

|             |   |
|-------------|---|
| <b>TLR</b>  | <i>Toll-like receptor</i> , récepteur semblable à Toll  |
| <b>TNF</b>  | <i>Tumor necrosis factor</i> , facteur de nécrose des tumeurs   |
| <b>TRAF</b> | <i>TNF receptor-associated factor</i> , facteur associé au récepteur du TNF   |
| <b>TRIF</b> | <i>Toll/IL1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-<math>\beta</math></i> , adaptateur inducteur de IFN- $\beta$ comprenant un domaine de récepteur Toll/IL1 |
| <b>VIH</b>  | Virus de l'immunodéficience humaine   |
| <b>VISA</b> | <i>Virus induced signaling adaptor</i> , adaptateur de signalisation induit par les virus.  |
| <b>VSV</b>  | <i>Vesicular stomatitis virus</i> , virus vésiculaire de la stomatite   |

## DÉDICACES

À

*Mon père, qui m'a toujours encouragée à réaliser mon propre potentiel,*

*Ma mère, pour son soutien inconditionnel,*

*Sandy, pour m'avoir toujours montré le chemin,*

*Anaïs, pour m'avoir aidé à garder les choses en perspective,*

*Et à Peter, pour son soutien, son encouragement, sa patience et son amour.*

REMERCIEMENTS

*J'aimerais remercier tout d'abord mon directeur de recherche, Dr Ali Ahmad, pour sa confiance et ses conseils et de m'avoir fourni cette merveilleuse opportunité dans son laboratoire.*

*J'aimerais également remercier Dr Lynda Habiba Attalah pour la correction de mon manuscrit, ainsi que tous les membres de mon laboratoire : Olfa Debbeche, Alexandre Ianello et Suzanne Samarani pour leur aide. Je remercie également le Dr José Menezes et les membres de son laboratoire : Paulo Cordeiro, Dr R'Kia Dardari, Jamila Ennaciri, Emilie Charrier, Annie Michaud.*

*Je remercie très sincèrement tout le personnel du centre de recherche du CHU Sainte Justine, ainsi que Mme Vivianne Jodoin du programme de Biologie Moléculaire de l'Université de Montréal, pour toute sa patience et son aide.*

*Je souhaite aussi remercier les membres de mon jury : Dr Muriel Aubry et Dr Alexey Pshezhetsky d'avoir pris le temps de lire et d'apporter des critiques pertinentes à ce travail de recherche.*

**INTRODUCTION**

## I. PROBLÉMATIQUE :

Le virus de l'immunodéficience humaine est l'agent étiologique du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise). Ce dernier entraîne, soit directement, soit indirectement, la destruction des cellules lymphocytaires, ce qui à son tour suscite une déficience d'une partie du système immunitaire. Ceci mène ensuite à une augmentation de la susceptibilité aux infections par des agents normalement peu dangereux chez les personnes en bonne santé (maladies appelés "opportunistes"), ou encore à des cancers rares comme le sarcome de Kaposi. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, (WHO), plus de 40 millions de personnes vivent présentement avec le VIH. En 2005, plus de 4.9 millions de personnes ont été infectées et 3.1 millions de personnes sont mortes du SIDA. Aucun traitement n'est disponible pour l'instant et aucun vaccin efficace n'a toujours pas été mis au point. La prévention demeure très difficile et va souvent à l'encontre de la culture des pays les plus affectés.

La meilleure défense naturelle contre les virus est la réponse antivirale, qui dépend de la cascade de l'interféron (IFN). Cette cascade est mise en route dès la détection de molécules virales et une fois activée, elle peut limiter la réplication, prolifération et transmission du virus à d'autres cellules de l'organisme.

Nous savons déjà que de nombreux virus arrivent à déjouer cette défense antivirale. Cependant, en connaissant le mode d'action du virus contre la réponse antivirale, il est parfois possible de renforcer le système immunitaire de façon à contrer les défenses du virus. Par exemple, le virus de l'hépatite C (HCV) inhibe l'initiation de la cascade de l'IFN et bloque ainsi la production d'IFN- $\alpha$ . Un des traitements les plus utilisés contre l'infection par le HCV implique la prise d'IFN- $\alpha$  synthétique.

Bien qu'on sache que le VIH perturbe le fonctionnement de cette défense naturelle, le mode d'action du VIH contre la réponse antivirale de la cellule n'est toujours pas connu. Dans mon stage de maîtrise, mon objectif était de tenter d'élucider l'effet de l'infection par le VIH sur les composantes de la cascade de l'IFN.

Je vais dans un premier temps mettre en revue la littérature sur ce qui est déjà connu sur le VIH, sur la cascade des interférons et ensuite sur l'interaction entre la cascade de l'IFN et le VIH. Et dans un deuxième temps, je vais présenter ma démarche d'expérimentation et les résultats que j'ai pu obtenir.

## II. LE VIH

Le virus d'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent responsable pour le développement du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Actuellement, plus de 33 millions de personnes, adultes et enfants, vivent avec le VIH/SIDA et plus de 47 millions ont été infectés depuis le début de la pandémie. En l'an 2000, environ 300 000 personnes sont décédées des suites de leur infection, et 5.3 millions de personnes ont contracté le virus selon l'organisation mondiale sur la santé (WHO). Le virus se propage principalement par l'intermédiaire de rapports sexuels, par le partage de seringues souillées et par la transmission de la mère à l'enfant pendant la grossesse et l'accouchement. La transmission par le biais des transfusions sanguines est rare depuis l'introduction du dépistage de routine dans les pays développés, mais se produit toujours dans les pays en voie de développement.

L'infection par le VIH se caractérise par une maladie du système immunitaire. Il y a une diminution progressive du nombre de lymphocytes T CD4+, menant à l'immunosuppression et à la susceptibilité aux infections opportunistes et aux cancers. En période initiale, la maladie se présente souvent sous la forme d'une fièvre avec symptômes glandulaires. Ensuite, la maladie entre en période de latence pendant laquelle le virus infecte et détruit les lymphocytes T CD4+, qui sont normalement responsables de la coordination des réponses du système immunitaire. Cette étape crée un environnement favorable à la réplication du virus. C'est cette destruction progressive du système immunitaire qui mène à l'étape du SIDA. Sans un système immunitaire fonctionnel, les patients sont sujets à une grande variété de maladies infectieuses et de néoplasies, menant à la mort. Le nombre de personnes infectées ne cesse d'augmenter et il n'y a aucun traitement connu actuellement apte à guérir les personnes

infectées. Actuellement, les médicaments disponibles peuvent prolonger la durée de vie des individus infectés mais aucun remède n'est en vue. De plus, la conception d'un vaccin efficace et sécuritaire est encore très loin. La seule façon de contrôler la progression du VIH est la prévention, ce qui nécessite de l'éducation. D'où l'importance de progresser dans nos connaissances sur l'aspect moléculaire de l'infection virale et de multiplier nos outils diagnostiques et thérapeutiques pour la prévention ainsi que le traitement de cette infection.

## II. 1 : La structure du VIH :

### II.1.1 : Le virus :

Le VIH est un rétrovirus, membre de la famille des Lentivirinae. Il comporte une enveloppe et une capsid cylindrique dense contenant deux brins identiques d'ARN simples. Une représentation schématique d'une particule virale est illustrée dans la Figure 1. Lors de l'infection, l'ARN est transcrit inversement en ADN par une enzyme «reverse transcriptase» puis l'ADN est intégré au génome de la cellule hôte (mis en revue dans (Sierra et al., 2005)). Une particule de VIH complet comprend trois protéines principales :

1. L'enveloppe : les protéines de l'enveloppe sont associées à la couche bilipidique qui entoure le virus et sont le produit des gènes *env* du génome du virus. Tandis que la couche bilipidique de l'enveloppe provient de la membrane cellulaire de la cellule hôte lors du bourgeonnement du virus, elle est parsemée de glycoprotéines virales (gp) telles que gp120 ou gp 41. gp41 traverse l'enveloppe et est associée à gp120 de façon non covalente en formant des trimères. Le virus se sert de ces glycoprotéines pour identifier les récepteurs sur les cellules cibles (tels que les cellules T CD4+) qui permettront l'attachement et l'entrée du virus dans la cellule (Cantin et al., 2005; Paranjape, 2005).

2. La capsid : ces protéines forment le noyau du virus (telles que la protéine de capsid p24, et la protéine de matrice p18). Elles sont le produit des gènes *gag* du génome et servent à protéger le génome (Morikawa, 2003).
3. La polymérase : Ces protéines sont indispensables pour la transcription inverse de l'ARN en ADN par les transcriptases inverses et pour la formation de nouvelles particules virales. Elles sont le produit des gènes *pol* du génome du virus.

### II.1.2 : Le génome viral :

La forme intégrée du virus, aussi appelée le provirus mesure à peu près 9.8 kilo bases (Kb) et aux deux extrémités se trouvent de longues répétitions terminales (LTR). La structure du génome viral est schématisée dans la Figure 2. Les gènes viraux se trouvent dans la région centrale du provirus et codent pour 9 protéines. Ces protéines se divisent en trois classes :

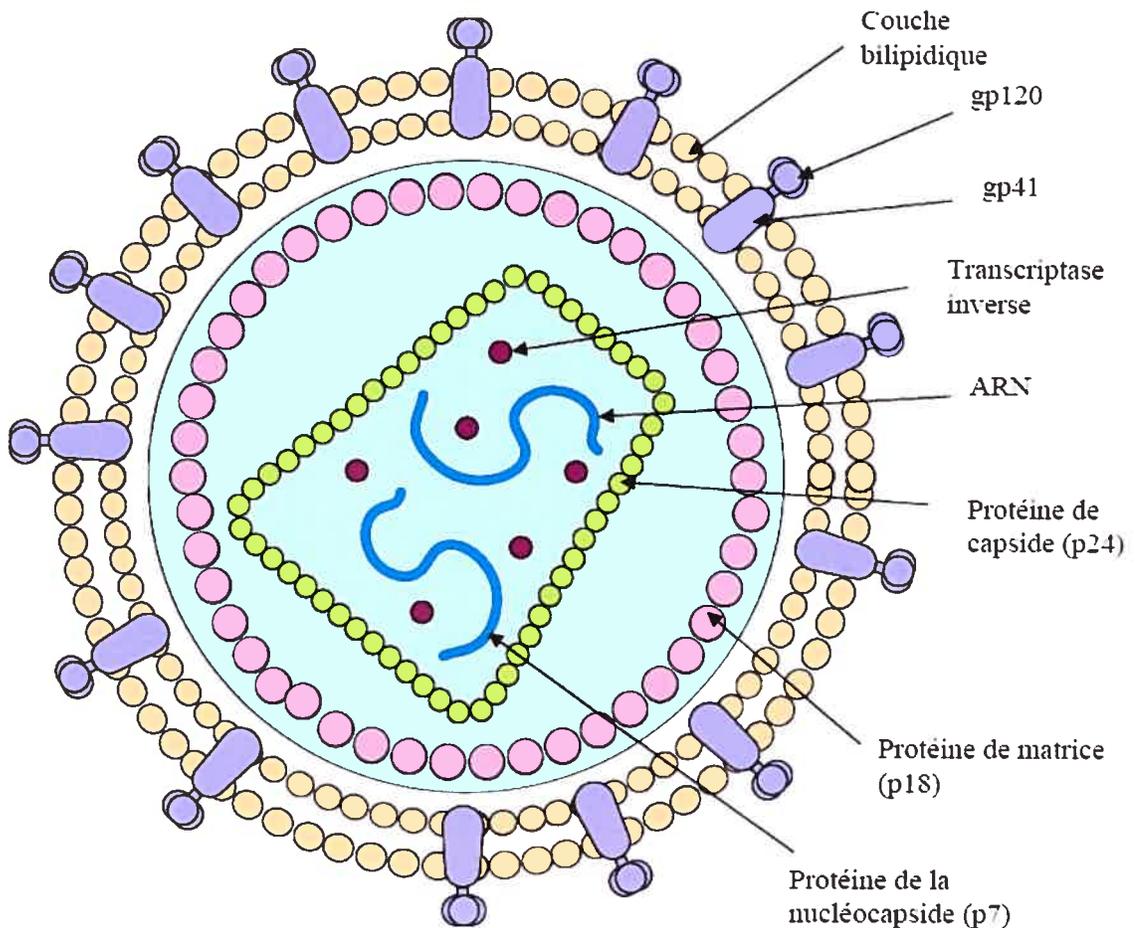
1. Les protéines structurelles majeures (Gag, composée de p17, p24, p9 et p6; Pol, composée de p15, p50, p10 et p31; et Env, composée de gp 120 et gp 41)
2. Les protéines régulatrices (Tat, Rev)
3. Les protéines accessoires (Vpu, Vpr, Vif, Nef)

### II.1.3: Les protéines virales:

- Gag : Les protéines Gag qui dirigent l'emballage du génome du VIH permettant la formation de nouveaux virions infectieux (D'Souza and Summers, 2005). Elles sont tout d'abord exprimées comme une protéine précurseur de 55 kDa qui est ensuite clivée par la protéase en quatre protéines : la protéine de matrice MA (p17) qui stabilise la particule virale (Gallay et al., 1995), la protéine de la capsid CA (p24)

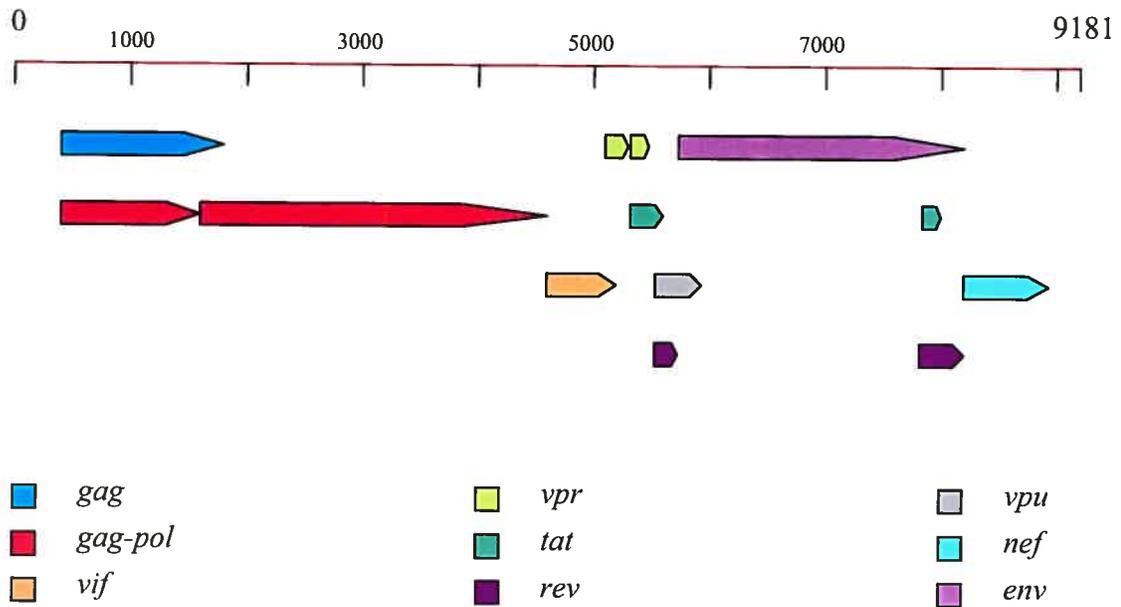
qui forme le noyau conique du virus (Thali et al., 1994), la protéine de la nucléocapside NC (p9) qui reconnaît le signal d'encapsulation du VIH (Harrison and Lever, 1992) et qui facilite la transcription inverse (Lapadat-Tapolsky et al., 1993), et p6.

**Figure 1 :** Représentation schématique de la particule virale du VIH-1.



La particule virale est recouverte de glycoprotéines gp41 et gp120 parsemées sur la membrane qui provient de la cellule hôte. À l'intérieur se trouve le noyau du virus, composé de p18 et de p24 dans lequel se trouvent la transcriptase inverse et les deux brins d'ARN génomique.

**Figure 2 : Représentation schématique de la structure du génome viral.**



Les neuf gènes viraux du VIH-1 sont représentés par des flèches de couleurs différentes. La longueur et l'emplacement des flèches sont représentatifs de l'emplacement et de la taille des gènes dans le génome viral. Les emplacements de certains gènes se chevauchent et diffèrent au niveau du cadre de lecture.

- **Pol** : La protéase virale, l'intégrase, l'ARNase H et la transcriptase inverse sont exprimés sous la forme d'une protéine de fusion Gag-Pol. Lors de la maturation, la protéase sépare le polypeptide Pol de Gag et sépare les quatre peptides : la protéase (p10), la transcriptase inverse RT (p50), l'ARNase H (p15), et l'intégrase (p31) (Jacks et al., 1988). La RT transforme l'ARN à simple brin en ADN à double brin. La protéase clive les polypeptides en protéines actives. L'intégrase permet l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte (Gottlinger et al., 1989).
- **Env** : La protéine Env est d'abord exprimée comme une protéine de 160 kDa qui est ensuite clivée par une protéase cellulaire en gp120 et gp41. gp41 contient le domaine

transmembranaire de Env, alors que gp120 se retrouve à la surface des cellules infectées associée à gp41 de façon non covalente. Env forme des multimères (possiblement des trimères) (Bernstein et al., 1995) à la surface de la cellule et des virions, et gp120 interagit avec le récepteur CD4 (Capon and Ward, 1991).

- Tat : La protéine Tat est un transactivateur transcriptionnel essentiel pour la réplication du VIH (Ruben et al., 1989). Contrairement aux facteurs de transcriptions traditionnels, Tat se lie à l'ARN, et non à l'ADN (Roy et al., 1990). Son action exacte au moment de la réplication n'est pas entièrement élucidée mais on pense qu'elle prolonge l'étape d'élongation de la transcription du VIH (Feinberg et al., 1991), et qu'elle est impliquée dans la phosphorylation de l'ARN polymérase (Parada and Roeder, 1996).
- Rev : La protéine Rev se lie spécifiquement à l'ARN (Zapp and Green, 1989) et induit la transition vers la phase tardive de l'expression des gènes (Kim et al., 1989). Rev est encodé par deux exons et s'accumule dans le noyau des cellules infectées. Rev se lie à une région secondaire complexe d'ARN de 240 pb appelée l'élément de réponse Rev (RRE) qui se trouve à l'intérieur du deuxième intron du VIH (Malim et al., 1989). Cette liaison de Rev avec le RRE facilite l'export d'ARN viral non épissé ou partiellement épissé du noyau vers le cytoplasme, ce qui constitue un mécanisme d'autorégulation car l'ARN exporté ne peut être épissé et traduit en protéine (Felber et al., 1990).
- Nef : ce gène code une protéine de 27 kDa. Bien que son importance était mal comprise lors de sa découverte, on sait maintenant que c'est une des protéines les plus importantes pour le cycle viral. Nef établit l'environnement nécessaire à la réplication et facilite la progression de la maladie. Nef assiste la transcription virale de Tat en

activant la production de facteurs de transcription chez l'hôte (Miller et al., 1994) (Joseph et al., 2005). Il joue un rôle important dans l'évasion de la réponse immunitaire antivirale humorale en diminuant l'expression de CD4 et du MHC classe I A et B en surface des cellules infectées (Garcia and Miller, 1992), (Luria et al., 1991). De plus, Nef est la première protéine virale à s'accumuler dans la cellule à des niveaux détectables (Kim et al., 1989).

- Vif : Vif est un polypeptide de 23 kDa essentiel pour la réplication du VIH dans les lymphocytes du sang périphérique, les macrophages et certaines lignées cellulaires (Strebel et al., 1987). Vif peut aider d'autres protéines à plier correctement l'ARN génomique afin de faciliter l'empaquetage et la transcription inverse. En se liant à l'ARN viral, Vif peut aussi le protéger des effets antiviraux de la protéine désaminase APOBEC-3G /3F (Henriet et al., 2005).
- Vpr : Vpr est incorporé dans les particules virales et permet l'infection de cellules qui ne sont pas en division en facilitant le transport du complexe de préintégration vers le noyau (Heinzinger et al., 1994). Il peut aussi bloquer la division cellulaire en phase G2/M (Jowett et al., 1995; Rogel et al., 1995).
- Vpu : Le polypeptide Vpu de 16kDa est une phosphoprotéine intégrale qui se trouve principalement sur les membranes internes de la cellule (Sato et al., 1990). Dans les cellules infectées, il se forme des complexes entre le récepteur viral, CD4, et la protéine Env, au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Ces complexes CD4-Env séquestrent ces deux protéines au RE et interfèrent avec l'assemblage des virions. Vpu libère l'enveloppe en dégradant les molécules CD4 complexées avec Env (Willey et al., 1992). Vpu peut aussi augmenter le relâchement du VIH de la surface de la cellule infectée (Klimkait et al., 1990; Schubert et al., 1996).

## II. 2. La pathogénèse:

La pathogénèse du SIDA est complexe et multifactorielle. Suite à l'infection primaire et à la diffusion rapide du virus aux lymphocytes, la réplication virale est inhibée par une réponse immunitaire humorale et cellulaire robuste et spécifique au VIH. Lorsque le virus échappe au contrôle immunitaire, une maladie chronique et progressive s'installe, caractérisée par la destruction du système immunitaire. Chez les patients non traités, la mortalité est très élevée pendant les dix premières années (Wei et al., 2003). La vulnérabilité à l'infection par le VIH est différente selon les individus et n'est pas constante dans le temps. Elle est influencée par le bagage génétique, les taux de sécrétion de différentes cytokines, les quantités relatives de différents types de cellules, le taux d'activation cellulaire ainsi que la quantité de récepteurs de cytokines à leur surface. Les récepteurs de cytokines servent au virus de corécepteurs nécessaires pour l'entrée du VIH dans la cellule.

La charge virale du plasma atteint un équilibre environ 6 mois après l'infection initiale. Les facteurs majeurs qui contrôlent la réplication virale lors de la maladie chronique sont les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques et les cytokines inhibitrices. Étant donné que la charge virale du plasma est proportionnelle au dysfonctionnement immunologique causé par le virus, et à la capacité des mécanismes immunorégulateurs à corriger ce dysfonctionnement, c'est un indice du stade de la progression de la maladie.

La présence de virémie pendant la phase clinique de la latence indique que la réplication virale n'est que partiellement contrôlée après l'infection et la séroconversion. Ceci explique l'importance d'offrir la thérapie antivirale le plus tôt possible.

Le virus cible prioritairement et détruit les globules blancs, spécifiquement les lymphocytes T CD4+ « helper-inducer » qui sont indispensables au fonctionnement normal du système immunitaire. Chez un individu sain, on retrouve entre 800 et 1200 cellules par microlitre de plasma, alors que chez un individu infecté par le VIH et atteint du SIDA, ces cellules se raréfient progressivement et on en retrouve moins de 200 cellules par microlitre, par définition.

Les cellules activées représentent un milieu favorable à la réplication du VIH. Ainsi, les stimuli exogènes tels que les infections opportunistes mènent à des niveaux viraux accrus (Pilgrim et al., 1997). Le cours de l'infection plus agressive en Afrique sub-saharienne est attribuable en partie aux infections parasitaires ou mycobactériennes qui ont pour conséquence l'activation chronique du système immunitaire. L'infection des cellules du système immunitaire par le VIH déclenche l'activation cellulaire liée à la sécrétion de cytokines, en particulier de TNF $\alpha$ , d'interféron gamma (IFN $\gamma$ ), d'interleukine -1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), et d'IL-6 (Rybarczyk et al., 2004).

### II.2.1 : Cycle viral du VIH :

Le VIH se lie à la membrane de la cellule hôte par l'intermédiaire de sa glycoprotéine d'enveloppe gp120 qui se lie à la molécule CD4 et à un récepteur de cytokine (CCR5 sur les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages ; CXCR4 sur des lymphocytes T CD4+). Le CD4 se trouve majoritairement à la surface des lymphocytes T « helper » et sert de ligand pour les molécules de CMH de classe II (complexe d'histocompatibilité de type II), transformant ces cellules en cible primaire du VIH. D'autres cellules CD4 positives (par

exemple, les monocytes, les macrophages, les cellules microgliales et multi-nucléées géantes du système nerveux central) représentent d'importants réservoirs du VIH.

Après avoir fusionné avec les cellules CD4+, le VIH pénètre dans la cellule où l'ARN viral est transcrit en ADN grâce à la transcriptase inverse. L'enzyme intégrase catalyse l'intégration d'ADN proviral dans le génome de la cellule (Ferguson et al., 2002) (Roebuck and Saifuddin, 1999). La variabilité génétique du génome viral est due au manque de mécanisme de correction lors de ce processus et procure au virus la capacité d'échapper aux défenses de l'hôte contre les virus et aux agents thérapeutiques administrés. Cette variabilité antigénique limite également l'efficacité de la réaction immunologique, ce qui pose un problème pour la mise au point de vaccins efficaces (McGrath et al., 2001).

La production de l'ARN messager lors de la transcription dans la cellule infectée est suivie par la synthèse des composantes virales. Le génome viral est emballé dans le noyau viral et l'assemblage du virus s'effectue au niveau de la membrane cellulaire. Après l'assemblage, le virion bourgeonne à partir de la membrane cellulaire (la couche bilipidique) grâce aux protéines structurales formées lors du clivage des polyprotéines virales. Les enzymes virales sont aussi empaquetées dans les virions bourgeonnants. Les virions matures, contenant toutes les composantes nécessaires, se détachent de la membrane cellulaire et sont prêts à infecter d'autres cellules (Paranjape, 2005). Le génome proviral s'intègre ensuite dans le génome de lymphocytes CD4+ en division cellulaire et y reste en phase de latence pendant des mois, voire des années (Freed, 2001). Puisque ces cellules ne produisent pas de protéines virales tant qu'elles ne sont pas activées, elles ne sont pas affectées par les thérapies

antivirales existantes. Par conséquent, elles représentent un réservoir important d'infections persistantes. Leur activation mène à la production explosive de particules virales.

Présentement, le mode d'action des thérapies utilisées est basé sur l'inhibition de la transcriptase inverse virale et des protéases (inhibiteurs de protéases). Les futures thérapies à l'étude misent sur l'inhibition de l'entrée du virus dans la cellule et de l'intégrase.

## II.2.2 : La progression de la maladie

La progression de l'infection par le VIH peut être mesurée à partir de plusieurs facteurs tels que l'augmentation de la charge virale plasmatique, la vitesse du déclin des cellules T CD4<sup>+</sup> et les maladies opportunistes associées au VIH. Bien qu'un certain nombre de facteurs puissent influencer le cours de la maladie, c'est l'équilibre entre les réponses de l'hôte et celles du virus qui détermine principalement l'état de la maladie. D'un côté du spectre se trouvent les personnes capables de réagir avec une réponse immunitaire permettant de contrôler la multiplication du virus et de demeurer cliniquement « normaux », avec une baisse de cellules CD4<sup>+</sup> minime et une charge virale plasmatique très basse ou indétectable. Ce sont des « non- progresseurs à long terme » (NPLT) (Paranjape, 2005). De l'autre côté du spectre se trouvent les individus qui ne contrôlent pas la multiplication du virus et qui ont un déclin rapide des cellules CD4<sup>+</sup>. Ces individus développent le SIDA dans un délai de 2-3 années après l'infection par le VIH.

*Epuisement des cellules CD4<sup>+</sup> :* L'impact principal de l'infection par le VIH sur le système immunitaire est la destruction des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. La demi-vie de la plupart des

cellules T infectées par le VIH est de 36 heures, *in vivo* (Ho et al., 1995). Le VIH emploie plusieurs mécanismes pour détruire les lymphocytes CD4+ infectés et non infectés. (Certains de ces mécanismes sont développés ci-dessous.)

*Apoptose* : un des mécanismes par lequel l'infection par le VIH mène à la destruction des cellules CD4+ est l'apoptose. En effet, un niveau élevé d'apoptose accompagne souvent la progression de la maladie et une baisse des cellules T « helper » (Th) (Fowke et al., 1997; Gougeon et al., 1996). Les protéines virales Nef, Tat et Env stimulent la production de CD95 et de FasL, augmentant la susceptibilité de mortalité via le Fas. D'autres protéines virales telles le gp120, Tat, Nef, et Vpu induisent la mort cellulaire chez les cellules non- infectées. Un mécanisme possible est l'activation croisée des récepteurs CD4+ qui mène à l'apoptose des cellules T non infectées (Banda et al., 1992). La protéine Nef du VIH peut induire la mort de cellules non infectées lorsqu'elle se trouve dans la matrice extracellulaire. En effet, Tat induit la production et la sécrétion de FasL, et augmente la production de caspase 8 (Quaranta et al., 2004).

*D'autres mécanismes de destruction des cellules CD4+* : Les isolats de VIH ayant un tropisme pour CXCR4 se trouvent généralement dans les stades tardifs de l'infection. Ils infectent de préférence les cellules T et induisent la fusion des membranes de cellules adjacentes afin qu'elles forment des cellules géantes multinucléées appelées des syncytiums. Les syncytiums ont une courte vie et apparaissent plutôt dans les stades avancés de la maladie. Les cellules infectées et non infectées participent à la formation de ces syncytiums, accélérant la destruction des cellules pendant la maladie avancée (Alimonti et al., 2003). De plus, le détachement continu de particules virales de la membrane des cellules infectées

augmente la perméabilité de cette dernière, entraînant la mort de la cellule (Cantin et al., 2005).

D'autres protéines spécifiques au VIH, telles que Vpu, perturbent également la membrane et augmentent sa perméabilité, tuant la cellule. L'accumulation d'ADN viral non intégré dans le génome de la cellule augmente la cytotoxicité des cellules.

### II.2.3. La réponse immunitaire au virus :

L'infection par le VIH est caractérisée par des changements quantitatifs et qualitatifs chez les cellules CD4+. Ces changements qui mènent à la perte progressive des compétences immunes comprennent la perte des cellules due à l'infection et à la cytotoxicité, et la formation d'une colonie de lymphocytes T défectueuse, une baisse de la production d'IL2 et de l'expression du récepteur à l'IL2 (Moog et al., 1997). Tandis que la qualité des cellules CD4+ en début d'infection baisse de façon significative, l'épuisement progressif des cellules CD4+ est un indicateur important du pronostic de la progression de la maladie.

Les virus libres et associés aux cellules entrent dans le corps où ils sont ingérés par les macrophages (par phagocytose), qui présentent alors les protéines virales étrangères sur la surface de leur membrane cellulaire. Les lymphocytes CD4+ peuvent identifier ces protéines virales étrangères à la surface des macrophages, s'y lient, et deviennent activés. Les lymphocytes CD4+ activés sécrètent de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$ , ce qui stimule l'activation des lymphocytes B et T, et des macrophages. Pendant l'étape chronique de l'infection, il y a une corrélation inverse entre le nombre de cellules CD4+ et la virémie (de Mendoza et al., 2005).

*L'infection au VIH et l'immunité innée.* Deux populations de cellules, les cellules dendritiques plasmocytaires précurseurs (pDC) et les cellules « natural killer » (NK) jouent

un rôle prédominant dans la réponse innée. Les pDC, découvertes en 1975 en tant que cellules plasmocytaires T sans fonction connue (Levy, 2003), sont les productrices primaires d'IFN de type 1. La perte de ces cellules, reflétée par une baisse d'IFN- $\alpha$  est associée à des niveaux élevés d'ARN viral du VIH et à la progression du SIDA (Soumelis et al., 2001). Des niveaux normaux ou élevés de pDC se retrouvent chez les patients qui demeurent en bonne santé sans thérapie, malgré leurs comptes de cellules CD4+ bas. Les pDC participent non seulement à la réponse immunitaire innée grâce à leur production d'IFN- $\alpha$  mais aussi à la réponse adaptative une fois qu'elles deviennent des cellules dendritiques matures. Dans les stades avancés de la maladie, lorsque la réponse adaptative est perdue, il existe toujours des pDC et la réponse innée continue d'agir. Les cellules dendritiques matures sont des cellules présentatrices d'antigènes et peuvent induire une réponse immunitaire adaptatrice. Le VIH peut se servir des cellules DC pour sa transmission (Lore and Larsson, 2003). En effet, le récepteur DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Non-integrin) de type lectine des cellules dendritiques de la muqueuse sub-épithéliale se lie aux virions du VIH et les transporte aux cellules T cibles (Kedzierska et al., 2003; Yonezawa et al., 2003).

Les cellules NK forment une composante primordiale de la réponse innée contre une série de virus, champignons, bactéries et de parasites. Leur nom provient de leur capacité de lyser certaines cellules tumorales sans stimulation préliminaire. Ce sont des grandes cellules lymphoïdes granulaires qui ne portent pas de marqueurs caractéristiques des cellules B ou T (Tosi, 2005). Les NK ont une capacité naturelle de tuer les cellules infectées en absence de restriction par le CMH et de sensibilisation. Les cellules NK peuvent tuer les cellules infectées soit par contact direct ou par cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Bien que leur importance dans la défense contre certaines infections virales soit bien comprise, leur rôle dans la protection contre le VIH n'a toujours pas été évaluée. Chez

les patients infectés par le VIH, les cellules NK ont une activité cytolytique diminuée par rapport aux personnes non infectées. Cet effet semble être dû à une expression basse de récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR) sur les cellules NK HLA-DR+, et peut être à une quantité différente de perforine (Fogli et al., 2004).

### II. 3 : Le traitement:

Bien qu'il n'y ait pas encore de remède contre le SIDA, la thérapie antirétrovirale à triple action nommée HAART (highly active antiretroviral therapy) peut ralentir la progression de la maladie, exercer une suppression prolongée de la virémie et ainsi améliorer de façon significative les fonctions immunes.

Le but de la thérapie est de réduire au maximum la réplication virale et l'apparition d'une résistance aux traitements antiviraux, de réduire l'infectiosité et d'empêcher la destruction additionnelle du système immunologique, tout en permettant au système immunitaire de se reconstruire. Cependant, ce traitement n'est pas efficace chez tous les patients (Fatkenheuer et al., 1997).

Il y a deux types de médicaments antirétroviraux utilisés actuellement : les inhibiteurs de protéases et les inhibiteurs de transcriptase inverse (Flexner, 1998; Lange and van Leeuwen, 2002). Étant donné que chaque classe de médicaments vise une étape différente du cycle viral du VIH et qu'environ 10% des patients de certains pays éprouvent une résistance à au moins un de ces médicaments, des agents multiples sont souvent utilisés simultanément. Il est même recommandé par le département des services de la santé humaine et l'institut national de la santé américaine d'utiliser des combinaisons de deux inhibiteurs de transcriptase inverse avec un inhibiteur de protéase (Lange and van Leeuwen, 2002).

D'autres thérapies en cours d'évaluation se servent de cytokines pour augmenter la réponse immunitaire ou pour stimuler la reconstruction immunologique. Cependant, des boucles de rétroaction contrôlées par des cytokines intermédiaires non encore élucidées rendent difficiles les avancées dans ce secteur. Avant l'utilisation du HAART, les patients étaient traités au IL-2, ce qui augmentait dramatiquement le nombre de cellules CD4+ circulantes, diminuait la charge virale, ainsi que les événements associés au SIDA et réduisait le taux de décès (Goepfert et al., 2000). Des études récentes ont constaté que des patients traités simultanément au HAART et à l'IL-2 avaient une meilleure réponse des cellules CD4+ que les patients traités seulement au HAART (Gao et al., 2001; Kostense et al., 2002; Moore et al., 2002). Des études ont montré que l'IL-2 et le G-CSF (Friedrich et al., 2004; Leslie et al., 2004) sont moins efficaces chez des patients présentant un nombre de cellules CD4+ relativement bas. Des thérapies proposées visent à bloquer ou diminuer des récepteurs de cytokines proinflammatoires et/ou à empêcher l'expression de corécepteurs au VIH (Cremer et al., 2000). Cependant, la complexité des interactions entre les cytokines et leurs récepteurs et le rôle important que jouent les cytokines au sein de différents organes nous obligent à prendre des précautions lors de la manipulation de ces réseaux pour la thérapie contre le VIH.

### III. LES INTERFÉRONS :

Les interférons (IFN) sont notre première ligne de défense contre les pathogènes. Ils agissent de façon non spécifique et immédiate dès la détection de la présence du pathogène.

Les IFNs sont des cytokines qui ont une activité antivirale et sont sécrétés par les cellules suite à certains stimuli (Isaacs and Lindenmann, 1987) (Pestka, 1981; Pestka et al., 1981). Ils sont également impliqués dans la régulation de la prolifération, dans l'apoptose et dans l'activation des cellules immunitaires (Goodbourn et al., 2000). En résumé, les IFN jouent un rôle dans la régulation de centaines de gènes.

On distingue au moins cinq classes d'interférons : IFN-alpha (IFN  $-\alpha$ ), IFN-beta (IFN  $-\beta$ ), IFN-gamma (IFN  $-\gamma$ ), IFN-tau (IFN  $-\tau$ ) et IFN-omega (IFN  $-\omega$ ). Les IFN sont divisés en deux groupes : le type I (qui comprend IFN  $-\alpha$ , IFN  $-\beta$ , IFN  $-\tau$ , IFN  $-\omega$ ) et le type II aussi appelé l'IFN immun (IFN  $-\gamma$  seulement). Chez l'homme, il existe toute une famille de gènes IFN- $\alpha$ , et un seul gène pour IFN  $-\beta$  et pour IFN- $\omega$  (Tableau 1) (Braganca and Civas, 1998). Aucun gène pour l'IFN  $-\tau$  n'a encore été détecté chez l'homme.

La présence de virus, d'ARN à double brin (ARNdb), de microorganismes, de cytokines ou de facteurs de croissance stimulent la production d'interféron. En particulier, l'IFN  $-\alpha$  et l'IFN  $-\beta$  (souvent nommés « interférons viraux ») sont produits à la suite de la détection de virus ou d'ARNdb, dans les cellules. La fonction classique de ces deux interférons est la protection contre les infections virales. Cependant, il a vite été découvert que ces interférons avaient aussi des effets antiprolifératifs sur les cellules tumorales et leur utilisation dans le traitement de certains cancers est devenue répandue. En effet, l'IFN- $\alpha$  recombinant est utilisé pour traiter les myélomes, carcinomes rénaux, les tumeurs

épidermoïdes cervicales, de la tête et du cou, et les mélanomes. Il est également utilisé pour traiter l'infection par le virus de l'hépatite C (HCV) (Taylor et al., 2004).

Cette étude traitera de l'IFN de type 1, qui sera appelé IFN à partir de ce point, sauf si autrement précisé.

**Tableau 1** : Interférons humains et les emplacements de leurs gènes.

|                       | Nombre de gènes. | Emplacement (chromosome) |
|-----------------------|------------------|--------------------------|
| Interféron – $\alpha$ | 14               | Chromosome 9             |
| Interféron – $\beta$  | 1                | Chromosome 9             |
| Interféron – $\tau$   | 0                | N/A                      |
| Interféron – $\omega$ | 1                | Chromosome 9             |
| Interféron – $\gamma$ | 1                | Chromosome 12            |

Le tableau illustre le nombre de gènes qui se trouvent dans le génome humain ainsi que l'emplacement de ces gènes. N/A = non applicable car aucun gène de l'interféron- $\tau$  n'a été découvert chez l'homme à ce jour.

### III.1. La production de l'IFN :

#### III.1.1. Les cellules qui produisent l'IFN :

L'IFN est produit par les cellules infectées par des virus. La production de l'interféron implique généralement des facteurs de transcription complexes tels que le facteur nucléaire kappa B (NF- $\kappa$ B), le facteur de transcription activateur 2 (ATF-2)/JUN, et les facteurs régulateurs d'IFN (IRFs). Bien que toutes les cellules du corps puissent produire de l'IFN, les cellules qui produisent la majorité de l'IFN circulant dans le corps sont les précurseurs de cellules dendritiques plasmocytaires (pDC). Ainsi, les pDC sont également

appelées cellules productrices d'IFN, ou IPC (passé en revue dans (Liu et al., 1997). Les cellules fibroblastiques peuvent aussi produire de l'IFN- $\alpha/\beta$ , et les leucocytes peuvent produire de l'IFN- $\alpha$  (Erlandsson et al., 1998).

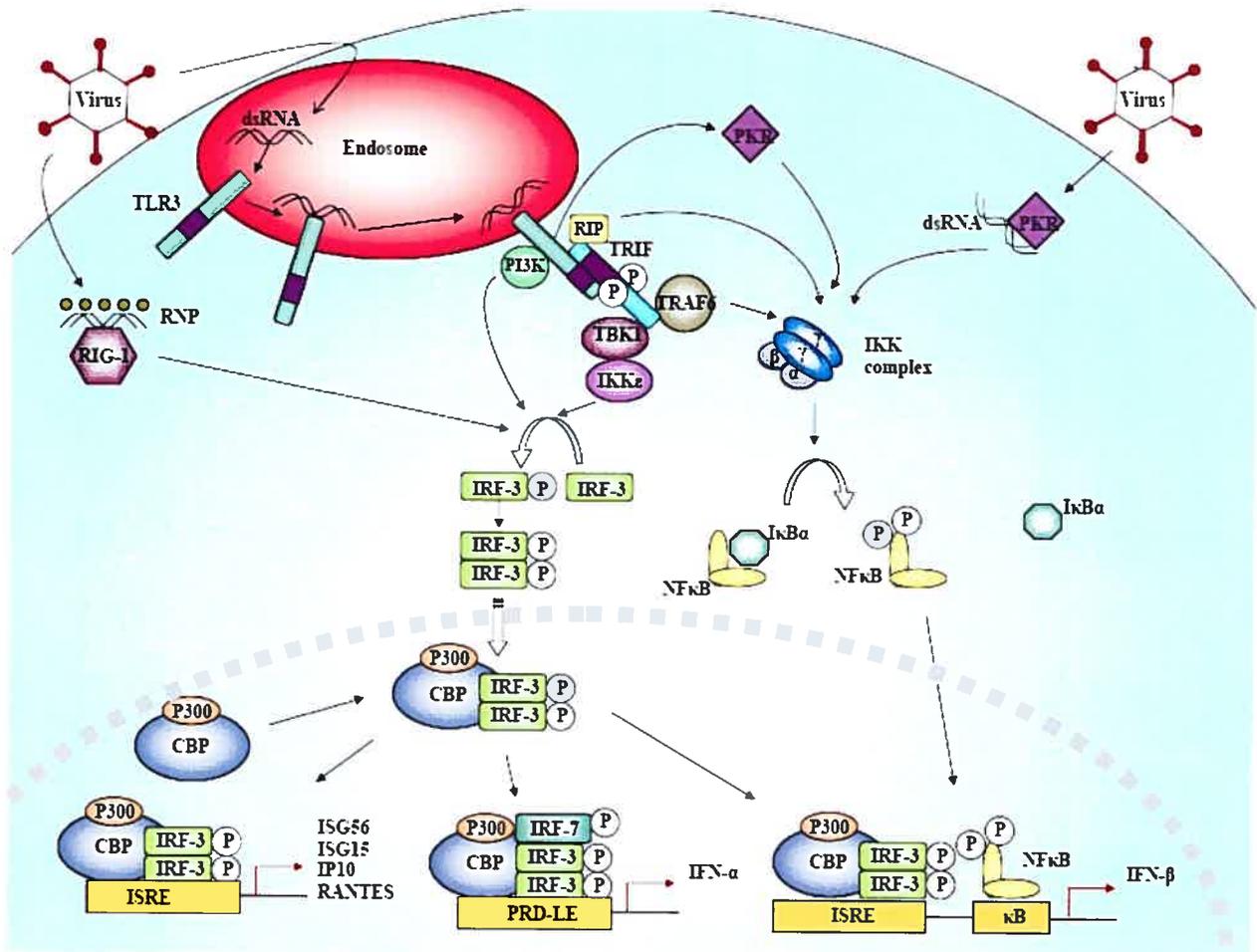
### III. 1.2. L'initiation de la cascade de l'IFN:

Les interférons de type 1 sont régulés au niveau de la transcription et sont induits suite à l'identification de pathogènes grâce à la coopération des facteurs de transcription c-Jun/ATF-2, NF- $\kappa$ B et IRF-3 au niveau du promoteur de l'IFN- $\beta$ . L'activation de la production d'IFN de type I est initiée par les récepteurs d'identification de motifs appelés récepteurs de d'identification de motifs (PRR). Ces motifs sont des signatures moléculaires de pathogènes (PAMP) qui proviennent de molécules très conservées à travers l'évolution et comprennent l'ARN à simple ou double brin (ARNsb et ARNdb, respectivement) ou de protéines essentielles virales. Ces protéines cellulaires peuvent ensuite déclencher une cascade qui mène à la production d'IFN et à l'activation de gènes impliquées dans la réponse antivirale (Figure 3) (Seya et al., 2005; Smith et al., 2005). Les différents ensembles de gènes activés par les PRR reflètent la nature du pathogène rencontré, ainsi que la localisation de l'infection et mènent à une réponse anti-virale ciblée. Il existe des PRR membranaires, tels que les TLR et des PRR cytoplasmiques, tels que PRK et RIG-1.

*PKR* : PKR est une des composantes les plus étudiées de la cascade de l'IFN. Il s'agit d'une kinase sérine/thréonine qui se lie à l'ARNdb présente dans le cytoplasme suite à la réplication virale. Lorsqu'il se lie à l'ARNdb, PKR devient activé, dimérise, s'auto phosphoryle et change de conformation (Katze et al., 1991) (Meurs et al., 1990). Ce changement lui permet de se lier à la kinase de I $\kappa$ B (IKK) et de l'activer. IKK actif induit

ensuite la dégradation de I $\kappa$ B via le protéasome, permettant la translocation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B au noyau. NF- $\kappa$ B se lie ensuite aux sites  $\kappa$ B au niveau des promoteurs des gènes impliqués.

**Figure 3 : L'induction de l'IFN par les virus.**



La présence de virus déclenche plusieurs voies de signalisations qui mènent à l'induction de la cascade de l'IFN. Le schéma ci-dessus en illustre quelques-unes. dsRNA= ARN à double brin, RNP=ribonucléoprotéine, PKR=protéine kinase R, RIP=protéine interagissant avec le récepteur, TBK=protéine que se lie à TANK, TRAF6= facteur associé au récepteur du TNF 6, TRIF= adaptateur inducteur de IFN- $\beta$  comprenant un domaine de récepteur Toll/IL1 , IKK= kinase de l'I $\kappa$ B, CBP= facteur de liaison au CREB, ISRE= élément de réponse stimulé par l'IFN, IRF-3= facteur régulateur des interférons 3, PRD-LE= Élément semblable à PRD.

*RIG-1* : Le gène inductible par l'acide rétinoïde (*RIG-1*) est une hélicase avec la capacité de se lier aux ribonucléoprotéines (RNP) virales. *RIG-1* est composé d'un domaine de recrutement de caspases (CARD) qui peut se lier au domaine CARD d'autres protéines et d'un domaine de liaison hélicase qui se lie aux RNPs (Levy and Marie, 2004; Yoneyama et al., 2004). L'association de RNPs au domaine hélicase entraîne un changement de conformation qui libère le domaine CARD préalablement replié (en revue dans (Levy and Marie, 2004)). *RIG-1* interagit ensuite avec la protéine adaptatrice de signalisation induite par le virus (VISA) via son domaine CARD (Xu et al., 2005). VISA recrute le facteur régulateur de l'interféron -3 (IRF-3) à *RIG-1*, permettant son activation. Il n'a pas encore été prouvé avec certitude que l'activation de IRF-3 passe par le complexe IKK $\epsilon$ /TBK1/TANK ou que VISA est capable d'activer IRF-3 directement. IRF-3 activé dimérise et se déplace vers le noyau de la cellule où, avec l'aide de CBP/p300, il prend le rôle de facteur de transcription et active le gène de l'IFN - $\beta$  ainsi que les gènes impliqués dans la réponse antivirale. MDA-5 (le gène associé au mélanome 5) est une autre hélicase très semblable à *RIG-1* qui peut aussi activer IRF-3, IRF-7 et NF- $\kappa$ B suite à la détection de virus (Yoneyama et al., 2005; Yoneyama et al., 2004).

Les PRR les plus importants qui induisent la production d'IFN sont les récepteurs « toll-like », ou TLR. Il existe 13 TLR au total chez l'homme et chacun peut reconnaître un ensemble différent de PAMP provenant de virus, bactéries, fungi et de protozoaires (Armant and Fenton, 2002). Dans le Tableau 2 se trouvent les TLR qui ont pour ligand des protéines virales. Sauf pour le TLR-3, ils utilisent tous la protéine adaptatrice MyD88 pour activer NF- $\kappa$ B et les MAP kinases. Parmi les TLR, ceux qui interagissent avec des PAMP viraux sont TLR-3, TLR-7/8 et TLR-9.

**Tableau 2 : Les TLR et leurs ligands PAMP viraux.**

| TLR   | Ligand                                   | Espèce | Références                 |
|-------|--|--------|----------------------------|
| TLR-2 | Protéine du virion du CMV                | H      | (Compton et al., 2003)     |
|       | La protéine HA de la rougeole.           | H, S   | (Bieback et al., 2002)     |
|       | La protéine env. du MMTV                 | S      | (Rassa and Ross, 2003)     |
| TLR-3 | L'ARNdb de plusieurs virus               | H, S   | (Alexopoulou et al., 2001) |
| TLR-4 | Protéine F du RSV                        | S      | (Kurt-Jones et al., 2000)  |
|       | Protéine env. du MMTV                    | S      | (Rassa and Ross, 2003)     |
| TLR-7 | ARNsb des virus de la grippe, VIH et VSV | S      | (Lee et al., 2003)         |
| TLR-8 | ARNsb du VIH                             | H      | (Heil et al., 2004)        |
| TLR-9 | ADN des virus HSV-1 et HSV-2             | S      | (Lund et al., 2003)        |

Ce tableau met en évidence les récepteurs TLR connus pour leur interaction avec des motifs moléculaires viraux. H=Homme. S=Souris. HA=haemagglutinine. CMV=cytomégalovirus, RSV= Virus respiratoire syncytial MMTV= Virus de tumeur mammaire des souris, VSV= virus vésiculaire de la stomatite, HSV-1 et -2= Virus de l'herpes simplex -1 et -2.

*TLR-7/8* : Les TLR-7 et TLR-8 sont les plus proches de la famille des TLR et déclenchent une très grande production de IFN de type 1, notamment l'IFN- $\alpha$ , chez les cellules pDC (Barchet et al., 2005; Crozat and Beutler, 2004; Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Hornung et al., 2004; Lund et al., 2004). Le TLR-7/8 reconnaît l'ARNsb riche en G/U, tel que l'on retrouve chez le VIH et le virus de l'influenza (Diebold et al., 2004; Heil et al.,

2004). Les TLR-7/8 se lient à leur PAMP au niveau des endosomes et nécessite l'acidification des endosomes. Les TLR-7/8 transmettent leur signal à travers la molécule MyD88 qui s'associe avec IRF-7 (mais pas avec IRF-3) et l'active, entraînant la production d'IFN de type I. Il a récemment été démontré que l'association de MyD88 avec IRF-7 implique IRAK4 et TRAF6 (Honda et al., 2004b; Kawai et al., 2004).

*TLR-9* : Le TLR-9 peut reconnaître les motifs d'ADN CpG non-méthylés des virus et des bactéries et permet la production d'IFN- $\alpha$  en grande quantité par les pDC et les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDC) (Barchet et al., 2005; Crozat and Beutler, 2004; Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Hornung et al., 2004; Lee et al., 2003). Les virus à ADN tels que HSV-1 et HSV-2 induisent la production de IFN chez les pDC via le TLR-9 (Krug et al., 2004a; Krug et al., 2004b; Lund et al., 2003). Comme les TLR-7/8, les TLR-9 se lient à leur PAMP dans les endosomes (Crozat and Beutler, 2004; Diebold et al., 2004; Lee et al., 2003; Lund et al., 2004). Le TLR-9 se sert également de MyD88 pour sa signalisation et IRAK4 et TRAF6 sont impliqués.

*TLR-3* : Le toll-like receptor-3 (TLR3) est une autre protéine capable de se lier à l'ARNdb. Le récepteur TLR3 se trouve à la surface de certaines cellules (les cellules dendritiques) et au niveau des endosomes (les fibroblastes). Lorsqu'il se lie à son ligand, l'ARNdb, TLR3 s'associe avec TRIF, une protéine adaptatrice qui recrute TRAF6 (TNF receptor associated factor-6) via le motif TRAF de TRAF6 et le motif d'association à TRAF6 de TRIF (revue dans (Smith et al., 2005)). TRIF et TRAF6 forment un complexe actif qui se lie à IKK $\epsilon$  (Fitzgerald et al., 2003) et à TBK1 (Sato et al., 2003) activant la fonction de protéine kinase.

Une fois activé, le complexe IKK $\epsilon$ /TBK1 phosphoryle et active IRF-3 (McWhirter et al., 2004), qui se déplace vers le noyau et active la transcription des gènes l'IFN- $\alpha/\beta$ .

Le complexe TRIF/TRAF6 peut également activer le complexe I $\kappa$ B permettant la translocation de NF- $\kappa$ B au noyau et la transcription des gènes sous le contrôle de  $\kappa$ B, dont IFN- $\beta$ .

Il a été démontré que VISA est également impliqué dans l'activation de NF- $\kappa$ B. En effet, VISA contient, en plus de son domaine CARD, un motif TRAF et peut interagir avec TRAF6 et TRIF, en activant IRF-3 et NF- $\kappa$ B (Xu et al., 2005).

La présence de virus dans les cellules ou dans le milieu extracellulaire induit la production de l'IFN afin de limiter la prolifération du virus dans la cellule infectée, d'augmenter les défenses dans les cellules avoisinantes et d'activer le système immunitaire. De plus, le signal initié par l'IFN est amplifié dans les cellules car il induit la production supplémentaire d'IFN. Cette boucle d'amplification permet la mise en place d'une réponse immunitaire considérable à partir d'un faible signal initiateur. Elle permet aussi de produire des espèces différentes d'IFN en phase immédiate et d'autres espèces en phase tardive de la réponse anti-virale. Par exemple, IFN $\alpha$ 4 et IFN $\beta$  sont produits grâce à l'action de IRF3 dès son activation par le virus ou l'ARNdb et sont sécrétés. Par la suite, ces IFNs interagissent avec le récepteur de type I, ce qui mène à l'activation de IRF-3 et IRF-7, qui vont induire la production d'autres IFNs de type I et ensuite à l'activation de la cascade JAK/STAT.

### III. 2. Le récepteur à l'IFN, l'IFNAR

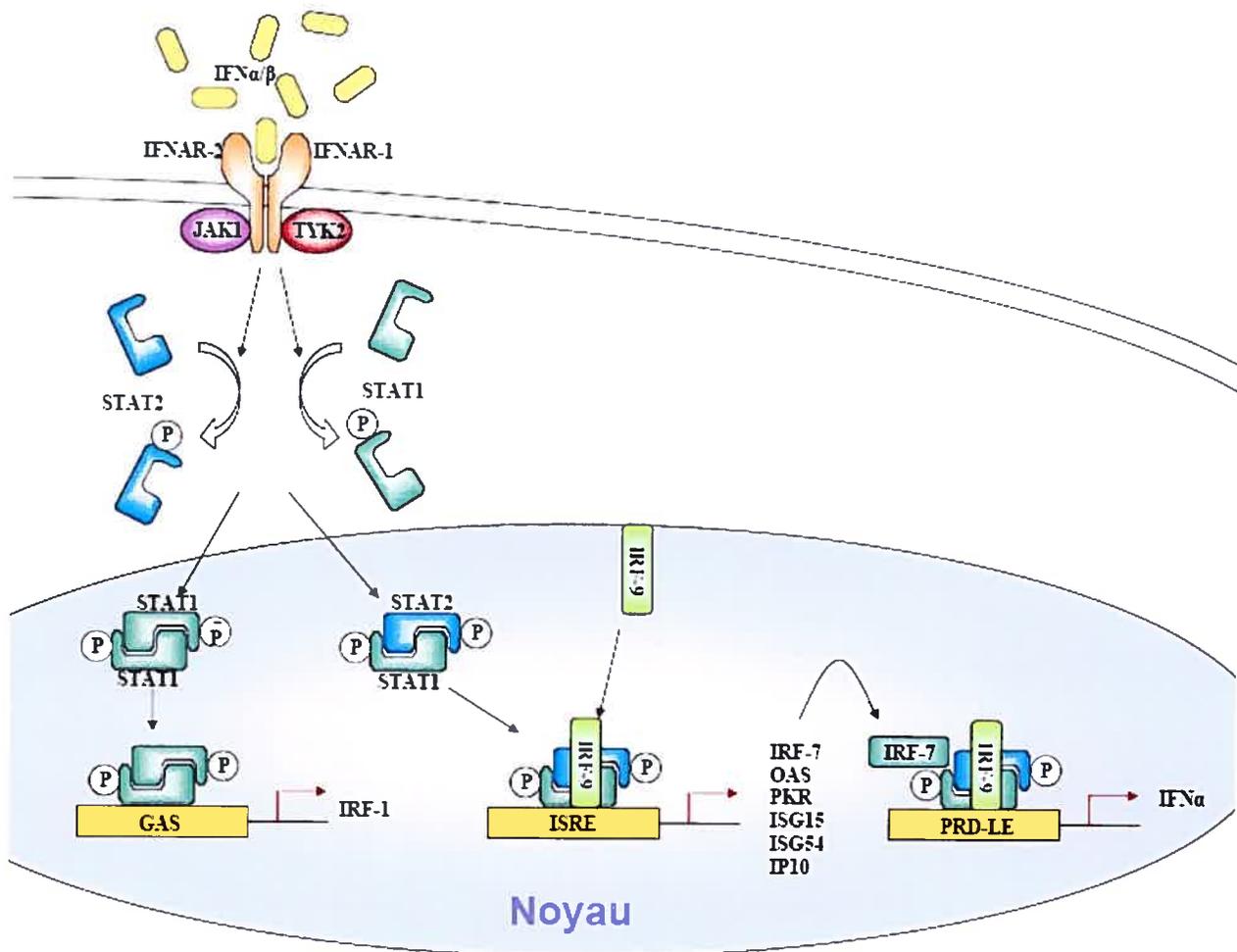
Le récepteur à l'IFN de type I est l'IFNAR. Il est situé à la surface des cellules et induit le signal qui mène à la production d'IFN et des protéines responsables pour l'état antiviral de la cellule. L'IFNAR est composé de deux sous unités : IFNAR1 et IFNAR2 (en

revue dans (Mogensen et al., 1999) ). IFNAR1 comprend une portion extracellulaire qui se lie aux ligands, une portion transmembranaire avec aucune activité enzymatique et une portion cytoplasmique qui transmet le signal à l'intérieur de la cellule. IFNAR2 existe sous trois formes : courte, longue et soluble. La forme longue est la seule forme ayant une fonction de récepteur et est composée des trois mêmes parties qu'IFNAR1 (Mogensen et al., 1999). 100-5000 molécules d'IFNAR sont présentes à la surface de toutes les cellules vertébrées étudiées à ce jour (Bekisz et al., 2004).

Les récepteurs aux interférons sont composés de deux domaines pliants ayant un site de liaison au ligand qui se loge au centre, entre les plis. La cascade de signalisation des interférons est un exemple de l'utilisation des tyrosines dans les voies de signalisation (Figure 4). Les interférons de type I (IFN  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\omega$ ) induisent l'expression de gènes impliqués dans différentes fonctions cellulaires telles que les activités antiprolifératives, antivirales et immunomodulatrices. Les mécanismes par lesquels l'IFN initie ces fonctions si complexes et variées n'ont pas encore été complètement élucidés. La signalisation par les interférons de type I nécessite la présence des deux chaînes du récepteur IFNAR (interféron type I receptor) : l'IFNAR1 et l'IFNAR2 (Colamonici et al., 1994; Mogensen et al., 1999; Yan et al., 1996), toutes deux glycosylées. Pour souligner l'importance de la présence de ces deux chaînes, on note qu'en l'absence de l'une d'entre elle, aucun signal n'apparaît suite à la présence d'IFN et aucun gène ne devient activé. La liaison de l'IFN de type I mène à l'association de ces deux chaînes et à la phosphorylation des tyrosines présentes sur la partie intracellulaire de chaque chaîne du récepteur. Bien que différents IFNs de type I aient des effets distincts sur la cellule, ils se lient tous à un même récepteur, l'IFNAR. En effet, lorsque IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$  interagissent avec IFNAR, les sites de phosphorylation varient (Platanias et al., 1996). Bien que la réponse ne soit pas la même lors de la liaison des différentes espèces

d'IFN, la liaison au récepteur semble avoir lieu de la même façon (Lewerenz et al., 1998; Lu et al., 1998).

**Figure 4 :** La cascade de signalisation de l'IFN via le IRFAR.



L'interaction entre l'IFN- $\alpha/\beta$  avec le récepteur IFNAR déclenche une cascade de signalisation dépendante des STAT. Ceci induit l'activation des gènes de la réponse antivirale ainsi que des gènes de l'IFN, créant une boucle d'amplification du signal. IFNAR-1/2= Récepteur à l'interféron1/2, JAK1 et TYK2= membres de la famille Janus des tyrosines kinase, STAT-1/2= activateur de transcription et transducteur de signaux, GAS= sites d'activation par l'IFN gamma, ISRE= élément de réponse stimulé par l'IFN, PRD-LE= Élément semblable à PRD, P=groupement phosphore.

Les kinases Janus, TYK2 et Jak1, associées à IFNAR1 et IFNAR2 respectivement, semblent être les auteurs de cette phosphorylation alors qu'elles-mêmes sont activées par la phosphorylation de IFNAR1 et IFNAR2 (Novick et al., 1994; Schindler et al., 1992). Les

substrats de TYK2 et JAK1 sont les transmetteurs et transactivateurs de signaux (STAT), qui sont recrutés aux chaînes cytoplasmiques du récepteur, via des phosphotyrosines. Lorsque l'IFN se lie à la chaîne IFNAR1 du récepteur, il devient phosphorylé par TYK2 et recrute STAT1 au récepteur afin qu'il soit lui aussi phosphorylé (Colamonici et al., 1994). Une fois STAT1 et STAT2 activés, ils forment un hétérodimère qui se sépare du récepteur et s'associe à IRF-9, formant ainsi le complexe ISGF3 (facteur génétique stimulé par l'IFN). ISGF3 est importé dans le noyau de la cellule, se lie aux éléments de réponse à l'IFN (Interferon stimulated response element, ISRE) et active la transcription des gènes qui se trouvent en aval de cette région (Shuai et al., 1993; Veals et al., 1992). Les gènes contrôlés par la séquence ISRE comprennent notamment OAS, PKR, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , ISG15, ISG54, IP-10, etc.

L'ISRE contrôle la plupart des gènes inductibles à l'IFN et se situe à moins de 200 paires de bases du site d'origine de la transcription du gène. Les souris transgéniques déficientes en STAT1 ou STAT2 ont un risque élevé d'infections virales et microbiennes car leur cascade d'IFN est défectueuse (Durbin et al., 1996). Cette expérience met en évidence l'importance du rôle joué par l'IFN dans la défense antivirale. Il a récemment été démontré que STAT3 se lie à IFNAR1 et IFNAR2 et devient phosphorylé suite à cette interaction. Le STAT3 actif est un adaptateur pour la kinase du phosphatidylinositol 3 (PI3K). Les homodimères de STAT3 et les hétérodimères de STAT1/STAT3 se forment suite à la signalisation initiée par l'IFN et peuvent se lier aux séquences GAS (IFN $\gamma$  activated sequences) en amont de certains ISG (Interferon stimulated gènes) (Platanias and Fish, 1999).

L'activation de PI3K par les JAKs mène à l'activation de NF- $\kappa$ B et PKC $\delta$  et ultimement aux effets antiapoptotiques observés chez les neutrophiles (Wang et al., 2003).

PI3K entraîne également l'activation de la voie p38 MAP kinase via Rac1 et Cdc42 (Iordanov et al., 2001).

Deux protéines jouant un rôle important dans la production, la régulation et l'action biologique des IFNs de type I sont IRF3 et IRF7. Ces dernières sont phosphorylées suite à l'infection virale détectée par le TLR3. IRF 3 est constitutivement exprimé dans toutes les cellules et lorsqu'il est phosphorylé, il dimérise et grâce à son signal de localisation nucléaire, il se dirige vers le noyau (Lin et al., 1998). Une fois dans le noyau de la cellule, les dimères se lient aux séquences ISRE situées dans la région du promoteur des gènes et activent leur transcription (Figure 4).

### III. 3. L'état antiviral induit par les interférons :

Les IFN de type I activent des gènes qui jouent un rôle important dans la résistance à l'infection de l'hôte, dans l'activation des composantes clé de la réponse immunitaire innée et adaptatrice (par exemple la maturation des cellules présentatrices d'antigènes APC) et dans la production de cytokines impliquées dans l'activation des cellules B, T et NK.

#### III. 3. 1. Les facteurs de transcription impliqués dans la réponse antivirale.

Les différents facteurs de transcription se lient à différentes séquences dans les régions promotrices des gènes (Figure 3) (Grandvaux et al., 2002b; Malmgaard, 2004; Nakaya et al., 2001).

*NF- $\kappa$ B* : NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription composé de deux sous unités faisant partie de la famille Rel/NF- $\kappa$ B telles que p50, p52, p65 (RelA), c-Rel, et RelB. Les membres les plus communs de cette famille sont le complexe homodimérique p50/p50 et le complexe hétérodimérique p50/p65. Dans les cellules non- stimulées, NF- $\kappa$ B demeure dans le

cytoplasme associé de façon non-covalente à une protéine I $\kappa$ B qui masque leur signal de localisation nucléaire (SLN). L'activation de NF- $\kappa$ B consiste à la phosphorylation de I $\kappa$ B (Bose and Banerjee, 2003), ce qui mène à sa dégradation par le protéasome et à la libération de NF- $\kappa$ B qui peut ensuite librement se lier à l'ADN au niveau des séquences  $\kappa$ B (Malmgaard, 2004).

**Tableau 3 :** Les différents facteurs de transcription et les séquences auxquelles ils se lient

| Facteurs de transcription              | Séquence cible     | Gènes activés   |
|--|--------------------|---|
| IRF-3/IRF-3                            | ISRE               | ISG15, ISG54, IP-10, GBP  |
| IRF-3/IRF-3                            |                    | IFN- $\alpha$ 1 (human) IFN $\alpha$ 4 (Murine),<br>IFN $\beta$ |
| IRF-3/IRF-7                            | PRD                | IFN- $\beta$  |
| IRF-7/IRF-7                            | PRD-LE             | IFN- $\alpha$   |
| NF- $\kappa$ B                         | $\kappa$ B         | IFN- $\beta$  |
| NF- $\kappa$ B/IRF-3                   | ISRE et $\kappa$ B | IFN- $\beta$  |
| c-Jun/ATF-2                            | CRE                | IFN- $\beta$  |
| ISGF-3 (complexe<br>STAT1/STAT2/IRF-9) | ISRE               | OAS, PKR  |

Le tableau illustre différents facteurs de transcription et complexes de facteurs de transcription ayant un rôle important dans la cascade de l'IFN dans les cellules. IRF-3 = facteur régulateur des interférons - 3; IRF-7 = facteur régulateur des interférons -7; PRD = domaine de régulation positive ; ISRE= élément de réponse stimulé par l'IFN ; PRD-LE = élément semblable à PRD ; ATF = facteur de transcription activateur ; OAS = Oligoadenylate synthétase; NF- $\kappa$ B = facteur nucléaire  $\kappa$ B; PKR = kinase protéique R dépendante sur l'ARN ; CRE = élément responsif à l'AMP cyclique.

*c-Jun/ATF2* : Le facteur de transcription *c-Jun/ATF-2* est un hétérodimère de deux facteurs appartenant à la famille de facteurs de transcription des protéines activatrices AP-1 qui comprend les sous-familles Jun et Fos (Karin, 1995). Il s'agit d'un hétérodimère qui se lie à l'ADN même en absence de stimulation. Cependant, le potentiel transactivateur dépend de la phosphorylation par la MAP kinase p38 et par *c-jun* kinase (JNK) (Wisdom, 1999). Le dimère *c-jun/ATF2* se lie à l'élément de réponse l'AMP cyclique (CRE) au niveau du domaine de régulation positive IV (PRD-IV).

*Les IRF* : Les facteurs de réponse aux interférons (IRF) sont une famille de facteurs de transcription (figure 5) qui joue un rôle très important dans la défense de la cellule contre les bactéries, virus et autres pathogènes, dans la régulation de la croissance cellulaire et dans le déclenchement des réponses immunitaires dans un hôte (Lin et al., 1999; Sharf et al., 1995; Taniguchi et al., 2001; Veals et al., 1992). Ils stimulent l'expression de gènes stimulés par l'IFN (ISG), de chimiokines et de cytokines.

**Figure 5** : Structure de base des IRF.

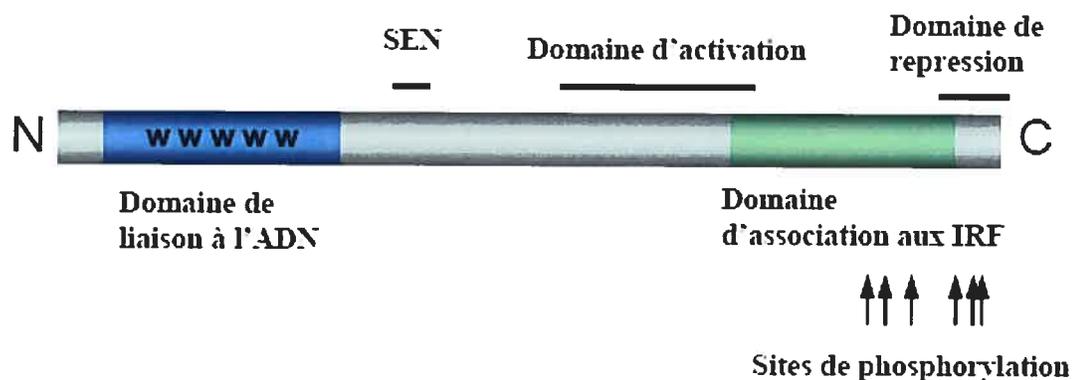


Schéma représentatif des structures communes aux protéines membres de la famille des IRF. SEN= signal d'export nucléaire. N = domaine d'azote, C = domaine carboxy.

Certains IRF ont un rôle activateur (IRF-1, -3, -5, -7, -9) tandis que d'autres ont un rôle inhibiteur (IRF-2, IRF-8). D'autres encore peuvent être activateurs ou inhibiteurs, selon les conditions spécifiques. Les IRF-3, -5 et -7 jouent un rôle principal lors d'infections virales. C'est pourquoi un défaut au niveau de l'un de ces IRF mène souvent à une déficience de la réponse antivirale (Taniguchi et al., 2001).

*IRF-3* : IRF-3 est une protéine ubiquitaire de 55kDa qui est exprimé constitutivement au niveau de toutes les cellules du corps. Il se trouve sous une forme de monomère inactif dans le cytoplasme chez les cellules saines. Lorsqu'il est phosphorylé au niveau de sa partie C-terminal (aux sérines en position 385 et 386, puis à la sérine 396), des changements de conformation mènent à sa dimérisation, translocation au noyau, association à CBP/p300, liaison aux séquences ISRE de l'ADN et à son activité transcriptionnelle (Reich, 2002; Servant et al., 2003; Yang et al., 2002; Yoneyama et al., 2002). Bien que IRF-3 joue un rôle important dans l'activation de IFN- $\beta$  et IFN $\alpha$ 1, il ne peut pas activer tout seul la transcription de ces gènes sans CBP/p300 et éventuellement d'autres facteurs de transcription (Grandvaux et al., 2002a; Lin et al., 1998; Servant et al., 2003; Weaver et al., 1998). IRF-3 est capable d'identifier différentes séquences de type IRSE : il peut activer la transcription de certains gènes sous le contrôle d'un ISRE mais pas tous. Par exemple, il est incapable d'activer la transcription de PKR, ISG20, IRF-7, IRF-1 ou de STAT1. Cette restriction est due à une reconnaissance limitée du ISRE [GAAA(C/G)(C/G)GAAAN(T/C)] (Grandvaux et al., 2002a).

*IRF-7* : IRF-7 possède une capacité de reconnaissance du ISRE plus large lui permettant d'activer plus de gènes que IRF-3. L'expression de IRF-7 est induite par l'IFN et il est activé

par l'infection virale. Comme IRF-3, il devient actif lorsqu'il est phosphorylé. Il dimérise et se déplace vers le noyau. Actif, il se lie à certains promoteurs de certains gènes d'IFN- $\alpha$ . Certains sous-types de IFN $\alpha$  nécessitent absolument la présence de IRF-7. IRF-7 peut également former un hétérodimère avec IRF-3 et se lier au promoteur de IFN- $\beta$ . L'induction d'IFN- $\alpha/\beta$  suite à la signalisation par la cascade indépendante au MyD88 est presque abolie dans les cellules déficientes en IRF-7 (Honda et al., 2005). De plus, IRF-7 est essentiel pour l'induction de IFN- $\alpha/\beta$  suite à l'infection virale, indépendamment du Myd88, ainsi que via les TLR, dépendamment du MyD88 (Au et al., 2001; Honda et al., 2005). Il a aussi été démontré que l'activation d'IFN $\alpha/\beta$  via l'activation du TLR-9 dans les cellules dendritiques plasmocytaires dépend entièrement de IRF-7 (Honda et al., 2005).

*IRF-5* : IRF-5 est un autre facteur de transcription de la famille des IRF impliqué dans l'infection virale. Des études ont démontré qu'il joue un rôle important dans plusieurs aspects de la défense cellulaire, tels que l'induction de cytokines et chimiokines impliquées dans le recrutement des lymphocytes T. Comme IRF-3 et -7, il devient activé suite à l'infection virale par la phosphorylation. IRF-5 est exprimé constitutivement au niveau des organes lymphoïdes, des cellules dendritiques, des lymphocytes du sang périphérique mais il est absent des lymphomes et leucémies (Barnes et al., 2003). IRF-5 inhibe la croissance des tumeurs *in vivo* et *in vitro*. Cette protéine agit en aval de la signalisation de TLR-MyD88 et contrôle la transcription de gènes des cytokines inflammatoires et éventuellement d'autres gènes. Chez les souris IRF5<sup>-/-</sup>, la production de cytokines induites par l'activation des TLR, telles que IL-6, IL-12 et TNF- $\alpha$  est presque abolie alors que l'induction de l'IFN- $\alpha$  est intacte (Takaoka et al., 2005).

### III. 3. 2. Les acteurs de la réponse antivirale :

L'interféron induit la transcription de centaines de gènes afin que la cellule se défende des virus qui la menacent. Parmi ces gènes :

*PKR* : Nous avons vu le rôle important que joue PKR dans la détection de l'ARNdb lors d'infections virales. Il est également induit par l'IFN, permettant à la cellule d'avoir des quantités suffisantes de PKR pour détecter l'ARNdb. Une fois activé, PKR peut inhiber la traduction de protéines virales en phosphorylant le facteur eukaryotique d'initiation-2 (eIF-2), ce qui bloque son recyclage pour l'initiation de la traduction de protéines. Dans des conditions normales, PKR est inactif. Lorsqu'il se lie à de l'ARN à double brin (ARNdb), il devient activé. Il peut également activer NF- $\kappa$ B, et peut éventuellement induire l'apoptose via Bcl2 et ICE (Stark et al., 1998).

*eIF2* : Une fois activé par l'ARNdb, PKR phosphoryle la sous unité  $\alpha$  du facteur d'initiation de traduction eIF2. Un complexe impliquant eIF2 phosphorylé lié au GDP et le facteur de recyclage eIF2B se forme par la suite empêchant le recyclage de eIF2 et inhibant la synthèse des protéines cellulaires et virales (Samuel, 2001; Stark et al., 1998; Williams, 1999).

*Mx* : cette famille de grandes GTPases est induite par les virus, l'IFN et l'ARNdb. Leur nom, gènes de résistance au Myxovirus, illustre la première fonction qui leur a été attribuée. Ce sont des protéines hautement conservées qui ont une certaine homologie avec des dynamines. Ces protéines interfèrent avec la réplication de l'ARN viral. On les trouve dans le cytoplasme des cellules humaines et dans le noyau des cellules murines. Leur mécanisme d'action n'est

pas clair mais il a été suggéré qu'elles interfèrent avec la circulation des polymérases virales dans la cellule (Samuel, 2001; Stark et al., 1998; Stranden et al., 1993).

*ADAR* : Cette désaminase d'adénine spécifique à l'ARNdb est une protéine inductible à l'IFN qui est impliquée dans le formatage de l'ARN. ADAR se lie à l'ARNdb et désamine l'adénosine C6 (A), la transformant en inosine (I) (Liu et al., 1997). Cette modification de A en I rend l'ARN plus apte à devenir de l'ARN à simple brin. De plus, lors de la transcription et la traduction, l'inosine est facilement confondue avec la guanine par les polymérases et les ribosomes, aboutissant à des hyper-mutations du transcrit du gène (Samuel, 2001).

*2'5'OAS* : les 2'5' oligoadenylate synthétase sont une classe d'enzymes induites par l'IFN qui produisent des oligomères 2'5'A à partir d'ATP. Ces oligomères 2'5'A se lient avec très forte affinité à l'endoribonucléase L (RNase L) induisant leur dimérisation et leur activation. Une fois activée, la RNase L clive les brins d'ARN à simples brins (ARNsb), dont les ARN messagers (ARNm) (Goodbourn et al., 2000; Jordanov et al., 2001). La RNaseL inhibe aussi la traduction en clivant l'ARN ribosomal 28S. Ce mécanisme est localisé au niveau du virus intracellulaire étant donné la courte vie des oligomères 2'5'A.

*RNase L* : Cette enzyme agit en conjonction avec la 2'5'OAS et elle est aussi induite par l'IFN. Elle est activée par les oligomères 2-5A et une fois liée à ces oligomères, elle forme des homodimères puis acquiert une fonction catalytique d'endoribonucléase et clive l'ARN viral et cellulaire. L'ARNase L est présente de façon constitutive dans toutes les cellules (Floyd-Smith and Denton, 1988) et l'IFN de type 1 augmente son activité dans certains types cellulaires.

*ISG15* : Le gène induit par l'IFN 15 (*ISG15*) est l'un des gènes les plus induits par l'infection virale et par l'IFN. C'est une protéine de 15 kDa avec une homologie de séquence avec l'ubiquitine. *ISG15* peut être conjuguée aux protéines intracellulaires via une liaison d'isopeptidique, similaire à celle de l'ubiquitine par un procédé appelé l'isgylation. Sa fonction n'est toujours pas connue bien qu'il soit évident qu'elle joue un rôle très important dans l'état antiviral de la cellule. En effet, des études ont montré que l'isgylation décuple et renforce la signalisation par l'IFN (Malakhov et al., 2003).

#### IV. LE VIH ET LES INTERFÉRONS:

##### IV. 1. Les effets de l'infection sur les patients

###### IV.1.1. Les effets de l'infection sur la production d'IFN chez les patients

Une étude du laboratoire de Gendelman en 1994 a montré qu'au moment de la séroconversion, il y a une augmentation de l'activité de l'IFN (telle que témoignée par une augmentation du 2'5'OAS, la micro tubuline et la néoptérine), éventuellement causée par la réponse immunitaire antivirale de l'hôte. Cette augmentation est aussi accompagnée d'une baisse de la charge virale et d'une augmentation des cellules T CD4+ (Baca-Regen et al., 1994; Poli et al., 1994; Soumelis et al., 2001). Ensuite, la production d'IFN s'affaïsse, la charge virale augmente et l'infection progresse vers le SIDA (Francis et al., 1992; Gendelman et al., 1990; Paranjape, 2005). On sait déjà que l'IFN- $\alpha$  a des effets antiprolifératifs sur les lymphocytes de patients infectés par le VIH (Stylianou et al., 2001).

Bien que toutes les cellules du corps puissent produire de l'IFN, deux types de leucocytes sont les principaux producteurs d'IFN de type 1 (Lebon et al., 1982). Les monocytes produisent de l'IFN en réponse à l'infection par le virus Sendai ainsi que par d'autres virus enveloppés. Cependant, lors de l'infection par le VIH, leur production d'IFN diminue tardivement et est sans relation avec des infections opportunistes (Feldman et al., 1995; Ferbas et al., 1995). Par contre, les cellules productrices d'IFN (IPC) sont 50 fois moins abondantes dans le sang périphérique que les monocytes mais produisent 100 fois plus d'IFN par cellule (Feldman et al., 1995; Siegal et al., 1999). Les IPC produisent de l'IFN en réponse à plusieurs virus enveloppés dont le VIH et aux virus à ARN nu complexés à des anticorps (Palmer et al., 2000). Ces cellules sont également appelées cellules dendritiques plasmocytaires (pDC). Le VIH induit la production d'IFN chez les pDC et non chez les

cellules dendritiques myéloïdes (Fonteneau et al., 2004; Siegal et al., 1999; Yonezawa et al., 2003).

#### IV. 1. 2. Effets de l'infection sur les IPC.

Dans l'étude de l'équipe de Hosmalin, (Kamga et al., 2005), il a été démontré que la production d'IFN par les PBMC de patients séropositifs en réponse à la stimulation avec le virus de l'herpès simplexe 1 était sévèrement réduite comparée aux donneurs non- infectés. Après 12 mois de traitement HAART, la production d'IFN due à la stimulation par le virus de l'herpès simplex 1 était redevenue normale. Leurs données suggèrent que ce rétablissement dans la production d'IFN proviendrait des pDC. Ces résultats soulignent l'importance d'un traitement antirétroviral et d'IFN- $\alpha$  dès les premiers stades de l'infection virale. Cette étude suggère que la production d'IFN de type 1 est profondément affaiblie chez les patients infectés par le VIH-1 lors de l'infection primaire. Elle confirme également que les nombres de pDC sont très bas à ce stade. Chez les patients non- traités, il y avait une forte corrélation entre les changements de production d'IFN et les changements de la charge virale.

Nous savons déjà que ces cellules jouent un rôle crucial dans l'activation et la fonction des réponses immunes innées ainsi qu'adaptatives, notamment contre les virus. L'IFN $\alpha$  est généralement présent dans le sérum de patients qui en sont à un stade avancé de la maladie (Lau and Williams, 1990). Ceci suggère que l'IFN est impliqué la progression de la maladie vers le SIDA. De plus, certains auteurs ont formulé l'hypothèse que l'IFN de type 1 est un cofacteur important du VIH et est impliqué dans la suppression des cellules CD4+ (Fall et al., 1995) ; (Gringeri et al., 1995)

On sait déjà que l'interaction entre les virus et les DC joue un rôle très important dans la pathogenèse de l'infection virale (Palucka and Banchereau, 2002). Dans le cas du VIH-1, les DC ont un rôle crucial dans l'induction des réponses immunes ainsi que dans la transmission du virus aux cellules CD4<sup>+</sup> (Lore and Larsson, 2003). Parmi les premières cellules à être infectées *in vivo* (Knight and Patterson, 1997; Lore and Larsson, 2003), les DC sont elles-mêmes sensibles à l'infection par le VIH *in vitro* et elles répondent au virus en produisant de grandes quantités d'IFN- $\alpha$ . Cet IFN contribue en partie à la restriction de la réplication virale dans les pDC ainsi qu'à la maturation des DC myéloïdes (Lapenta et al., 1999).

Une étude de l'équipe de Gessani (Del Corno et al., 2005) démontre que l'exposition de pDC au VIH inactivé ou à la protéine virale gp120 est suffisante pour déclencher la production d'IFN- $\alpha$  et de chimiokines. Cette réponse pourrait servir de protection contre l'infection au VIH pour les cellules avoisinantes et contribuer à limiter la propagation virale en limitant la réplication de l'ADN viral dans les cellules non- infectées. Par contre, la surproduction de chimiokines lors de cette réponse pourrait attirer d'autres cellules du système immunitaire vers le site de l'infection permettant leur infection et la dissémination du virus dans l'organisme. L'équilibre des effets positifs et négatifs des mécanismes de défense mène à des degrés variés de la maladie chez des patients différents (Del Corno et al., 2005).

Le VIH active les pDC directement en stimulant l'expression de molécules co-stimulatrices, de molécules du CMH et de marqueurs de maturation. Cette stimulation augmente l'activité stimulatrice des cellules T et induit la production d'IFN de type 1 et de TNF- $\alpha$ . Une des conséquences de cette activation est la maturation des cellules dendritiques myéloïdes et l'amélioration des fonctions de présentation d'antigènes. Cependant, le

mécanisme d'activation des pDC par le VIH est encore peu connu. Dans l'étude de Bhardwaj, les auteurs démontrent que la production d'IFN par les pDC nécessite au moins deux interactions entre la cellule et le virus (Beignon et al., 2005). Initialement, l'interaction entre l'enveloppe et le CD4 permet l'endocytose du VIH, tel que démontré par l'utilisation d'inhibiteurs de liaison, fusion, endocytose et d'acidification. Puis, les acides nucléiques, particulièrement l'ARN, sont libérés des endosomes et stimulent les pDC via les TLR. Enfin, à l'aide de complémentation génétique, les auteurs démontrent que le TLR7 est la cible primaire (Beignon et al., 2005). L'ARN viral et non l'ADN est le facteur actif du VIH qui induit la sécrétion d'IFN- $\alpha$  chez les pDC. Etant donné que le déclin des pDC lors de l'infection chronique par le VIH est associé à une charge virale élevée et à des infections opportunistes, l'exploitation de cet adjuvant naturel serait un outil utile dans le développement de vaccins contre le SIDA (Beignon et al., 2005).

Les effets inhibiteurs des IPC et de l'IFN de type 1 dérivé des IPC sur la réplication du VIH in vivo ont été démontrés par plusieurs études récentes. Le nombre d'IPC circulant est négativement proportionnel avec la charge virale (Donaghy et al., 2001; Soumelis et al., 2001) Des niveaux élevés d'IPC sont associés à une quantité d'ARN viral très basse, voire indétectable dans le sang alors qu'il y a une corrélation entre les bas niveaux d'IPC et une charge virale élevée (Soumelis et al., 2001). De plus, une étude de Pacanowski ((Pacanowski et al., 2001) a démontré que cette corrélation négative est aussi observée après l'infection primaire là où une baisse des IPC est associée avec une hausse de la réplication virale. Une corrélation similaire existe entre la capacité des PBMC de produire de l'IFN $\alpha/\beta$  et la charge virale (Soumelis et al., 2001).

L'étude de patients séropositifs pendant plus de dix ans sans maladie et sans thérapie, appelés non- progresseurs à long terme (LTNP), a fourni la preuve indirecte que les IPC ont

un rôle dans le contrôle de la réplication du VIH. Les auteurs de cette étude ont trouvé que dans leur cohorte de 24 patients LTNP, les niveaux d'IPC et leur fonction étaient plus élevés que chez les patients avec une maladie plus avancée, les sujets avec le SIDA ou même les sujets séronégatifs (Soumelis et al., 2001).

#### IV. 2. Les effets de l'IFN sur les cellules infectées.

Étant donné que l'infection par le VIH induit une baisse des niveaux d'IFN via la destruction des IPC, et que l'IFN a une fonction de défense antivirale, l'utilisation de l'IFN dans le traitement du VIH est une option attirante. L'IFN- $\alpha$  est déjà utilisé dans le traitement de l'hépatite C et de certaines tumeurs. Plusieurs équipes ont entrepris l'évaluation de l'efficacité et l'innocuité de cette option pour traiter l'infection par le VIH.

Dans l'étude de Shirazi et Pitha (Shirazi and Pitha, 1992), les auteurs ont étudié l'effet de l'IFN- $\alpha$  sur un cycle unique de réplication du VIH dans la lignée cellulaire CEM-174 qui est très sensible aux effets antiviraux des IFN. Le traitement des cellules avec de l'IFN- $\alpha$  recombinant a mené à une baisse de l'ARN viral et des protéines virales. L'inhibition de la synthèse protéique n'était observée qu'avec l'addition de l'IFN avant l'infection ou moins de 10 heures après l'infection. L'analyse du provirus intégré dans le génome a démontré une forte baisse de l'ADN dans les cellules prétraitées avec de l'IFN. Ainsi, contrairement aux études préalables sur l'infection des cellules T, où l'IFN semble bloquer le VIH au niveau post- traductionnel pendant l'infection *de novo*, l'IFN- $\alpha$  perturbe une des premières étapes de la réplication de l'ADN, avant l'intégration de l'ADN proviral. Ces résultats indiquent que l'IFN bloque la réplication du VIH dans des cellules sensibles à l'IFN, et non seulement dans les macrophages (Shirazi and Pitha, 1992).

La même équipe a ensuite démontré que l'inhibition du VIH se produit au niveau de la formation du provirus (Shirazi and Pitha, 1993). À l'aide de PCR, ils ont déterminé que dès 5 heures après l'infection, il y a formation du provirus dans les cellules infectées. Le prétraitement des cellules avec de l'IFN peut réduire considérablement la formation de provirus. Les données démontrent que l'IFN interfère avec l'initiation de la transcription inverse. La réplication est également inhibée par une incubation des cellules avec les extraits cytoplasmiques des cellules traitées avec de l'IFN (Shirazi and Pitha, 1993).

La sécrétion d'IFN par les pDC mène à une réduction de la production du VIH par les cellules CD4+ infectées, ce qui renforce la notion que les pDC ont une activité anti-VIH. Les cellules CD4+ stimulées induisent l'activation et la maturation des pDC. De plus, le marqueur de migration des pDC, CCR7, est augmenté seulement par les cellules CD4+ infectées par le VIH (Schmidt et al., 2005). Cette dernière donnée pourrait expliquer le déclin de pDC en circulation chez les individus infectés. Le fait que le VIH puisse directement infecter les IPC *in vitro* explique également leur déplétion *in vivo*. Ainsi, l'équilibre entre les IPC et la réplication du VIH peut être critique dans le contrôle ou la progression de la maladie (Soumelis et al., 2001).

#### IV. 3. L'IFN et le traitement de l'infection par le VIH chez les patients.

Une étude de l'équipe de De Meyer a développé une méthode de thérapie basée sur la production constitutive d'IFN- $\beta$  (Vieillard et al., 1997). Des lymphocytes du sang périphérique (PBL) de patients infectés par le VIH à divers stades cliniques de la maladie ont été transfectés avec un vecteur rétroviral exprimant de façon constitutive une faible d'IFN- $\beta$ . Dans les PBL de patients ayant un nombre de CD4+ supérieur à 200 par mm<sup>3</sup>, l'IFN- $\beta$  avait un effet protecteur avec une charge virale diminuée et une meilleure survie des cellules

CD4+. Dans les PBL de donneurs sains et infectés, il y a eu une augmentation de la production de cytokines de type Th1 telles que l'IFN- $\gamma$  et l'interleukine -12 (IL12). Dans les PBL de donneurs infectés, la production de IL-4, IL-6, IL-10 et TNF- $\alpha$  est restée normale, alors qu'elle a augmenté dans les PBL non-transfectés. En bref, ils ont démontré qu'en plus d'inhiber la réplication du VIH, la transfection des PBL de donneurs séropositifs améliore plusieurs paramètres de la fonction immunitaire (Vieillard et al., 1997).

Des études impliquant des PBL génétiquement modifiés afin d'exprimer l'IFN- $\beta$  à faible dose démontrent le pouvoir de cette cytokine d'inhiber la réplication du VIH et d'augmenter la réactivité anti-VIH des cellules T, qui est associée à une réponse immunitaire de type Th1 (Vieillard et al., 1997). De plus, les études sur des systèmes cellulaires humains indiquent que l'IFN- $\alpha$  favorise la différenciation de cellules T en Th1 (Rogge et al., 1997; Romagnani, 1992). En conclusion, l'IFN de type 1 est un stimulateur important des fonctions des cellules T. Ceci suggère que l'IFN- $\alpha$  devrait être considéré comme un traitement potentiel de prévention et de thérapie de l'infection par le VIH.

Dans une lignée cellulaire provenant de cellules Vero dans laquelle a été intégré le gène de l'IFN $\alpha$ 2 sous le contrôle du LTR du VIH, la réplication du virus est complètement inhibée (Bednarik et al., 1989). Dans des cellules Jurkat, l'IFN inhibe la croissance des cellules en limitant la reproduction virale au sein de ces cellules. Dans d'autres lignées, les effets sont différents et l'inhibition de la réplication virale se fait dans la phase plus tardive du cycle viral. Le mécanisme d'action n'est toujours pas connu et dépend de la lignée utilisée (Smith et al., 1991).

Les cellules transfectées avec un mutant négatif dominant de IRF-8, un répresseur d'IRF-1, qui inhibe l'activation des ISG en se liant à l'ISRE mais ne permettant pas leur transcription, sont réfractaires à l'infection par le VIH. L'assemblage des virions ne se fait pas correctement dans ces cellules. De plus, l'activité de IRF-1 est fortement inhibée et l'infection par le virus de la stomatite vésiculaire, (VSV) n'induit pas la production d'IFN. Ce résultat démontre l'importance de IRF-1 dans l'activation du LTR viral (Thornton et al., 1996).

Des études ont indiqué l'existence de plusieurs mécanismes différents par lesquels l'IFN peut affecter le cycle infectieux du VIH selon la cible et la cinétique de l'ajout de l'IFN ou du VIH dans les cellules (Lapenta et al., 1999). Des études cliniques où des patients séropositifs ont été traités à l'IFN seul ou en combinaison avec d'autres traitements (Fernandez-Cruz et al., 1995; Frissen et al., 1994; Skillman et al., 1996) ont été faites. Des résultats positifs ont été observés dans certains de ces essais, surtout lors de traitements rigoureux en début d'infection mais aucun consensus n'a été établi à l'issue de ces essais sur l'utilisation de l'IFN comme traitement dans l'infection par le VIH. Ainsi, le rôle de cette cytokine dans la pathogenèse de l'infection au VIH est toujours sujet à spéculation.

D'autres études ont démontré que la transduction du gène de l'IFN- $\beta$  dans des lymphocytes du sang périphérique mène non seulement à l'inhibition de la réplication du VIH mais aussi au développement d'une immunité protectrice par le biais des cellules T (Lapenta et al., 1999). Cette étude démontre que l'IFN de type 1 est un puissant suppresseur de la réplication du VIH dans les cellules humaines transplantées dans des souris SCID et peut protéger les cellules T CD4+ des effets néfastes induits par l'infection virale. Dans cette étude, même les niveaux endogènes très bas d'IFN- $\alpha$  et - $\beta$  sont efficaces pour l'inhibition de la réplication du VIH (Lapenta et al., 1999).

Une étude démontre que des macrophages dérivés de cellules du cordon ombilical peuvent être facilement transfectées par un vecteur rétroviral renfermant la séquence codante de l'IFN- $\beta$ . Ceci mène à la résistance à l'infection par une souche du VIH qui cible les macrophages. De plus, la transduction d'IFN- $\beta$  bloque totalement la sécrétion de cytokines proinflammatoires suite à l'infection au VIH. L'expression constitutive d'IFN- $\beta$  conduit à une augmentation de la production d'IL12, d'IFN-gamma et de RANTES (Cremer et al., 2000). RANTES semble être impliqué dans la résistance de l'hôte au VIH, et est lié à une baisse du corécepteur CCR5. Ces résultats démontrent la faisabilité et l'efficacité de thérapies géniques utilisant l'IFN- $\beta$ . En plus d'inhiber la réplication du VIH, la transduction d'IFN- $\beta$  peut avoir des effets bénéfiques sur le système immunitaire des patients infectés par le VIH en favorisant les réponses immunitaires cellulaires (Cremer et al., 2000).

Les interférons ont un effet prononcé sur la réplication du VIH dans les macrophages humains primaires. Une étude a démontré que l'effet majeur de l'IFN est de réduire la production d'ADN viral en début d'infection (Meylan et al., 1993).

Il existe deux réservoirs importants du VIH chez les patients traités efficacement par la thérapie HAART : les cellules du CNS et les cellules CD4+. Des travaux ont tenté d'augmenter la production d'IFN $\alpha$ 2 dans les cellules du CNS. Le gène de l'IFN $\alpha$ 2 est introduit à l'aide d'un vecteur SV40 dans les cellules du CNS et se trouve sous le contrôle du LTR du VIH-1. Les expériences ont démontré l'efficacité de cette thérapie dans la protection des cellules (Cordelier et al., 2003).

L'IFN- $\alpha$  pourrait également avoir des effets inhibiteurs sur l'interaction entre les monocytes et les lymphocytes T impliqués dans la stimulation des lymphocytes par l'antigène. Cependant, bien que l'IFN ait des effets antiprolifératifs contre les lymphocytes infectés par le VIH, des thérapies basées sur l'immunisation contre l'IFN- $\alpha$  ont aussi été bénéfiques (Gringeri et al., 1995). De plus, des études ont démontré que chez certains patients en stade avancé de la maladie liée au VIH, les niveaux d'IFN et des marqueurs de la fonction d'IFN étaient élevés (Francis et al., 1992; Stylianou et al., 2001). En outre, il se pourrait que l'IFN- $\alpha$  puisse inhiber la production de certaines cytokines ayant des effets antiviraux chez les patients infectés par le VIH (Zagury et al., 1998). Ainsi, bien que l'IFN ait des effets antiviraux sur le VIH, ses effets sont accompagnés d'autres conséquences néfastes sur les défenses immunitaires. Aussi, en dépit de ces effets importants sur la modulation du réseau de cytokines, il est primordial d'étudier en profondeur les actions complexes de l'IFN sur les patients infectés par le VIH ainsi que sur des patients d'autres catégories.

Malheureusement, les résultats de ces nombreuses études sont contradictoires et controversés. Certaines études ont démontré une augmentation, alors que d'autres ont démontré une baisse de la production d'IFN suite à l'infection par le VIH. Ainsi, il n'est pas surprenant que les thérapies complètement opposées sur l'utilisation de l'IFN aient été proposées. D'un côté, nous avons des thérapies supplémentées d'IFN synthétique et de l'autre, des thérapies basées sur la vaccination contre l'IFN. À court terme, il est évident que le traitement de cellules avec de l'IFN diminue la production virale mais les conséquences d'un traitement avec cette cytokine à long terme demeurent inconnues. De plus, ces études mettent en évidence la complexité de ce système biologique ainsi que la nature

multifactorielle de la maladie du SIDA. Les différents stades de la maladie, les traitements en cours et les infections opportunistes sont des facteurs qui pourraient être responsables de résultats différents de ces études *in vivo*. Aussi, dans la plupart des études *in vitro*, les lignées cellulaires utilisées étaient des lignées tumorales qui ont déjà un dysfonctionnement au niveau de la cascade de l'IFN afin d'assurer une croissance continue. Après avoir fait une analyse de la littérature, on s'aperçoit de la nécessité d'en savoir plus sur l'interaction entre le VIH et le système de l'IFN des cellules de l'hôte.

**OBJECTIFS**

---

Nos objectifs sont de déterminer les effets de l'infection par le VIH sur l'activation et le fonctionnement de la cascade de l'interféron dans un contexte cellulaire ainsi que d'identifier les gènes du VIH nécessaires pour cette fonction. Plus spécifiquement, nous voulons définir les effets du VIH sur l'induction de l'interféron ainsi que sur l'état antiviral induit par l'interféron.

**MATÉRIELS ET MÉTHODES:**

## **I. Culture cellulaire:**

Toutes les cellules utilisées lors de nos expériences ont été cultivées dans des incubateurs humidifiés maintenus à 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub>. La concentration des cellules était maintenue entre 0.5 x 10<sup>6</sup> et 2 x 10<sup>6</sup> cellules par millilitre. Les cellules ont été cultivées soit dans un milieu RPMI complet, pour les cellules en suspension soit dans un milieu DMEM complet, pour les cellules adhérentes. Le milieu RPMI complet consiste en du RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) contenant 300 mg/L de L-glutamine (Gibco Invitrogen, cat. # 11875-093), additionné de 10 % de sérum fœtal bovin (Gibco cat. #12318-028), d'antibiotiques et d'antimycosiques (Dans 100 ml de milieu de culture : 100 unités de pénicilline, 100 µg de streptomycine, 0.25 µg de amphotéricine; Gibco cat. # 15240-062). Le milieu DMEM complet consiste en du DMEM (Gibco, Invitrogen cat. # 11965-092) également additionné de 10 % sérum bovin fœtal, d'antibiotiques et d'antimycosiques (même concentration que dans le milieu RPMI complet).

Les lignées cellulaires que nous avons utilisées sont décrites ci-dessous :

H9 est une lignée cellulaire humaine, infectable par le HIV-1 (provenance : ATCC cat. # HTB 176). Il s'agit de lymphocytes T cutanés, dérivés de la lignée Hut 78. La lignée H9 se cultive dans du RPMI complet (Mann et al., 1989). Cos 7 est une lignée cellulaire de fibroblastes provenant du rein de singe vert africain (provenance : ATCC cat. # CRL 1651). Elle se cultive dans du DMEM complet, (Gluzman, 1981). La lignée Jurkat est composée de cellules lymphoblastoïdes humaines provenant de lymphocytes T (Provenance : ATCC cat. # TIB 152). Elles se cultivent dans du RPMI complet (Schneider et al., 1977). Les cellules THP 1 représentent une lignée humaine monocyttaire provenant du sang périphérique. Elles se cultivent dans du RPMI complet. ATCC cat. # TIB 202, (Tsuchiya et al., 1980). La lignée

humaine monocytaire U-937 (provenance : ATCC cat. # CRL 1593.2) se cultive dans du RPMI complet (Sundstrom and Nilsson, 1976). Les cellules Molt 4 (provenance : ATCC cat. # CRL 1592) sont des lymphoblastoïdes humaines provenant de lymphocytes T. Elles se cultivent dans du RPMI complet (Minowada et al., 1972).

## **II. Isolation des PBMC**

Du sang humain prélevé dans des tubes héparinés est dilué dans du RPMI (1 volume de sang pour 3 volumes de RPMI). Trente millilitres de sang dilué sontt ajoutés délicatement à un tube contenant 10 ml de Ficoll-Paque PLUS (Amersham biosciences, cat. # 17-1440-02, Uppsala, Suède) en prenant garde de ne pas mélanger les deux phases. Les tubes de sang et de Ficoll sont centrifugés à 300 x g pendant 25 minutes à la température de la pièce. L'anneau de cellules présentes à l'interphase entre le Ficoll et le RPMI est constitué de PBMC. Les cellules sont prélevées à l'aide d'une pipette puis lavées et comptées.

## **III. Identification et propagation des plasmides.**

Afin de surexprimer certaines protéines, nous avons utilisé des vecteurs d'expression. Pour l'expression d'IRF-3 et IRF-7, nous avons utilisé le vecteur d'expression mammifère p-Flag-CMV-1 (Sigma, cat. # 7398) dans lequel a été cloné le gène de l'IRF-3 et celui de l'IRF-7 (p-Flag-IRF-3 et p-Flag-IRF-7 respectivement). La protéine qui résulte de l'expression de ce vecteur est une protéine de fusion (le peptide FLAG se trouve fusionné au N-terminus de IRF-3 ou de IRF-7) qui réside dans le cytoplasme. Le gène cloné dans le site de clonage multiple de pFLAG-CMV-1 se trouve sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus

(CMV). Le plasmide contient également le gène de résistance à l'ampicilline pour la croissance dans les bactéries.

Le plasmide NL4.3 représente le génome d'un isolat du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Il se trouve sous la forme d'un plasmide circulaire qui s'exprime dans les cellules mammifères.

Bactéries utilisées pour les transformations :

Les plasmides utilisés ont préalablement été amplifiés dans des bactéries compétentes DH5 $\alpha$  "Subcloning Efficiency DH5 $\alpha$  Competent Cells" achetées chez Invitrogen (cat. # 18265-017)

Transformation des bactéries :

La transformation des bactéries se fait selon le protocole du manufacturier, comme suit. Les bactéries sont toujours entreposées sur de la glace et sont manipulées avec délicatesse. En bref, le tube de bactéries est décongelé sur glace. Pour chaque transformation, 50  $\mu$ l de bactéries sont mélangés délicatement à 10 ng d'ADN. Les tubes contenant les bactéries et l'ADN sont incubés d'abord sur glace pendant 30 minutes, puis à 37 °C pendant 20 secondes puis sur glace à nouveau pendant 2 minutes. 950  $\mu$ l de milieu de culture SOC (contenant 20 mM de glucose, ainsi que de l'extrait de levure (0.5 % w/v), de la bactotryptone (2 % w/v), du chlorure de sodium (0.5 g dans 1L) du potassium (2.5 mM) et de l'acétate de sodium) préchauffés à 37 °C sont ajoutés à chaque tube et les tubes sont incubés à 37°C pendant 1 heure avec agitation. 2 volumes (20  $\mu$ l et 200  $\mu$ l) de chaque transformation sont étalés sur des boîtes de Pétris contenant de la gélose de LB et de l'ampicilline (50  $\mu$ g/ml). Les boîtes sont placées à 37 °C pendant 24 heures.

#### **IV. Miniprep ou Lyse et extraction de plasmide par lyse alcaline.**

Après avoir amplifié les bactéries transformées, nous avons voulu extraire l'ADN de ces bactéries. Parmi les colonies de bactéries transformées (dans les boîtes de Pétris), dix sont choisies au hasard. Ces dix colonies sont piquées à l'aide d'un embout de pipette de 200  $\mu$ l qui est ensuite placé dans 1 ml de milieu de culture LB contenant 50  $\mu$ g/ml d'ampicilline dans un tube en polypropylène avec bouchon ventilé de 15ml. Le tube est placé dans un incubateur sec à 37 °C pendant 8-24 heures. 100  $\mu$ l de ce bouillon de culture sont ensuite prélevés de ce tube et ajoutés à 20 ml de LB contenant 50  $\mu$ g/ml d'ampicilline dans un flacon ErlenMeyer stérile de 100 ml. La présence de l'antibiotique permet de sélectionner la croissance exclusive des bactéries transformées par le plasmide qui contient le gène de résistance à l'ampicilline. L'extraction du plasmide des bactéries se fait par la technique de lyse alcaline, selon le protocole décrit dans Sambrook, 1989). Dix millilitres de chaque transformation sont prélevés et centrifugés à une vitesse de 500 x g à 4 °C et le surnageant est aspiré et jeté. Le culot contenant les bactéries est remis en suspension dans 200  $\mu$ l de solution I froide (50 mM de glucose, 25 mM de Tris-Cl, 10 mM d'EDTA). Ensuite, on ajoute 400  $\mu$ l de solution II (0.2 N de NaOH et 1 % SDS) et 300  $\mu$ l de solution III (5 M en acétate et 3 M en potassium) pour lyser les cellules. Après une courte incubation, le lysat est centrifugé et 700  $\mu$ l du surnageant est transféré à un nouveau tube. Afin d'enlever les protéines qui pourraient être présentes dans ce lysat, 700  $\mu$ l d'un mélange de phénol chloroforme (1 :1) sont ajoutés à chaque tube qui est ensuite agité pendant 2 minutes. Suite à une centrifugation à la vitesse maximale dans une micro-centrifugeuse pendant 2 minutes à 4 °C, on observe dans le tube une séparation de deux phases. Le plasmide se trouve dans la phase aqueuse, phase supérieure, qui est récupérée puis transférée à un nouveau tube. Afin de récupérer les acides nucléiques, on ajoute un volume égal (700  $\mu$ l) d'isopropanol à 100 % et le tube est

centrifugé à vitesse maximale pendant 5 minutes à 4 °C. Le culot qui se forme dans le tube lors de la centrifugation est composé d'acide nucléique et de sels. L'ADN précipité est ensuite remis en suspension dans de l'éthanol à 70 % afin de dissoudre les sels puis est à nouveau précipité par centrifugation. L'ADN est remis en suspension dans de TE (10 mM de Tris-Cl et 1 mM d'EDTA à un pH de 8.0).

## **V. Transfection**

Afin de surexprimer les protéines des gènes clonés dans les vecteurs (IRF-3 et IRF-7), les plasmides ont été transfectés dans des cellules de mammifères par une technique qui implique la formation de liposomes renfermant l'ADN qui se fusionnent ensuite à la membrane des cellules cibles (Invitrogen). La transfection des cellules adhérentes est effectuée avec le réactif DMRIE-C (Cat. # 10459-014, Invitrogen), selon le protocole du fournisseur. Pour chaque transfection, nous avons utilisé 2 µg d'ADN et 8 µl de réactif DMRIE-C.

## **VI. Immunobuvardage (Western blot)**

Afin de détecter et d'identifier les protéines exprimées par les cellules transfectées, nous avons extrait les protéines des cellules, puis utilisé la technique d'immunobuvardage (aussi appelée Western blot). Les cellules traitées ont été récoltées, lavées deux fois avec du PBS froid et placées dans des micro-tubes stériles. Après une brève centrifugation, le culot cellulaire est remis en suspension dans 5 volumes de tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases afin de préserver les protéines dans leur état naturel. Les inhibiteurs proviennent de la compagnie Sigma (Protease inhibitor cocktail, cat.

# P8340, Phosphatase inhibitor cocktail I, cat.# P2850, Phosphatase inhibitor cocktail II, cat.# P5726 ; Sigma, St Louis, MI) et sont sous la forme de mélanges de plusieurs inhibiteurs. Le tout est ensuite traité au sonicateur (Branson Sonifier 450, Kyonggi-do, Corée) équipé d'une micro pointe pendant 20 secondes à la puissance 6 sur un cycle constant. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 21000 g pendant 15 minutes à 4 °C.

La concentration relative de protéines de chaque échantillon est ensuite évaluée grâce au kit de Pierce (Rockford, IL) « BCA Protein Assay kit ». Le principe de ce kit est basé sur la détection et la quantification des protéines par colorimétrie à l'aide de l'acide bicinchroninique (BCA). L'absorbance des échantillons est proportionnelle à la quantité de protéine comprise dans les lysats. Tous les échantillons sont ramenés à la même absorbance par dilution (celle du moins concentré). Une fois que les concentrations ont toutes été ajustées et que le volume a été ramené à 30  $\mu$ l, on ajoute 30  $\mu$ l d'une solution de 4/5 de tampon de chargement de gel (gel-loading buffer) et 1/5 de DTT (le dithiothreitol sert à réduire la formation de ponts disulfures) à 1M pour obtenir une concentration finale de 0.2 M. Les tubes sont ensuite plongés dans de l'eau bouillante pendant 5-10 minutes.

Nous avons ensuite chargé 20  $\mu$ l (30-40  $\mu$ g de protéines) de chaque échantillon dans un gel d'acrylamide de 8 à 12 %, tel qu'indiqué et selon l'expérience, ainsi que 10  $\mu$ l d'un marqueur de poids moléculaire. Un voltage de 115 V est appliqué au gel pendant 1 heure et 15 minutes pour faire migrer les échantillons de protéines.

Les protéines sont transférées du gel à une membrane en PVDF (Polyvinylidene fluoride; aussi appelé Immobilon P; cat. # IPVH 00010 Milipore, Billerica, Massachussets)

par la méthode de transfert semi liquide. 20 V sont appliqués pendant 25 minutes pour effectuer ce transfert.

La membrane est incubée 10 minutes dans une solution de Ponceau 10 X (2 % Ponceau S, 30 % w/v acide trichloro-acétique, 30 % w/v acide sulfosalicylique) afin de visualiser les protéines et de s'assurer que le transfert ait été efficace. Elle est ensuite bien rincée avec de l'eau et placée dans une solution de blocage (5 % de lait en poudre dans du PBS) pendant 2-3 heures à la température de la pièce. Après le blocage, la membrane est placée dans une solution de blocage fraîche contenant l'anticorps primaire. L'incubation avec l'anticorps primaire se fait à 4 °C pendant toute une nuit. Suite à cette incubation, la membrane est lavée trois fois à raison de 5-10 minutes par lavage dans une solution de PBST (PBS contenant 0.05 % de Tween 20 (Promega)). Un anticorps secondaire spécifique à l'anticorps primaire et couplé à l'alcaline phosphatase est ajouté à une solution de blocage dans laquelle la membrane est incubée pendant 4 heures à la température de la pièce. La membrane est à nouveau lavée dans du PBST trois fois pendant 5-10 minutes. Puis, la membrane est placée dans une solution révélatrice contenant 33 µl de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) et 66 µl de NBT (Nitro-Blue Tetrazolium) (Promega Cat. # S3771) dans 10 ml de tampon AP (0.1 M Tris-Cl pH 9.5, 0.1 M NaCl et 5 mM) tel que recommandé par la compagnie. Cette incubation s'effectue dans la noirceur jusqu'à ce que les bandes de protéines deviennent visibles (5-10 minutes généralement). La réaction est arrêtée en plongeant la membrane dans l'eau.

## **VII. Extraction des protéines cytoplasmiques et nucléaires :**

Dans certains cas, nous avons préféré d'extraire les cellules du cytoplasme séparément de celles du noyau. Pour ce faire, un protocole d'extraction des protéines différent est utilisé. Cinq à dix millions de cellules traitées sont lavées dans du PBS et centrifugées à 8000 rpm pendant 5 minutes à 4 °C. Le culot de cellules est ensuite remis en suspension dans 5 volumes (environ 50 µl) de tampon de lyse hypotonique (la recette se trouve dans l'annexe 2) à l'aide de la pipette et incubé sur de la glace pendant 30 minutes. Les tubes sont à nouveau centrifugés à 500 x g pendant 5 minutes à 4 °C. Le surnageant, qui constitue la fraction cytoplasmique (« C ») est transféré dans un nouveau tube puis gardé sur de la glace. Le culot, qui est composé des noyaux cellulaires, est dissout dans 5 volumes (environ 40-50 µl) de tampon de lyse hypertonique (à une concentration élevée en sels) à l'aide d'une pipette et est incubé sur de la glace pendant 30 minutes à 2 heures. Les tubes sont centrifugés à 14 000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C et le surnageant, qui constitue la fraction nucléaire (« N »), est transféré dans un nouveau tube.

## **VIII. Anticorps utilisés.**

Pour la détection de nos protéines d'intérêt parmi les protéines cellulaires extraites, nous avons utilisé les anticorps suivants :

Anti-IRF-3 polyclonal de lapin, sous la forme d'IgG purifiés; cat. # SC9082. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.

Anti-IRF-7 polyclonal de lapin, sous la forme d'IgG purifiés; cat. # SC9083. Une dilution de 1 :500 a été utilisée pour ces deux anticorps polyclonaux.

Anti-IRF-3 monoclonal de souris, isotype IgG1; cat. # 39513. Active Motif, Carlsbad, CA,  
Utilisé avec une dilution de 1 : 2000

Les anticorps secondaires sont constitués d'IgG purifiés dirigés contre la chaîne lourde des IgG de lapins (Promega, cat. # S3731) ou de souris (Promega, cat. # S3721) conjugués à l'alkaline phosphatase. Les deux anticorps secondaires ont été utilisés avec une dilution de 1 : 500.

### **IX. Production du virus Sendai**

Le virus Sendai est un virus de la famille des paramyxovirus qui infecte majoritairement les rongeurs. Cependant, on sait que ce virus peut activer IRF-3 et induire la production d'IFN même dans les cellules humaines (Servant et al., 2001). C'est pourquoi nous avons décidé de nous en servir comme stimulus d'activation d'IRF-3. Pour produire le virus Sendai en laboratoire, nous avons suivi un protocole tiré de la littérature (Kato et al., 1997). Des œufs de poulet embryonnés de 9 à 10 jours ont été injectés grâce à une seringue tuberculine dans la chambre allantoïque avec 0.1 ml de solution contenant du virus Sendai ou du PBS (contrôle négatif). Une fois les trous bouchés avec de la cire, les œufs ont été incubés pendant 2 à 2.5 jours à 37 °C, puis à 4 °C pendant 24 heures. À l'aide d'une pipette, 5ml de liquide chorio-allantoïque a été prélevé. Le virus a en suite été récolté par centrifugation, remis en suspension dans du RMPI puis concentré 30 fois. Le virus a été stocké à -80 °C. Les œufs servant de contrôles négatifs ont été traités de la même façon que les autres œufs. Afin de pouvoir effectuer cette expérience, nous avons obtenu une permission du comité de biosécurité de l'Hôpital Ste Justine en raison du risque que pose le virus aux rongeurs de l'animalerie. L'activité du virus concentré a été vérifiée par un test de fusion d'érythrocytes. Une solution de 2.5 % d'érythrocytes a été préparée à partir de 2.5 ml de sang frais : 2.5 ml

de PSB froid ont été ajoutés aux 2.5 ml de sang et le mélange a été centrifugé à 300 x g dans des tubes de 15 ml. Ensuite, les érythrocytes sédimentés ont été récupérés et lavés avec du PBS puis dilués en une concentration de 2.5 % dans du PBS froid. 40 µl de cette préparation ont été dispensés dans les puits d'une plaque de 96 puits auxquels ont été ajoutés 5 µl de plusieurs dilutions du virus Sendai. La plaque est ensuite observée au microscope. Dans les puits où le surnageant est rouge et le fond du puit rouge foncé, il y a eu une fusion des érythrocytes.

#### **X. Production du VIH :**

La production du virus s'est faite par la transfection du plasmide NL4.3 contenant le génome complet du VIH dans des cellules adhérentes Cos-7. La transfection a été effectuée à l'aide du DMRIE-C, de la compagnie Invitrogen, avec 2 µg d'ADN et 8 µl de réactif DMRIE-C par réaction, selon le protocole du fabricant.

#### **XI. Infection par le virus Sendai.**

Les cellules sont centrifugées afin d'effectuer cette infection dans un volume minimal de Sendai. 200 µl de virus concentré (ou de mock) est ajouté au culot de 5-7 millions de cellules. Le mélange de cellules et de virus est agité toutes les 15 minutes pendant 1 heure, puis on rajoute 10 ml de milieu RPMI frais complet préchauffé à 37 °C.

#### **XII. Infection par le virus HIV-1**

Le surnageant de cellules Cos-7 préalablement transfectées par le plasmide NL4.3 est filtré à l'aide d'une membrane aux pores de 0.22 µm de diamètre. 2 ml de surnageant sont

utilisés pour infecter un culot cellulaire de 5-10 millions de PBMC dans un volume minimal. Les cellules infectées sont incubées à 37 °C pendant 1 heure avec agitation toutes les 15 minutes. L'infection se fait en présence de 8 µg/ml de polybrène. Le polybrène a pour effet de faciliter l'adsorption du virus sur les membranes des cellules cibles (Davis et al., 2002) et est souvent utilisé lors d'infections pour en augmenter l'efficacité. On ajoute ensuite 10 ml de milieu de culture complet et les cellules sont à nouveau incubées à 37 °C pendant 24 ou 48 heures.

### **XIII. Traitement des cellules avec le poly (I; C).**

Pour chaque traitement,  $5 \times 10^6$  de cellules ont été incubées dans 1 ml de milieu RPMI complet (10 % de sérum et antibiotiques, tel que mentionné ci-dessus) contenant 10 µg/ml de poly (I; C) (Amersham biosciences, cat. # 27-7880-01, Uppsala, Sweden) pendant le temps spécifié. Lorsque le traitement dure plus de 30 minutes, le tube contenant les cellules et le poly (I ; C) est agité toutes les demi- heures.

### **XIV. Extraction de l'ARN total.**

L'ARN total est extrait des cellules à l'aide du kit d'extraction de Qiagen (RNeasy mini kit, cat.# 74104) selon le protocole fourni. L'ARN est ensuite remis en suspension dans un petit volume d'eau traitée pour éliminer les ARNases. L'ARN est quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre.

## **XV. Production de la sonde radioactive**

La sonde est produite à l'aide du kit « AmpoLabeling » de SuperArray (Frederick, Maryland) selon les instructions du protocole fourni par SuperArray. Nous avons utilisé 4 µg d'ARN pour chacune des sondes et les sondes ont été préparées avec du  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP pour une détection de la radioactivité.

## **XVI. Hybridation de la sonde à la membrane, numérisation et analyse**

La membrane de type GEArray Q séries de la compagnie SuperArray (Cat. # HS-054 SuperArray) contient des oligomères spécifiques à 96 gènes impliqués dans la cascade de l'interféron. Pour chaque gène, les oligomères sont imprimés en quatre exemplaires ensembles afin d'assurer une reproductibilité et une fiabilité des données obtenues. L'hybridation de la sonde radioactive (produite avec le kit « AmpoLabeling ») a été effectuée selon les instructions du protocole fournies avec les membranes. Nous avons incubé la sonde et la membrane ensemble pendant 24 heures à 65 °C puis exposé la membrane pendant 48 heures à un écran conçu pour le phosphore (Kodak) (nous avons numérisé la membrane après 48 heures et re-exposé 24 heures supplémentaires si le signal était trop faible). Nous avons utilisé le numériseur STORM 860 Molecular Imager (Molecular Dynamics) et le programme ImageQuant TL. Grâce au logiciel ImageQuant TL, nous avons quantifié l'intensité du signal à chaque point de la membrane. Le signal qui se trouve au niveau de chaque gène sur la membrane est ensuite comparé à la moyenne du signal des gènes contrôles : le GAPDH, l'actine, la cyclophiline A et la protéine ribosomale L13 (Ribosomal protein L13) afin de déterminer une valeur d'expression relative. La valeur d'expression relative est comparée à la valeur d'expression relative du même gène sur la membrane des cellules contrôles.

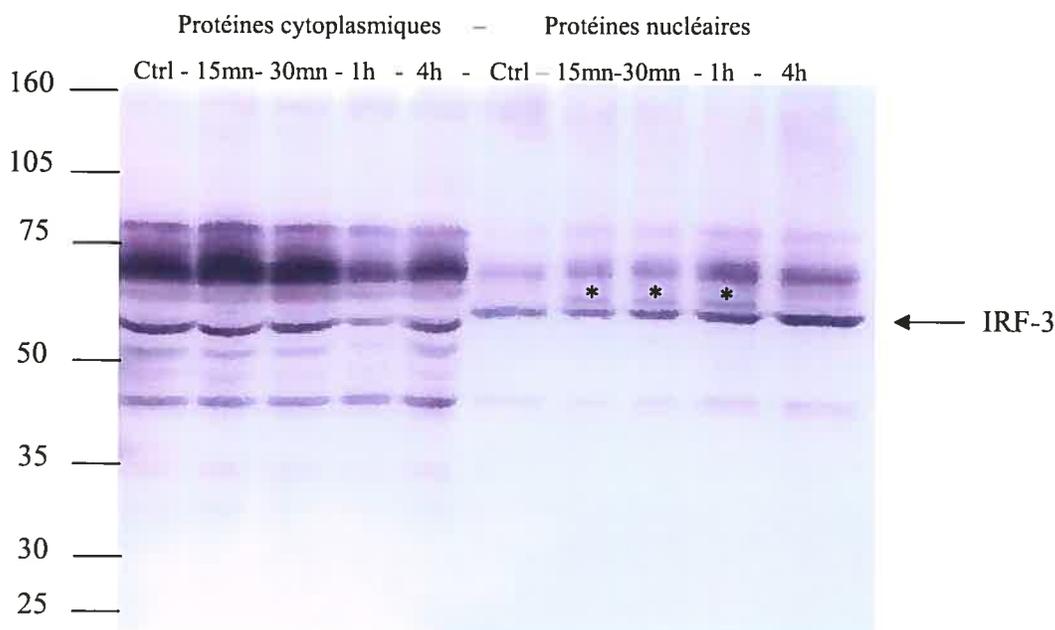
**RÉSULTATS:**

---

*Activation de IRF-3 et de IRF-7 par le Virus Sendai* : Étant donné que des études précédentes ont utilisé le virus Sendai (SeV) pour activer IRF-3 dans des cellules U937 (Servant et al., 2001), nous avons décidé de nous servir de ce modèle pour induire l'activation de IRF-3 dans ces cellules. Notre but était d'utiliser ce modèle pour étudier l'effet de l'infection par le VIH sur l'activation de ce facteur régulateur. D'après l'étude mentionnée, IRF-3 existe sous quatre formes : deux formes phosphorylées et deux formes non phosphorylées. Ces quatre formes apparaissent comme quatre bandes proches mais distinctes par buvardage Western à l'aide d'un anticorps polyclonal. De plus, suite à son activation, IRF-3 se déplace du cytoplasme vers le noyau de la cellule, ce qui se traduit par une disparition progressive d'IRF-3 dans le cytoplasme et une apparition dans le noyau. Ainsi, des cellules U937 ont été traitées avec du SeV pendant des temps d'incubations variables allant de 15 minutes à 4 heures. Le contrôle négatif provient du fluide allantoïque d'œufs injectés avec du PBS comme décrit dans la section « Matériels et méthodes ». Les cellules traitées avec le contrôle négatif l'ont été pendant 4 heures. Les protéines ont été extraites séparément du cytoplasme et du noyau. Les membranes ont été incubées avec des anticorps polyclonaux anti-IRF-3 et anti-IRF-7 tel que décrit dans la section « Matériels et méthodes » et ont été révélées avec le BCIP et NBT. Les résultats sont illustrés dans les Figures 6 et 7. Selon la littérature, IRF-3 migre à une position d'environ 55 kDa et IRF-7 à une position d'environ 69 kDa. Comme nous pouvons le voir dans les Figures 6 et 7, les patrons de migration du lysat des cellules traitées et des cellules non- traitées sont similaires, et il ne semble pas y avoir de transport des protéines du cytoplasme vers le noyau. On observe par contre la présence d'une bande dans les fractions nucléaires au dessus de 55 kDa dans les échantillons pris entre 15 minutes et 1 heure (mise en évidence par une étoile) qui pourrait représenter une forme phosphorylée d'IRF-3 telle que décrite dans la littérature.

Cependant, l'apparition de cette bande n'est pas accompagnée d'une disparition progressive de la bande de poids moléculaire inférieur et lors d'expériences successives, sa présence n'est pas systématique. Dans la Figure 7, IRF-7 est décelé dans le cytoplasme et non dans le noyau, indiquant qu'il est présent dans sa forme inactive seulement. L'absence de translocation d'IRF-3 et d'IRF-7 du cytoplasme au noyau et l'impossibilité d'obtenir de façon reproductible une bande d'IRF-3 de poids moléculaire plus élevé indiquent que dans les conditions testées, il n'y a pas eu de phosphorylation de IRF-3 (Figure 6) ni de IRF-7 (Figure 7).

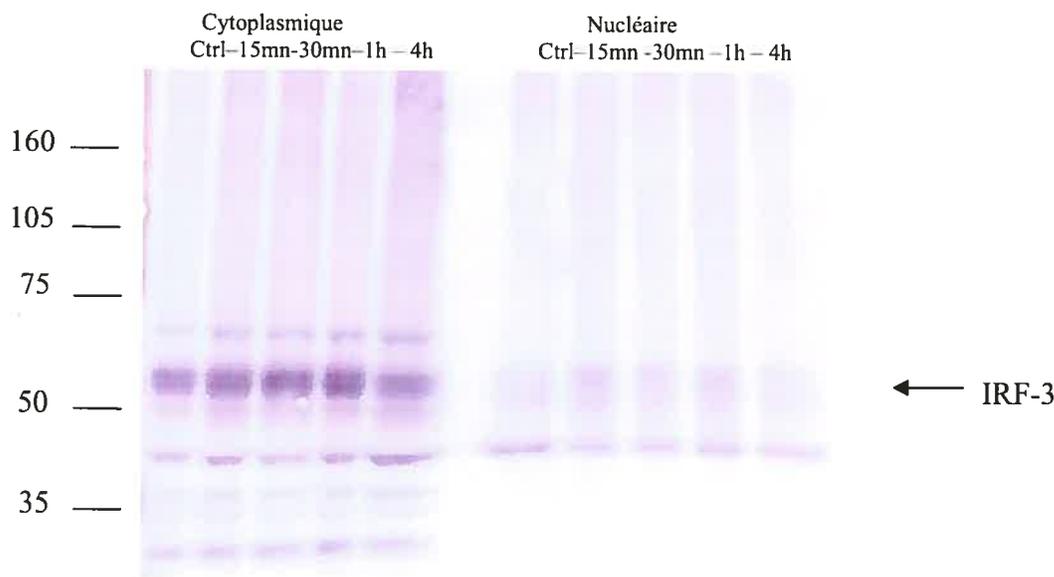
**Figure 6 : Activation de IRF-3 induite par le virus Sendai.**



Les cellules U937 ont été traitées avec du virus Sendai pendant les temps indiqués. Les protéines ont été extraites séparément du cytoplasme et du noyau puis migrées sur un gel d'acrylamide de 12% et ont été transférées à une membrane en PVDF. La membrane a été incubée avec un anticorps primaire anti-IRF-3 et un anticorps secondaire anti-lapin, couplé à l'alkaline phosphatase. On s'attend à ce que la protéine IRF-3 se manifeste autour de 55 kiloDaltons (kDa) (la position est mise en évidence par la flèche).

migration d'IRF-3 du cytoplasme vers le noyau, indiquant que dans les conditions testées, l'activation d'IRF-3 n'a pas pu être mise en évidence.

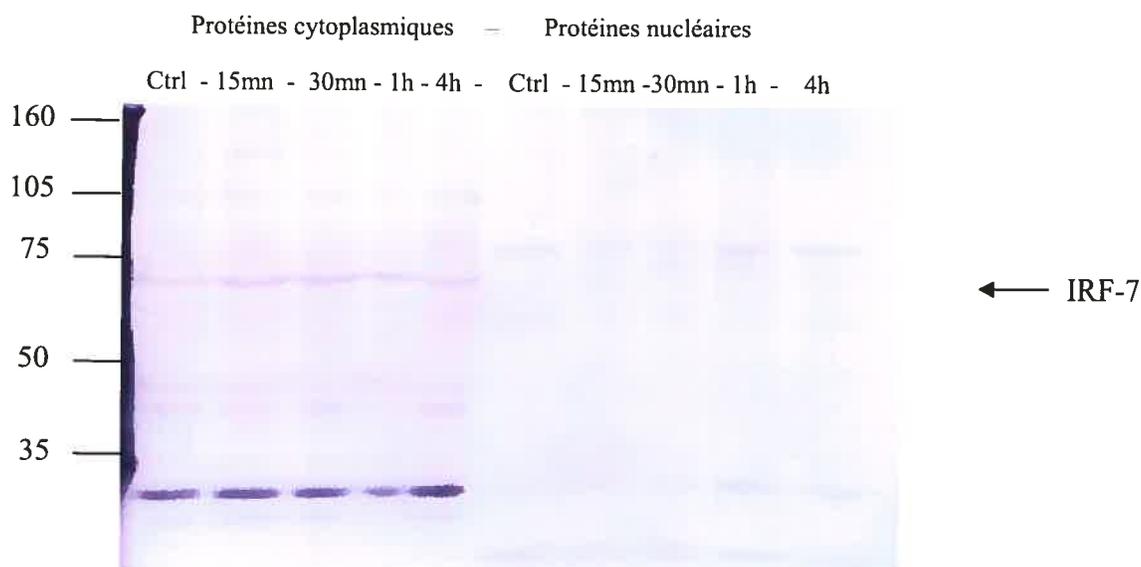
**Figure 8:** Activation de IRF-3 avec le Poly (I: C):



Les cellules U937 ont été traitées avec du Poly (I;C) pendant les temps indiqués ci-dessus. L'échantillon Ctrl représente le contrôle négatif. La membrane de PVDF a été incubée avec un anticorps primaire anti-IRF-3 et un anticorps secondaire anti-lapin, couplé à l'alkaline phosphatase.

Tentatives de résolutions :

*Utilisation d'un anticorps monoclonal à la place de l'anticorps poly clonal.* Nous avons donc décidé de répéter l'expérience avec un autre anticorps souvent utilisé par d'autres équipes pour la détection de l'activation d'IRF-3. Nous avons aussi pensé que l'utilisation d'un anticorps monoclonal éliminerait en grande partie le signal non- spécifique et nous permettrait de visualiser plus clairement les bandes spécifiques à l'IRF-3 dans ses quatre formes : deux formes phosphorylées et deux formes non phosphorylées. Nous avons donc traité des cellules avec le SeV et avec un contrôle négatif pendant 8 heures. Nous avons ensuite extrait les protéines cellulaires que nous avons analysées par Western blot. Une des

**Figure 7 : Activation de IRF-7 induite par le virus Sendai.**

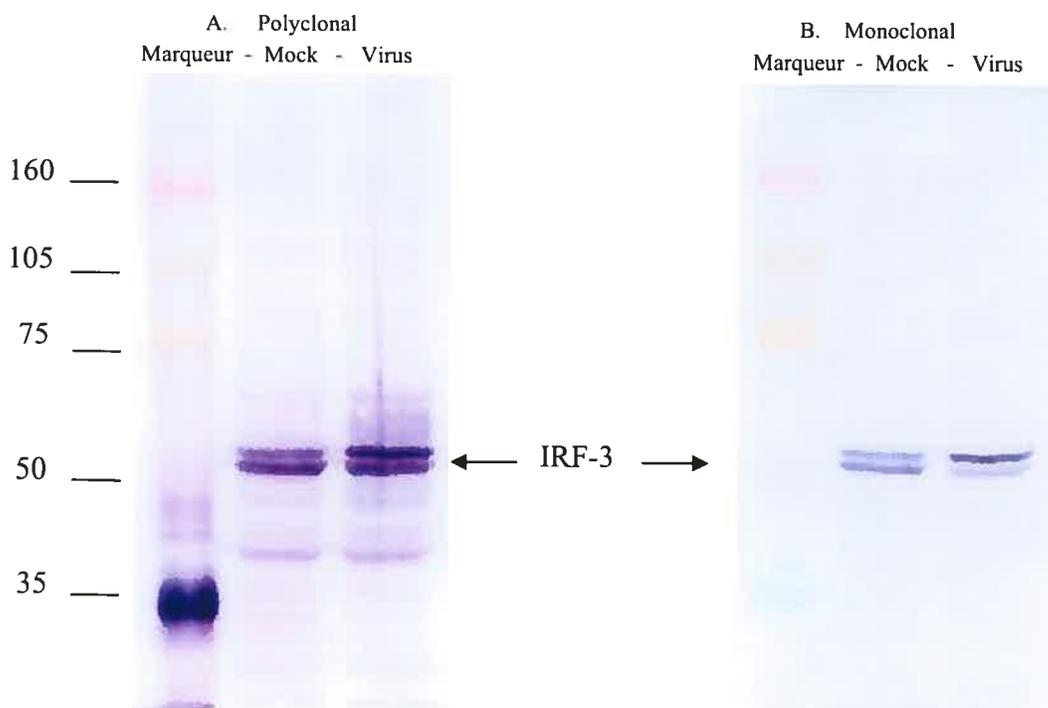
Les cellules U937 ont été traitées avec du virus Sendai les temps indiqués et les protéines ont été migrées de façon similaire à celles de la figure 6. L'anticorps utilisé est un anti-IRF-7 polyclonal, décrit dans les « matériels et méthodes ». La protéine IRF-7 se trouve autours de 69kDa et cette position est mise en évidence par la flèche.

#### Activation des IRF avec le Poly (I: C):

Malgré nos efforts répétés, nous n'avons pas pu visualiser l'activation de IRF-3 et de IRF-7 après l'incubation des cellules avec le SeV. Nous avons décidé d'induire l'activation des IRF avec le poly (I ; C), qui est de l'ARN à double brin synthétique. C'est un activateur connu de la cascade de l'interféron et sa structure active les récepteurs d'ARN viral. Les cellules ont été traitées avec le poly (I ; C) tel que décrit dans la section « Matériels et méthodes » ou avec un contrôle négatif pendant des temps variables allant de 15 minutes à 4 heures (4 heures pour le contrôle négatif). Les cellules ont ensuite été lysées et les protéines cytoplasmiques et nucléaires ont été récoltées séparément, migrées sur un gel d'acrylamide de 8 %. La membrane a été incubée avec un anticorps polyclonal anti-IRF-3 (avec un facteur de dilution de 1 :500). Comme nous pouvons le voir dans la Figure 8, le patron de migration du lysat des cellules traitées et des cellules non- traitées sont similaires et il n'y a pas de

membranes a été incubée avec l'anticorps anti-IRF-3 polyclonal alors que l'autre a été incubée avec l'anticorps monoclonal, à titre de comparaison. Le résultat se trouve dans la figure 9. Sur la figure A, on peut voir au niveau des cellules traitées avec le virus des bandes très faibles de poids moléculaire plus élevé que celles de IRF-3 inactif. Ces bandes pourraient correspondre à une forme phosphorylée d'IRF-3. Cependant, l'apparition de ces bandes n'était pas constante lorsque l'expérience était répétée. De plus, lorsqu'elles apparaissent, ces bandes ne sont pas aussi claires que les bandes correspondant à IRF-3 inactif et elles ne sont pas détectées par l'anticorps monoclonal qui, selon d'autres études, devrait être capable de détecter la forme active de IRF-3.

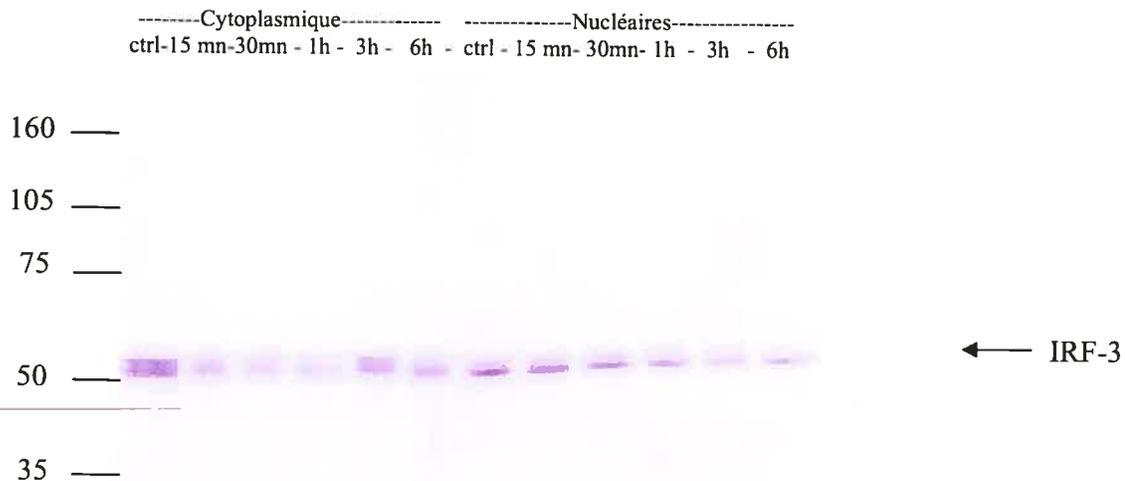
**Figure 9 :** Comparaison d'un anticorps monoclonal avec un anticorps polyclonal.



Des cellules U937 ont été incubées avec le virus Sendai concentré ou avec le contrôle négatif (Mock) pendant 8 heures. Les lysats cellulaires ont été migrés sur un gel d'acrylamide de 8 %. Une des membranes a été incubée avec l'anticorps anti-IRF-3 polyclonal, alors que l'autre a été incubée avec l'anticorps monoclonal. Les anticorps secondaires utilisés sont un anticorps anti-lapin (A), et un anticorps anti-souris (B) couplés à l'alkaline phosphatase.

*Préparation fraîche de Sendai dans des œufs.* En effet, bien qu'un test de fusion des érythrocytes ait démontré l'efficacité du virus que nous avons utilisé, nous avons suspecté que le lot du virus Sendai soit à incriminer pour notre incapacité à activer IRF-3 dans nos cellules. Nous avons donc décidé de produire un nouveau lot de virus. La production du virus Sendai s'effectue dans des œufs embryonnés de poulet de 9-10 jours. La technique est décrite dans la section des « matériels et méthodes ». La moitié des œufs ont été injectés avec du PBS et le liquide allantoïque de ces œufs a servi de contrôle négatif. L'activité du virus concentré a été vérifiée par un test de fusion d'érythrocyte. Nous avons ensuite utilisé ce virus fraîchement préparé pour traiter des cellules U937 avec des temps d'incubations compris entre 15 minutes et 6 heures. Nous avons effectué un buvardage Western avec les lysats cytoplasmiques et nucléaires extraits des cellules. La membrane a été incubée avec un anticorps monoclonal anti-IRF-3. Le résultat est illustré dans la figure 10. Cependant, même avec une préparation fraîche de Sendai et avec un anticorps monoclonal, il ne semble pas y avoir de différences dans le patron de migration des cellules traitées et des cellules non traitées, donc il n'y a pas de mise en évidence de l'activation d'IRF-3.

**Figure 10 :** Activation d'IRF-3 avec du SeV fraîchement préparé.

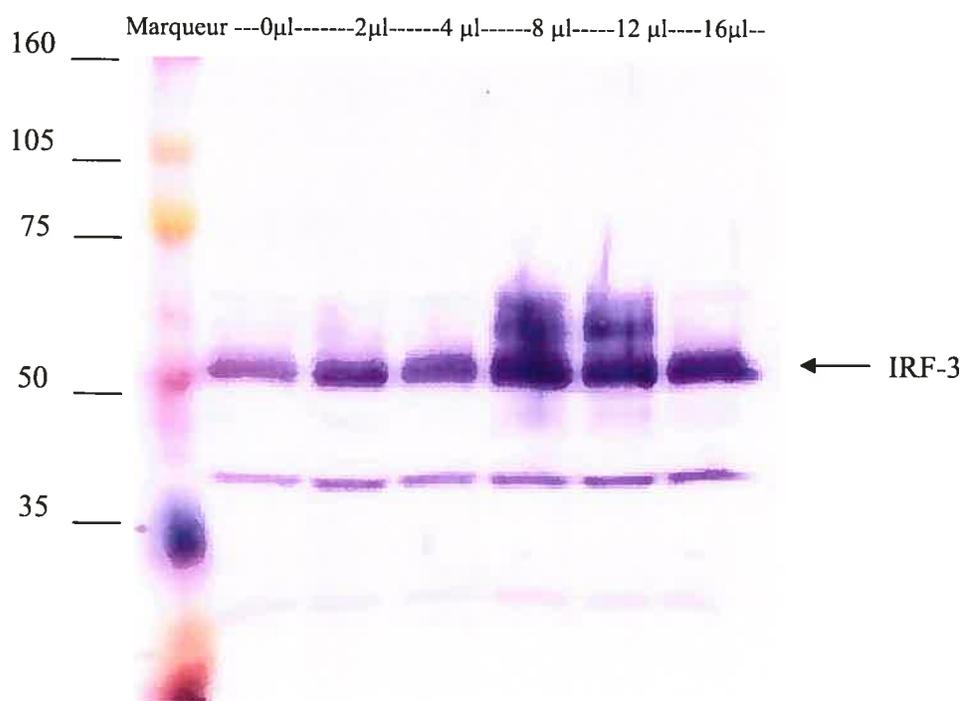


Des cellules U937 ont été traitées avec du virus Sendai fraîchement préparé ou avec un contrôle négatif (ctrl) pendant des laps de temps variés. Le contrôle négatif provient du fluide allantoïque d'œufs injectés avec du PBS. La membrane a été incubée avec un anticorps monoclonal anti-IRF-3 et un anticorps secondaire anti-souris, couplé à l'alkaline phosphatase. Le doublet correspond aux deux formes inactives d'IRF-3.

*Surexpression de IRF-3.* Étant donné que nous n'avions pas réussi à activer la phosphorylation de IRF-3 endogène avec de SeV ni avec le poly (I; C), nous avons décidé de sur-exprimer IRF-3 à l'aide d'un plasmide p-FLAG-IRF-3 où le gène IRF-3 est sous le contrôle du promoteur du CMV (Plasmide décrit dans les Matériels et méthodes). Les conditions de la transfection ont été mises au point en transfectant avec des quantités variables de réactif DMRIE-C (Invitrogen) incluant 1 µg d'ADN tel que décrit dans la section des « Matériels et méthodes » (Voir Figure 11). Lors de l'optimisation de nos conditions de transfection, nous avons remarqué que la surexpression d'IRF-3 dans nos cellules semble activer IRF-3. En effet, dans la figure 11, on observe qu'avec l'utilisation de 8 et de 12 µl de réactif DMRIE-C, il semble apparaître des bandes de poids moléculaire supérieur à celui du doublet d'IRF-3 inactif, sûrement correspondant à IRF-3 phosphorylé.

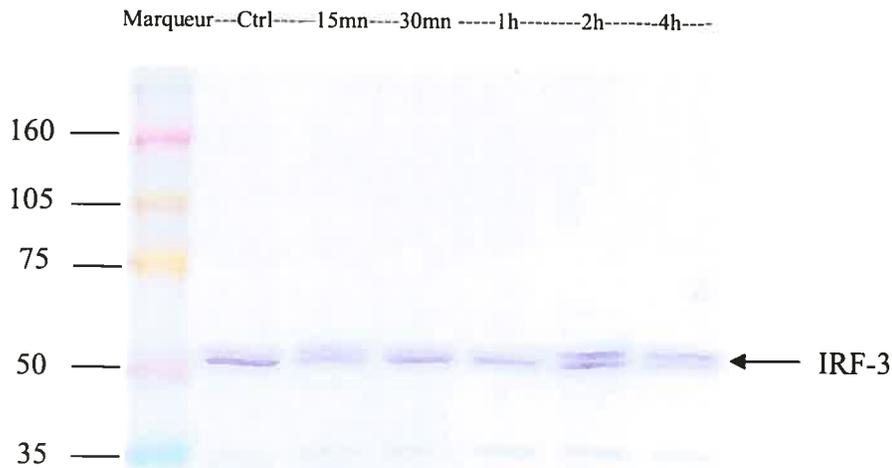
Selon la littérature, la sur expression d'IRF-3 ne mène pas à son activation (via la phosphorylation). Lors d'expériences successives (dont la Figure 12), ces bandes n'apparaissent pas de façon systématique. Nous avons décidé d'utiliser 8  $\mu$ l de réactif DMRIE-C pour transfecter le plasmide pFLAG-IRF-3 dans l'expérience suivante. Nous avons ensuite traité les cellules transfectées avec le virus Sendai et avec le poly (I; C). Le résultat est illustré dans la Figure 12. Une fois de plus, il n'y avait aucune phosphorylation d'IRF-3 dans nos cellules malgré la surexpression d'IRF-3.

**Figure 11** : Optimisation des conditions de transfection de p-Flag-IRF-3.



Des cellules U937 ont été transfectées avec 1  $\mu$ g de plasmide d'expression de IRF-3 avec des quantités différentes (2, 4, 8, 12 et 16  $\mu$ l) de réactif DMRIE-C afin de déterminer les quantités optimales. La membrane a été incubée avec l'anticorps anti-IRF-3 polyclonal, puis avec un anticorps secondaire anti-lapin, couplé à l'alcaline phosphatase.

**Figure 12 :** Effets du virus Sendai et du poly (I; C) sur l'activation de IRF-3.

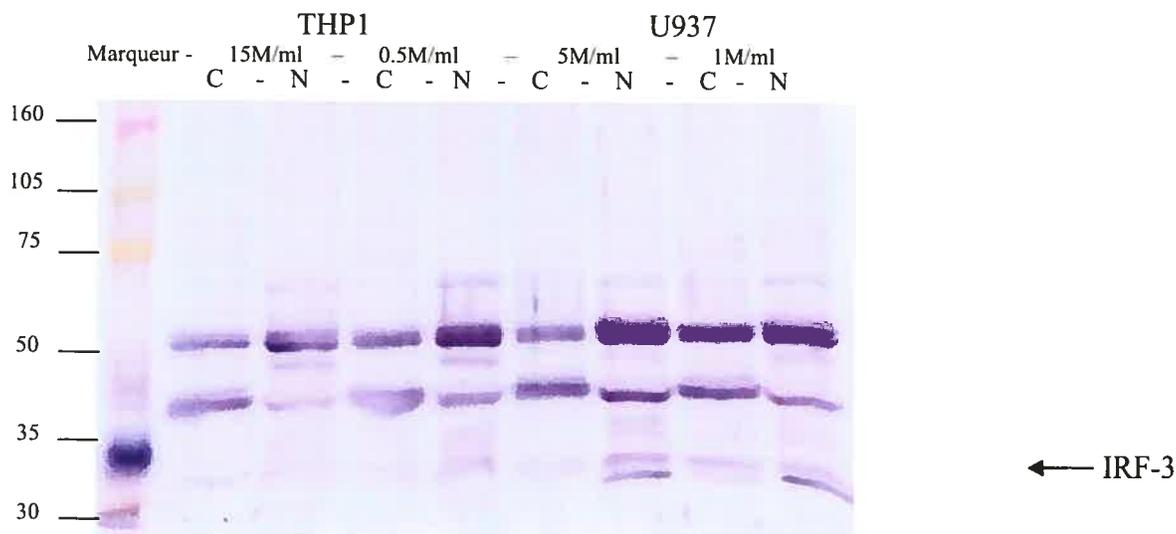


Des cellules U937 ont été transfectées dans des conditions optimales déterminées précédemment avec le plasmide p-Flag-IRF-3. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été traitées avec du SeV et avec le poly (I; C) simultanément pendant les temps indiqués. La membrane a été incubée avec l'anticorps anti-IRF-3 polyclonal, et ensuite avec un anticorps secondaire anti-souris, couplé à l'alkaline phosphatase.

*Changer les paramètres de la stimulation: la concentration des cellules.* Nous avons ensuite émis l'hypothèse que la concentration des cellules pourrait influencer leur habilité d'activer la cascade de l'IFN, en les plaçant en situation de stress ou en activant des récepteurs extracellulaires. Nous avons donc décidé de voir s'il existe en effet sur la phosphorylation de IRF-3 dans des cellules incubées à des concentrations différentes. Nous avons également décidé de tester deux types cellulaires différents pour s'assurer que l'effet observé ne soit pas spécifique aux cellules THP1 seulement. Nous avons donc pris des cellules THP1 et U937 que nous avons incubées à des concentrations de  $15 \times 10^6$  cellules par ml et  $0.5 \times 10^6$  cellules par ml pour les THP1 et des concentrations de  $5 \times 10^6$  cellules par ml et  $1 \times 10^6$  cellules par ml pour les U937. Les protéines cytoplasmiques et nucléaires ont été extraites et analysées par buvardage Western. La membrane a été ensuite incubée avec un anticorps polyclonal anti-IRF-3 et un anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'alkaline

phosphatase. Dans la figure 13, on ne remarque pas de différence dans le patron d'expression entre les cellules plus concentrées et les cellules plus diluées. Ainsi, la concentration des cellules n'a pas d'effet sur la phosphorylation de IRF-3 dans nos cellules.

**Figure 13 :** Effets de la concentration des cellules sur IRF-3.

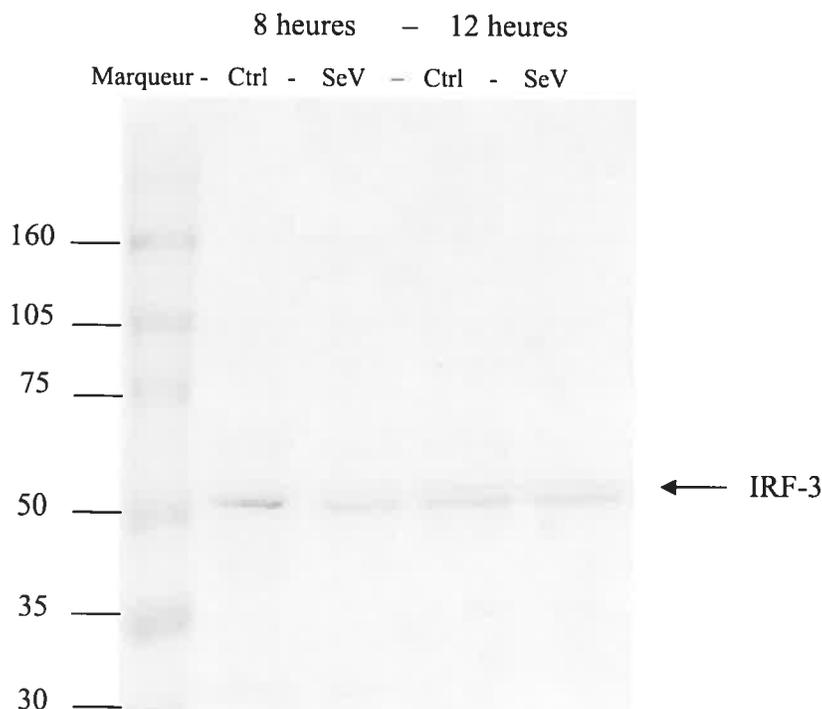


Des cellules THP1 et U937 ont été incubées à des concentrations différentes de 0.5, 1, 5 et 15 x 10<sup>6</sup> cellules par ml, pendant 3 heures à 37°C. « N » correspond à l'extrait cytoplasmique, alors que « C » correspond à l'extrait nucléaire de chaque échantillon. La membrane a été incubée avec l'anticorps anti-IRF-3 polyclonal et ensuite avec un anticorps secondaire anti-souris, couplé à l'alcaline phosphatase.

*Changer les paramètres de la stimulation : le temps d'incubation des cellules.* Bien que les temps d'incubations que nous avons utilisés étaient semblables à ceux utilisés dans d'autres études, nous avons décidé de vérifier si dans nos cellules le temps d'incubation utilisé était suffisant pour induire la phosphorylation de IRF-3. Nous avons déjà testé des incubations de 30 minutes à 6 heures. Nous avons alors décidé d'augmenter le temps d'incubation à 8 heures et 12 heures. Nous avons donc traité des cellules U937 avec du virus SeV ou avec un contrôle négatif pendant des temps d'incubations de 8 heures et 12 heures et

analysé les protéines par buvardage Western. Le résultat est illustré dans la Figure 14. Il n'y a pas de différence dans le patron d'expression entre les cellules traitées avec le SeV et les cellules traitées avec le contrôle négatif durant ces temps d'incubation. Ainsi, l'absence de phosphorylation de IRF-3 dans nos cellules n'est pas due à un temps d'incubation insuffisant.

**Figure 14 :** Prolongation du temps d'incubation avec le virus Sendai.



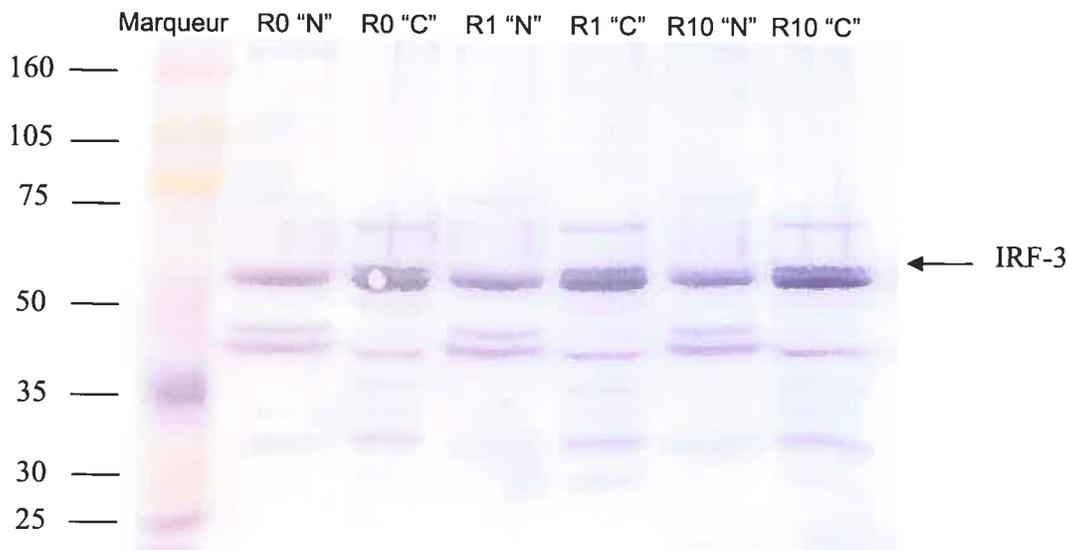
Des cellules U937 ont été traitées avec du virus Sendai ou avec un contrôle négatif (Ctrl) pendant 8 heures et 12 heures. La membrane a été incubée avec un anticorps monoclonal anti-IRF-3 et un anticorps secondaire anti-souris, couplé à l'alcaline phosphatase.

*Changer les paramètres de la stimulation : la présence de sérum dans les cellules.* Il est connu que le sérum bovin fœtal contient des centaines de facteurs de croissance ainsi que des molécules non connues et dans toutes nos expériences, nos cellules étaient cultivées dans un milieu contenant 10 % de sérum. Étant donné notre difficulté à obtenir un signal de phosphorylation d'IRF-3 dans nos cellules, nous nous sommes posé la question à savoir si le

sérum pourrait contenir des facteurs qui auraient un effet sur la phosphorylation d'IRF-3 dans les cellules étudiées. En effet, le sérum peut contenir des facteurs de croissance, des hormones et des cytokines qui agissent sur nos cellules. Nous avons donc incubé des cellules U937 dans des milieux à teneurs différentes de sérum pendant 3 heures : 0 %, 1 % et 10 %. Nous avons ensuite extrait les protéines cellulaires que nous avons analysées par buvardage Western. La membrane a été incubée avec un anticorps polyclonal anti-IRF-3 et un anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'alkaline phosphatase. Le résultat, illustré dans la Figure 15, démontre qu'il n'y a pas de différences dans le patron d'expression entre les cellules incubées dans les milieux différents, ce qui nous indique de la présence de sérum n'est pas un paramètre qui affecte la phosphorylation d'IRF-3 dans nos cellules.

*Changer le mode de détection de l'activation de la cascade de l'interféron : utilisation d'une micro puce.* Étant donné qu'il ne nous a pas été possible de détecter l'activation des IRF suite au traitement des cellules avec le SeV ou le poly (I ; C), ni après avoir surexprimé IRF-3 et IRF-7, nous avons décidé de changer notre approche et notre objectif. Nous avons décidé d'étudier l'effet de l'infection par le VIH sur l'ensemble des gènes impliqués dans la cascade de l'IFN. Nous avons utilisé une micro puce commerciale (SuperArray, Frederick, Maryland) sur laquelle sont imprimés 96 oligomères spécifiques aux gènes impliqués dans la cascade de l'IFN. La micro puce se trouve sous la forme d'une membrane à la surface de laquelle sont hybridés 112 gènes en quatre exemplaires (chaque gène formant un tétramère de points). Ces 112 gènes correspondent à 96 gènes d'intérêt, trois contrôles blancs, trois contrôles négatifs, trois gènes de référence en deux exemplaires et un gène de référence en quatre exemplaires. La membrane et le protocole utilisés sont détaillés dans la section des « Matériels et méthodes » et la liste des gènes se trouve en annexe 1.

**Figure 15 :** Effets de la concentration de sérum sur la phosphorylation de IRF-3.

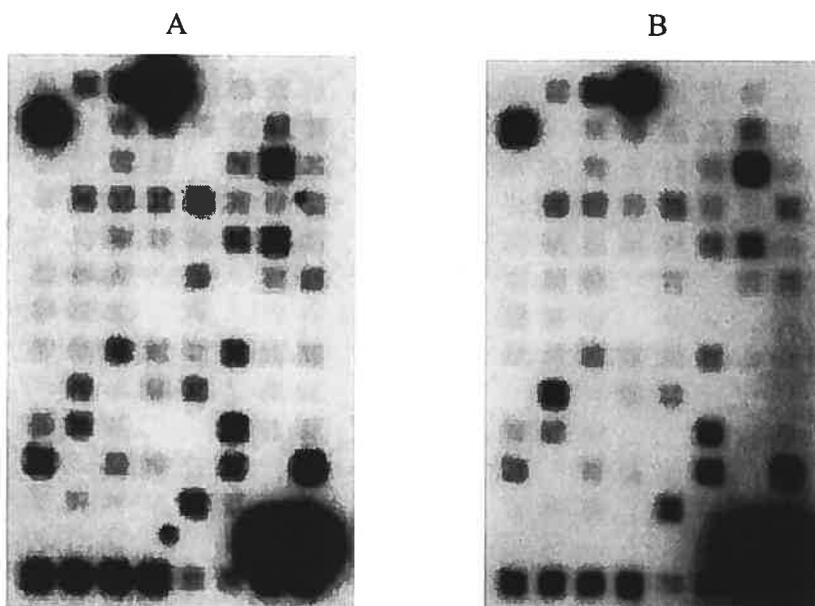


Des cellules U937 ont été incubées dans du RPMI contenant 0 % (R0), 1 % (R1), ou 10 % (R10) de sérum fœtal bovin durant 3 heures. Les lysats cellulaires nucléaires (N) et cytoplasmiques (C) ont été extraits séparément et migrés sur un gel d'acrylamide. La membrane a été incubée avec un anticorps polyclonal anti-IRF-3 et un anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'alcaline phosphatase.

Afin d'analyser l'effet de l'infection par le VIH sur nos cellules, nous avons tout d'abord produit du virus infectieux en transfectant le plasmide contenant le génome complet du VIH (plasmide NL3.4) dans des cellules humaines Cos-7 à l'aide du réactif DMRIE-C, (tel que décrit dans la section « Matériels et méthodes ») et récolté le surnageant dans lequel se trouve le virus. Nous avons également récolté le surnageant de cellules transfectées avec de l'ADN sans pertinence comme contrôle négatif et les surnageants ont été filtrés avec un filtre de 0.22 $\mu$ m et congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Afin de pouvoir quantifier notre virus, nous avons effectué un test ELISA sur le p24 (ID Labs Inc., London, Ontario, Canada) sur le surnageant de cellules infectées. Le test a révélé la présence de p24 à une concentration de 37  $\mu\text{g/ml}$ . Des

cellules THP-1 (décrites dans la section « Matériels et méthodes ») ont été infectées par ce surnageant et par le surnageant contrôle séparément, en présence de 8 µg/ml de polybrène. Le polybrène a pour effet de faciliter l'adsorption du virus sur les membranes des cellules cibles (Davis et al., 2002) et est souvent utilisé lors d'infections pour en augmenter l'efficacité. Après 48 heures, les cellules ont été lysées et l'ARN total a été extrait pour produire deux sondes radioactives que nous avons hybridées aux membranes de SuperArray. La numérisation des puces indique l'intensité du signal radioactif qui se trouve au niveau de l'emplacement de chaque gène, tel qu'illustré dans la Figure 16. (Voir la section des « Matériels et méthodes » pour les détails de l'expérience).

**Figure 16 :** Micro puces d'ARN auxquelles ont été hybridés les ARN de cellules infectées et contrôles.



L'ARN total de cellules infectées avec le VIH-1 (A) et de cellules non infectées (B) a été hybridé à chacune des deux membranes contenant des oligos de 96 des gènes impliqués dans la cascade de l'interféron après avoir été associés à du phosphore radioactif ( $P^{32}$ ).

Le signal qui se trouve au niveau de chaque gène sur la membrane est comparé au signal de gènes contrôles tels que GAPDH, l'actine, la cyclophilline A, ou la protéine ribosomale L13 (Ribosomal protein L13) afin de déterminer une valeur d'expression relative. Cette valeur est ensuite comparée à la valeur d'expression relative du même gène dans des cellules traitées différemment afin de voir l'effet d'un traitement spécifique sur l'expression des gènes choisis. Nous avons ainsi comparé l'expression des gènes impliqués dans la réponse à l'IFN (voir annexe 1 pour la liste complète des gènes) chez les cellules infectées et non infectées. Nous avons ensuite décidé d'identifier les gènes dont l'expression a soit été augmentée deux fois ou diminuée deux fois suite à l'infection par le virus. Pour mettre en évidence les gènes dont l'expression a été dramatiquement changée, nous avons également identifié les gènes dont l'expression a changé par un facteur d'au moins 5 (Tableau 4). On peut voir que l'infection par le VIH a des conséquences importantes sur l'expression des gènes de la cascade de l'IFN.

**Tableau 4:** Liste des gènes modulés suite à l'infection par le VIH.

| Augmentation |         | Diminution |         |
|--------------|---------|------------|---------|
| >2 fois      | >5 fois | >2 fois    | >5 fois |
| BST2         | C1orf29 | ISG-56K    | H19     |
| CXCL10       | C6orf85 | IRF-1      | ITIH2   |
| DAD-1        | COL16A1 | IRF-2      |         |
| ISG15        | IFI616  |            |         |
| GCH1         | IFITM2  |            |         |
| HLA-B        | IFNW1   |            |         |
| IFI27        | MEK1    |            |         |
| IFI30        | Met     |            |         |
| IFI44        | NMI     |            |         |
| IFIT4        | NRG-1   |            |         |
| IFRD1        | PRKRIP1 |            |         |
| IFRD2        | PSME2   |            |         |
| IRF-5        | SLC1A2  |            |         |
| Mx1          | SOCS3   |            |         |
| Mx2          |         |            |         |
| SOCS1        |         |            |         |

| Suite...     |         |            |         |
|--------------|---------|------------|---------|
| Augmentation |         | Diminution |         |
| >2 fois      | >5 fois | >2 fois    | >5 fois |
| CD27L/CD70   |         |            |         |
| TRIM34       |         |            |         |

Liste des gènes dont l'expression a été modifiée par un facteur d'au moins 2 ou d'au moins 5 par rapport à la moyenne des gènes contrôle de l'actine, le GAPDH, la cyclophiline et de la protéine ribosomale L13 dans les cellules THP-1 suite à l'infection par le VIH.

Lors de l'infection des cellules par le virus du VIH, il est important de tenir compte des effets de la présence d'un virus dans le milieu de culture des cellules, ainsi que des effets des protéines virales sur les cellules infectées. En effet, l'état antiviral de la cellule est initié avant même la pénétration du virus dans les cellules. Ensuite, selon notre hypothèse, le VIH inhibe et contourne cette réponse cellulaire de façon à pouvoir se répliquer. Afin de pouvoir étudier les effets des protéines virales sur l'activation des gènes cellulaires, nous avons décidé de transfecter des cellules THP1 avec le même vecteur NL3.4 contenant le génome du VIH à l'aide du DMRIE-C. Ainsi, les protéines virales sont produites dans les cellules sans préalablement activer les mécanismes de défense antivirales traditionnels. La transfection a été faite avec le réactif DMRIE-C selon le protocole du manufacturier (Invitrogen). Des cellules ont également été transfectées avec de l'ADN non pertinent pour servir de contrôle négatif. 48 heures après la transfection, l'ARN total a été extrait des cellules et deux sondes radioactives ont été produites puis nous les avons hybridées à deux membranes de SuperArray. Nous avons effectué les mêmes manipulations statistiques sur ces données (Tableau 5). On remarque que l'effet de la transfection du plasmide NL3.4 a des conséquences différentes de celles de l'infection sur l'expression des gènes de la cascade de l'IFN.

**Tableau 5** : Liste des gènes modulés par la transfection du plasmide NL3.4

| Augmentation |         | Diminution |         |
|--------------|---------|------------|---------|
| >2 fois      | >5 fois | >2 fois    | >5 fois |
| IFI16        | C1orf29 | IFNW1      | IFI35   |
| IFI44        | Mx1     | IFNA1      | IFN-b1  |
| IFIT4        |         | IRF-1      | PML     |
| PRKRA        |         | IRF-5      |         |
| PTTG1        |         | ISG20      |         |
| TRIM22       |         | SH2D1A     |         |
| STAT1        |         | SLC1A2     |         |

Liste des gènes dont l'expression a été modifiée par un facteur d'au moins 2 ou d'au moins 5 par rapport à la moyenne des gènes contrôles de l'actine, le GAPDH, la cyclophiline et de la protéine ribosomale L13 dans les cellules THP-1 suite à la transfection par le plasmide NL3.4.

**DISCUSSION**

Comme nous l'avons vu précédemment, on sait que le VIH a un effet sur les niveaux d'IFN chez les patients infectés. De plus, sa capacité à établir une infection persistante et chronique chez l'homme témoigne d'une aptitude à déjouer les mécanismes antiviraux des cellules. À ce jour, aucune étude n'a été accomplie pouvant éclaircir le mode d'action du virus au niveau de la cascade de signalisation de l'IFN dans les cellules. Nous avons donc décidé d'investiguer les effets d'une infection par le VIH sur le fonctionnement de la cascade de l'IFN *in vitro*.

Un des signes représentatifs de l'activation de la cascade de l'IFN est l'activation de IRF-3, un des initiateurs les plus important. En effet, IRF-3 est exprimé de façon constitutive dans toutes les cellules et devient phosphorylé dès la détection du virus par la cellule. IRF-7 est exprimé suite à l'activation de la cascade de l'IFN et permet l'amplification de la production d'IFN une fois activé. Il est activé par les mêmes mécanismes que ceux qui activent IRF-3, c'est-à-dire qu'il est phosphorylé par le complexe TANK/TBK1/IKK $\epsilon$  et se déplace vers le noyau où il se lie à l'ADN des gènes cibles. C'est pourquoi notre première approche était de se pencher sur l'activation et la fonction d'IRF-3 lors de l'infection virale.

Afin d'observer les effets du VIH sur la cascade de l'IFN, nous avons décidé de nous intéresser à IRF-3 et IRF-7. IRF-3 est une des premières protéines à être visiblement modifié lors de l'infection virale. L'expression d'IFN suite à l'initiation de la cascade mène à l'expression d'IRF-7, ce qui amplifie le signal en induisant davantage d'IFN. L'expression d'IRF-7 est un indicateur du bon fonctionnement de la cascade. De plus, c'est au niveau des IRF que beaucoup de virus interfèrent avec la cascade de l'IFN. Pour étudier l'activation d'IRF-3, nous avons décidé de suivre les modèles établis par d'autres études, tels que décrits dans la littérature.

Nous voulions visualiser par buvardage Western l'activation de IRF-3 suite à la stimulation des cellules par le virus Sendai ou par le poly (I; C). Cette technique a été longuement utilisée dans d'autres études sur la phosphorylation de IRF-3. L'équipe de Gale Jr a déjà longuement étudié le rôle des IRF dans la cascade des IFN en activant IRF-3 par le virus Sendai et en visualisant son activation par Western blot à l'aide d'un anticorps polyclonal (Foy et al., 2003). D'autres études ont également utilisé cette technique avec succès (Servant et al., 2003; Servant et al., 2001; Sharma et al., 2003; tenOever et al., 2002). Cette technique révèle quatre formes d'IRF-3, sous la forme de quatre bandes migrant très proches l'une de l'autre. Deux de ces formes visibles par Western blot représentent IRF-3 phosphorylé ou actif (les deux bandes supérieures et les deux autres (les bandes inférieures) représentent IRF-3 non phosphorylé ou inactif. De plus, les formes non phosphorylées sont détectées principalement dans le cytoplasme et les formes phosphorylées sont détectées principalement dans le noyau. Les stimuli idéaux pour ce test sont l'infection par le virus Sendai et l'exposition des cellules à l'ARN à double brin, le poly (I; C).

Lorsque la cascade de l'IFN est activée par le virus Sendai ou par le poly (I : C), IRF-7 devient exprimé et la production de l'IFN est amplifiée par une boucle de rétroaction. L'expression de IRF-7 peut être détectée d'abord dans le cytoplasme des cellules puis dans le noyau, par buvardage Western à l'aide d'un anticorps poly clonal dirigé contre IRF-7. Si l'initiation de la cascade est inhibée ou modifiée par le VIH, il n'y aura pas la même dynamique d'activation d'IRF-7 dans les cellules infectées que dans les cellules non-infectées. Nous avons ainsi décidé d'étudier l'expression d'IRF-7 également.

La phosphorylation de IRF-3 ne signifie pas directement que la molécule est active et fonctionnelle. IRF-3 doit également dimériser, être transloqué dans le noyau et s'associer avec CBP/p300, un coactivateur indispensable des facteurs de transcription, afin d'activer la

transcription des gènes. En effet, afin de vérifier notre hypothèse, il nous fallait mettre au point un moyen de vérifier si l'activation de IRF-3 et IRF-7 corrèle bien avec une augmentation de leur fonction transcriptionnelle. En effet, la phosphorylation de IRF-3 et IRF-7 est la première étape de leur activation mais l'activation du promoteur du gène de l'IFN- $\beta$  est un indicateur de leur fonctionnalité. Nous avons obtenu d'un laboratoire un plasmide où le gène de la luciférase se trouve sous le contrôle du promoteur de l'IFN- $\beta$  (pGL3-IFN $\beta$ ). Lorsqu'il y a activation de la transcription au niveau du promoteur du gène de l'IFN- $\beta$ , il y a une activité enzymatique de la luciférase. La dynamique de cette activation dans le temps est une indication du facteur de transcription en jeu : l'activation du gène de la luciférase peu après l'infection sera un signe de l'activation de IRF-3 et une activation plus tardive du gène de la luciférase est un indicateur de l'activité de IRF-7.

Une fois les outils en main pour visualiser la phosphorylation de IRF-3, nous voulions comparer le niveau de phosphorylation de IRF-3 dans les cellules infectées et non infectées par le VIH. S'il existe une différence dans le niveau de phosphorylation de ces deux échantillons, c'est une preuve que le virus du VIH interfère avec la cascade de l'IFN au niveau de la phosphorylation de IRF-3, comme le font d'autres virus tels que le HCV.

Si tel est le cas, souhaitons vérifier les niveaux de phosphorylation et d'activation de IRF-3 et IRF-7 dans les cellules transfectées avec des gènes individuels du VIH afin de déterminer les gènes impliqués. Les gènes à tester en priorité sont *nef*, *vif*, et *tat*. Il est cependant probable qu'il ne soit pas possible de mettre en évidence l'implication d'un seul gène dans cette modulation, le cas échéant. En effet, il se peut que certains gènes agissent ensemble de façon synergétique et qu'une combinaison de plusieurs gènes soit nécessaire pour obtenir l'effet observé.

Cependant, malgré nos efforts, il n'a pas été possible de visualiser l'activation d'IRF-3 comme souhaité. Nous avons tenté de résoudre le problème en modifiant nos paramètres un par un, tels que l'anticorps utilisé, la concentrations des cellules, la concentration du sérum, les temps d'incubations etc. Nous avons également surexprimé IRF-3 et IRF-7 dans l'espoir qu'un signal plus robuste nous permettrait de visualiser l'activation d'IRF-3 et d'IRF-7 plus facilement. Malheureusement, aucune de ces modifications n'ont résolu notre problème et nous n'avons pas réussi à visualiser la phosphorylation d'IRF-3 ou IRF-7, ni la translocation de la protéine du cytoplasme vers le noyau. Il nous a été a conseillé d'incuber le poly-(I : C) à 56 °C pendant 30 minutes, de le refroidir à la température de la pièce et de l'incuber sur glace jusqu'à son utilisation. C'est, selon les experts dans le domaine de l'activation d'IRF-3, la meilleure façon de s'en servir pour stimuler la phosphorylation de IRF-3. Cependant, cela n'a pas donné de résultats convaincants au sein de notre équipe. Nous avons aussi fait varier l'épaisseur, la grandeur et le pourcentage d'acrylamide du gel afin d'améliorer la résolution de différentes formes d'IRF-3, mais sans aucun résultat. Nous avons aussi été informés des difficultés à induire et à visualiser la phosphorylation d'IRF-3 dans les cellules. Selon le chercheur, il est très difficile d'activer IRF-3 dans les lignées cellulaires et l'on ne sait pas pourquoi cela est impossible dans certaines lignées. Dans des lignées cellulaires ayant une croissance dérégulée, il n'est pas surprenant que certains des mécanismes qui limitent et contrôlent la croissance et la division cellulaire soient défectueux. En effet, les gènes induits par IRF-3 ont pour fonction d'inhiber la prolifération virale et par conséquent la croissance cellulaire. Ainsi, il se peut que dans nos cellules, le mécanisme d'activation d'IRF-3 soit déjà inhibé ou contourné et que l'addition du SeV ou du poly (I : C) n'ait aucun effet supplémentaire à ce niveau.

Les difficultés que nous avons rencontrées lors de la visualisation de IRF-3 et de IRF-7 nous ont encouragés à réévaluer notre objectif et à explorer des démarches alternatives. Même avec la surexpression de IRF-3 et de IRF-7 à l'aide de plasmides, nous n'avons pas pu visualiser un signal clair et satisfaisant.

Nous avons donc décidé d'utiliser une nouvelle approche afin d'étudier le rôle du VIH sur la cascade de l'IFN. Au lieu de se concentrer sur la phosphorylation de IRF-3 et sur l'initiation de la cascade de l'IFN, nous nous sommes concentrés à étudier l'effet global du VIH sur cette cascade. IRF-3 est un facteur de transcription parmi d'autres dont l'inactivation ou l'inhibition a des conséquences sur l'ensemble des gènes exprimés lors de la réponse antivirale. L'effet du VIH sur la réponse antivirale au niveau de l'activation des gènes n'a jamais été étudié dans le contexte *in vitro*. Il existe une centaine de gènes connus dont l'expression est induite ou modulée par l'IFN dans les cellules. Nous avons donc décidé de nous pencher sur la modulation de la transcription de ces gènes suite à l'infection par le VIH. La meilleure technique pour étudier la transcription de beaucoup de gènes à la fois est celle d'une micro puce d'ADN. Afin de nous concentrer sur notre cascade d'intérêt, nous avons sélectionné une puce qui ne contient que les gènes impliqués dans la cascade de l'IFN. Il s'agit d'une membrane de la compagnie SuperArray à laquelle ont été hybridés des oligomères d'ADN complémentaires (cDNA) d'une centaine de gènes qui ont été liés à la cascade de l'IFN (Voir annexe 1 pour la liste des gènes). Ces gènes comprennent entre autres IRF-3, IRF-7, ADAR, IFN- $\beta$ , IFN- $\alpha$ , IFNAR1, IFNAR2, STAT1, STAT2 et tous les autres acteurs principaux de cette cascade. Pour réaliser cette étude, nous avons infecté des cellules par le VIH, extrait l'ARN des cellules, transformé les ARNm en cDNA marqués ( $P^{32}$  radioactif) par transcription inverse et hybridé ces cDNA aux oligomères de la membrane. Le

signal radioactif sur la membrane qui résulte de cette hybridation est proportionnel au niveau d'expression des gènes et peut être détecté et quantifié grâce au PhosphorImager STORM Molecular Scanner et le logiciel ImageQuant. Nous avons ainsi pu comparer le patron d'expression des gènes dans les cellules infectées et non infectées, ainsi que dans les cellules transfectées avec le génome du VIH et les cellules non- transfectées.

Cependant, même si cette technique offre l'avantage de nous donner une indication du niveau d'expression des gènes elle a aussi ses inconvénients. En effet, elle nous renseigne peu sur les niveaux des protéines traduites, le statut d'activation des protéines ou la modification de la demi-vie des protéines. Certaines protéines, telles que IRF-3, ne subissent pas de changements dans leur niveau d'expression suite à l'infection par le virus, mais subissent un changement conformationnel qui les rend actives. De tels changements ne sont pas détectables par la technique de la micro puce.

Dans les cellules humaines THP1 infectées par le VIH, nous avons vu une nette différence d'expression de certains gènes par rapport aux cellules non infectées. Voici quelques exemples de gènes dont l'expression a été modifiée par l'infection des cellules par le HIV :

Lors de l'infection de nos cellules avec le VIH-1, nous avons observé une très forte augmentation de l'expression de certains gènes tels que la neuréguline-1, (NRG-1; augmentation par un facteur de 63, soit « + 63 X »). La neuréguline-1 est un facteur de croissance capable de favoriser la croissance cellulaire en ignorant les signaux d'arrêt de croissance (Chakravarti et al., 2005). L'infection par le VIH mène également à la surexpression du proto-oncogène MET (+ 6.5 X), un récepteur de facteurs de croissance des hépatocytes qui stimule la croissance des cellules. Une étude a démontré que chez les patients atteints du sarcome de Kaposi (SK), MET est exprimé à un niveau plus élevé dans

les patients infectés par le VIH que dans les patients ayant un KS classique (Piug et al. 1999). Un autre gène impliqué dans la croissance cellulaire dont l'expression est modulée par le VIH est H19, un ARNm exprimé mais non traduit, qui est inactivé maternellement. H19 est un médiateur de l'effet d'inhibition de croissance par l'IFN (Certa et al., 2002) que l'on retrouve dans des métastases hépatiques chez deux tiers des patients (Fellig et al. 2005). Nous avons constaté que suite à l'infection par le VIH, son expression est diminuée de 5.5 fois (- 5.5 X).

Nous avons également remarqué que l'infection par le VIH a eu un effet sur l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose. Par exemple, le gène IFI616 (Interferon, alpha-inducible protein-616) qui est sûrement un inhibiteur d'apoptose (Tahara et al., 2005) est induit par un facteur de 25 (+ 25 X), le gène MEK (Mitogen-activated protein kinase kinase 1) qui joue un rôle dans la protection des cellules de l'apoptose induite par l'IFN (Caraglia et al., 2005) est induit par un facteur de 9.7 (+ 9.7 X). L'expression du gène NMI (N-myc (and STAT) interactor ) dont la protéine s'associe avec IFI35, se lie à n-Myc et c-Myc et joue un rôle lors de l'apoptose (Chen and Naumovski, 2002) et du gène DAD-1 (Defender against cell death 1) dont la protéine protège les cellules de l'apoptose, sont induits par un facteur de + 7.8 et de + 3, respectivement, par l'infection par le VIH. L'infection des cellules mène également à l'induction du gène CXCL10 (+ 2.1 X) qui est un inducteur d'apoptose à l'aide de p53 certaines cellules infectées (Zhang et al., 2005). D'autres études confirment l'activation de CXCL10 par *tat* du VIH dans des cellules dendritiques et suggèrent que ce mécanisme encourage l'activation des cellules et la propagation du virus (Izmailova et al., 2003).

Nous avons aussi observé une importante modulation de gènes impliqués dans la signalisation intracellulaire tels que PRKRIP-1 (PRKR interacting protein 1 (IL11 inducible);

+ 16.2 X), SOCS-3 (Suppressor of cytokine signaling ; + 8.7 X), SOCS-1 (+ 2.5 X), IRF-2 (Interferon regulatory factor 5 ; + 2.8 X), IRF-2 (- 3.4 X), IRF-1 et (- 4.2 X). PKRIP-1 interagit avec la protéine PKR et inhibe son activation via l'ARNdb (Yin et al., 2003). Ainsi, la présence d'ARNdb dans la cellule infectée ne peut pas activer la cascade de NF- $\kappa$ B qui, couplé à IRF-3, mène à la production d'IFN- $\beta$ . Les protéines SOCS-1 et SOCS-3 inhibent l'activation des STATS, ce qui empêche la signalisation par les interférons de type 1.

IRF-2 est un régulateur négatif de la signalisation par l'IFN (Honda et al., 2004a). IRF-1 est un activateur de transcription, inducteur d'apoptose impliqué dans la défense antivirale contre des virus tels que le HCV (Kanazawa et al., 2004).

L'induction de PKRIP-1, SOCS-1 et SOCS-3 ; et la diminution de l'expression d'IRF-1 dans les cellules infectées entraînent ainsi un défaut dans la cascade de signalisation de l'interféron et dans l'établissement de l'état antiviral.

L'effet de l'infection sur certains gènes semble faciliter la propagation de l'infection des premières cellules ciblées, des cellules dendritiques, vers les cellules T. Par exemple, nous avons remarqué que l'infection augmente l'expression de IFI27 (*interferon, alpha-inducible protein 27*) par un facteur de + 2.2. Bien que sa fonction exacte demeure inconnue à ce jour, on sait que IFI27 est une protéine induite par l'IFN qui est induite par Tat du VIH dans les cellules dendritiques pour attirer des cellules T activées, favorisant la propagation du virus (Izmailova et al., 2003). L'infection par le VIH augmente l'expression de IFI44 (Interferon-induced protein 44 ; + 2.1 X). IFI44 est une protéine inductible par l'IFN dont la fonction n'est toujours pas entièrement comprise. D'autres études ont déterminé qu'elle est induite par le HIV dans les cellules dendritiques pour activer leur migration et permettre au virus de se propager (Wilflingseder et al., 2004).

Dans notre étude, nous voyons que le gène TRIM34 (Tripartite motif containing 34), ayant des propriétés antivirales, est induit par l'infection par le VIH (+ 2.9 X), ce qui confirme une étude précédente (Nisole et al., 2005).

Il est intéressant de noter que l'infection semble induire non seulement des gènes impliqués dans la réponse antivirale mais aussi des gènes impliqués dans la résistance de cette même réponse. Ainsi, il semble y avoir un équilibre entre les défenses de la cellule et celles du virus. Dans le cas de patients séropositifs, cet équilibre aurait favorisé la survie et la propagation de virus. Néanmoins, étant donné que la réponse antivirale de la cascade de l'interféron ne soit pas complètement abolie, il y a l'espoir qu'avec une thérapie ciblée à la cascade de l'IFN, nous puissions pousser cet équilibre vers la défense de la cellule.

On remarque également que l'infection par le VIH augmente l'expression de gènes dont la fonction est inconnue, telle que ISG15 (+ 2.1). On sait que ce gène joue un rôle central dans la cascade de l'interféron et renforce les propriétés antivirales de l'IFN par un mécanisme d'isgylation des protéines (semblable à l'ubiquitination) mais le fonctionnement et l'effet exact de cette voie demeurent dans l'obscurité (Zhao et al., 2005). Nous avons aussi observé une diminution de l'expression du gène ITIH2 (Inter-alpha (globulin) inhibitor H2 ; -15.2). Le rôle de cette protéine dans la cascade de l'IFN n'a toujours pas été élucidé. L'infection par le VIH-1 a également entraîné une surexpression de certaines régions chromosomiques influencées par l'IFN dont le gène est inconnu tels que le cadre de lecture 85 du chromosome 6 (C6orf85 ; + 53 X) et le cadre de lecture 29 du chromosome 1 (C1orf29 ; + 8.1 X). La surexpression de ces régions est aussi observée dans les cellules infectées par le HCV (SuperArray), indiquant leur importance dans la réponse à l'infection virale.

Bien que notre étude soit la première à observer les effets de la modulation de l'expression des gènes liés à l'IFN suite à l'infection par le VIH-1, des études précédentes se sont penchées sur les effets d'autres virus sur l'expression génétique des cellules infectées. Par exemple, une étude récente basée sur l'analyse de la modulation de l'expression génétique suite à l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) indique que le HCV influence l'expression de IFI616, CXCL10, IFI27 et de MX1, entre autres (Bieche 2005).

Nous avons aussi procédé à la transfection de cellules THP-1 avec le plasmide NL3.4, contenant le génome viral complet afin de comparer les patrons d'expression génétiques des cellules exprimant les protéines virales avec des cellules contrôles. La transfection des cellules a aussi modulé l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la cascade de l'IFN. Cependant, les gènes dont l'expression a été perturbée par cette transfection ne sont pas tous les mêmes que dans les cellules infectées. En effet, dans les cellules transfectées, nous avons observé une induction du gène Mx1 9.3 fois supérieure à celle des cellules contrôles, alors que dans les cellules infectées, la différence au niveau de l'expression est de 3.2. De plus, la transfection des cellules entraîne une diminution de l'expression du gène du transporteur de glutamate SLC1A2 (Solute carrier family 1, member 2) de 2.1, alors que l'infection entraîne une surexpression de 6.6 fois par rapport aux cellules contrôles. On remarque aussi que l'infection par le VIH mène à l'activation du gène d'IRF-5, un des médiateurs de la cascade de l'IFN, la transfection par le plasmide NL3.4 mène à l'inhibition de ce même gène. Pour d'autres gènes, tels que C1orf29, IFI44 et IRF-1, la modulation de l'expression est semblable pour les cellules infectées et transfectées. Par contre, on observe une modulation de certains gènes lors de la transfection qui ne semblent pas être affectés par l'infection. IFIT4 (Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4) est une protéine induite par Tat

dans les cellules dendritiques pour attirer des cellules T activées et favoriser la propagation du virus (Izmailova et al., 2003). Dans notre étude, la transfection a mené à la surexpression de IFIT4 par un facteur de 4.1 par rapport aux cellules contrôles.

Une fois de plus, on remarque des effets qui semblent s'opposer, avec l'induction de certains gènes acteurs dans la cascade de l'IFN et des gènes répresseurs de la réponse antivirale. Par exemple, nous avons observé l'induction de IFI16 (Interferon, gamma-inducible protein 16), répresseur transcriptionnel de p53 et de p21 (Kwak et al., 2003) et du facteur de transcription STAT1 par un facteur de 3.3 et de 2.3, respectivement. Nous voyons également l'induction du gène PRKRA (Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator) (+ 2.3) qui est un activateur cellulaire de PKR et peut agir comme dominant négatif dans certaines conditions (Bennett et al., 2004).

La transfection des cellules a entraîné l'induction de PTTG1 (Pituitary tumor-transforming 1), impliquée dans la résistance intrinsèque à l'IFN au niveau de la régulation de la transcription et qui stimule la croissance cellulaire (Hamid et al., 2005) ; et la répression de PML (Promyelocytic leukemia), qui est un facteur de transcription et suppresseur de tumeurs agissant via p53 ayant des propriétés antivirales (Herzer et al., 2005).

Nos résultats confirment ceux d'une autre étude que le gène TRIM22 (Tripartite motif-containing 22) ayant des propriétés antivirales est induit par le VIH (Nisole et al., 2005).

Il est très intéressant de noter que la transfection des cellules par le génome du VIH mène à une inhibition de l'expression des gènes IFN- $\omega$ , IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ , par des facteurs de -2, -2.3 et de -35.5, respectivement. Ces trois interférons de type 1 sont normalement induits par la présence de PAMP viraux et jouent un rôle important dans l'initiation de la réponse

antivirale de l'hôte. La forte inhibition de l'IFN- $\beta$  indique les gènes du VIH-1 ont un moyen efficace d'étouffer la réponse antivirale dans la cellule.

La différence dans la modulation des gènes par l'infection et par la transfection pourrait provenir du mode de détection du virus. En effet, nous avons décrit en détail précédemment les mécanismes de détection du virus tels que les TLR en surface des cellules et des endosomes, ainsi que PKR et RIG-1 dans le cytoplasme. Une fois liées aux composantes virales, ces protéines enclenchent une cascade de signalisation qui mène à la production d'IFN ainsi que de nombreuses protéines à fonctions antivirales. Dans le cas des cellules exposées au virus, l'effet observé provient de la présence virale dans le milieu extracellulaire ainsi que des protéines virales produites dans les cellules infectées. Par contre, dans les cellules transfectées, les protéines virales sont produites avant que la cellule ne puisse reconnaître la présence d'un virus. Une fois que le génome viral s'est intégré dans le génome cellulaire, des virions sont produits et peuvent infecter les cellules avoisinantes. Toutefois, les protéines virales qui inhibent la cascade de l'IFN peuvent enrayer la cascade antivirale avant qu'elle ne débute. Ceci pourrait expliquer les niveaux très restreints d'IFN- $\alpha$  et d'IFN- $\beta$  dans les cellules transfectées. De plus, les gènes les plus surexprimés dans les cellules infectées, Mx1, C1orf29 et IFI44 sont probablement induits par la détection des protéines virales, avant que la cascade de l'IFN ne soit entravée.

Il n'est pas surprenant de voir que l'infection par le VIH mène à la répression du gène H19, qui joue un rôle important dans l'inhibition de croissance induite par l'IFN ainsi qu'à l'activation de DAD-1, un inhibiteur d'apoptose, MET et MET, des facteurs qui stimulent la croissance des cellules. Ceci suggère que le VIH stimule la croissance cellulaire et inhibe l'apoptose. On remarque aussi que la transfection par le plasmide NL3.4 entraîne la

répression du gène PML, un facteur suppresseur de tumeurs avec des propriétés antivirales. PML est aussi réprimé par le HCV, indiquant son importance dans la cascade de l'IFN.

L'infection par le VIH induit fortement l'expression du gène PKRIP-1, un inhibiteur de PKR, ce qui devrait mener à un défaut dans la reconnaissance de PAMP viraux et donc à une diminution de l'activation de la cascade de l'IFN.

En outre, certains de ces gènes qui n'ont jamais été étudiés en présence du VIH ont déjà été impliqués dans la résistance à la réponse antivirale en présence d'autres virus, tels que le HCV. Parmi ces gènes on trouve Mx1, C1orf29, C6orf85, IFI16, SH2D1A, PML, IFI56, SOCS1 et SOCS3. On ne connaît toujours pas la fonction de certains de ces gènes mais le fait qu'ils soient associés à la résistance d'autres virus aux réponses antivirales nous indique leur importance. Par contre, les gènes SOCS ont déjà été étudiés et on sait que ce sont des inhibiteurs de la cascade de l'IFN. De plus leur expression est induite par, entre autres, le virus de l'herpès HSV-1, (Yokota et al., 2004), le virus de l'hépatite C HCV (Gale and Foy, 2005) et le virus syncytial respiratoire RSV (Tripp et al., 2005). On remarque également que beaucoup des gènes dont l'expression est modulée par le VIH sont aussi impliqués dans la résistance du HCV à l'IFN. De plus, on sait qu'un des traitements qui s'avère efficace contre le HCV est l'IFN- $\alpha$  synthétique. Bien que le traitement avec l'IFN- $\alpha$  demeure controversé dans le cas du VIH, il se peut qu'un traitement impliquant l'IFN- $\alpha$  en combinaison avec d'autres agents thérapeutiques soit une alternative viable.

Les résultats dérivés des micro puces sont encore préliminaires, n'ayant été constatés qu'une seule fois, doivent être confirmés en répétant l'expérience. De plus, des études par buvardage Western et des essais fonctionnels permettraient de vérifier si la modulation de l'expression des gènes concernés mène à une modulation de la quantité de protéine active présente ou de l'activité des protéines en question afin de confirmer les résultats obtenus.

Une fois ces résultats confirmés, il serait très intéressant de les comparer aux effets des gènes individuels du VIH par la transfection de différents plasmides. Il est cependant important de prendre en compte que dans l'expérience ci-dessus, la réponse résulte de la présence de composantes virales qui activent la réponse antivirale, ainsi que de composantes qui l'inhibent. Ainsi, des études avec les gènes individuels devraient inclure la présence de ces composantes activatrices afin de reproduire les effets d'une infection virale.

Il serait également important d'étudier davantage ces mécanismes encore inconnus, tels que le C1orf29 et de pouvoir constater leurs rôles dans la cascade de l'IFN ou dans d'autres processus. De la sorte, nous comprendrons mieux le mode d'action du VIH ainsi que des autres virus qui affectent ces mécanismes, nous aurons une meilleure compréhension des points les plus vulnérables de la réponse antivirale et comprendrons mieux cette cascade complexe et les moyens de la renforcer.

La réponse antivirale cellulaire est très complexe et fiable et les interférons jouent un rôle très important dans cette défense. Cependant, les virus ont des mécanismes tout aussi complexes pour contourner ces défenses.

L'évasion virale du système immunitaire peut se faire à plusieurs niveaux de la cascade de l'IFN. En effet, les stratégies virales comprennent l'évasion de la détection virale par la cellule hôte, l'inhibition de la production d'IFN et l'inhibition de la signalisation par l'IFN. N'importe quel virus qui réussit à établir une infection persistante chez un hôte sain est un virus qui a su contourner les mécanismes de défense antivirale de cet hôte. Quelques exemples bien étudiés de virus ayant cette capacité sont le virus de l'hépatite C (HCV) et le virus de l'herpès humain 8 (HV8).

Le HCV est un virus à ARN de la famille des flaviviridae et, dans la plupart des cas, l'infection au HCV mène à une infection chronique qui résulte en hépatite. Ce virus est un

bon exemple des nombreuses techniques utilisées par les virus afin de contrer les défenses, souvent redondantes, de l'hôte. Des études ont démontré que IRF-3 activé peut inhiber la réplication du HCV, tandis que lorsque l'activité de IRF-3 est perturbée, la réplication de HCV est augmentée (Foy et al., 2003). Lors de l'infection des cellules, la protéine non structurale NS3/4A empêche la phosphorylation de IRF-3 suite à la détection du virus (Foy et al., 2003). Sans l'activation de IRF-3, la réponse antivirale via la voie de l'IFN est compromise et le HCV peut établir une infection persistante. La protéase NS3/4A agit également au niveau de la protéine adaptatrice TRIF et la clive avant qu'elle ne mène à l'activation de NF- $\kappa$ B (Li et al., 2005). Ainsi grâce à sa protéine NS3/4A, le HCV inhibe l'initiation de la voie de signalisation de l'IFN en bloquant le transfert du signal au niveau de IRF-3 et NF- $\kappa$ B. Ceci permet au virus d'échapper aux différentes branches de la défense antivirale de la cellule. Une autre étude récente suggère que la NS3/4A pourrait agir au niveau de RIG-1 (Breiman et al., 2005), bien que le mécanisme exact ne soit pas encore connu. Une autre étude aurait démontré par co-immunoprécipitation que la protéine NS3 se lie à TBK-1 (Otsuka et al., 2005) alors que l'on sait que NS5A et la glycoprotéine E2 se lie à PKR, empêchant son activation via l'ARN (Katze et al., 2002; Miller et al., 2004; Samuel, 2001; Sen, 2001; Stark et al., 1998). Toutes ces études démontrent clairement l'importance pour les virus de pouvoir inhiber la réponse antivirale de la cellule qu'ils infectent.

Les stratégies d'évasion de la réponse antivirale sont très variées d'un virus à l'autre. L'approche du HHV8 est très différente de celle du HCV. Le HHV8 synthétise des homologues viraux des IRF qui inhibent la production d'IFN en bloquant l'activation transcriptionnelle de IFN- $\alpha/\beta$  ainsi que de IFN- $\gamma$  (Samuel, 2001; Sen, 2001). L'IRF viral 1 (vIRF-1) se lie à plusieurs IRF cellulaires, dont IRF-1 et IRF-3, inhibant leurs pouvoirs de transcription et de liaison à l'ADN (Lubyova et al., 2004). vIRF-2 interagit avec IRF1 et

vIRF-3, alors que vIRF-3 inhibe IRF-3 et IRF-7. Ces IRF viraux ont pour effet de réduire ou abolir l'activation de certains ISG, inhiber l'activation de eIF2 par PKR (Barnes et al., 2002), inhiber l'autophosphorylation de PKR et de séquestrer plusieurs facteurs de transcription essentiels tels que CBP/p300, IRF-2 et IRF-8.

En bref, nous avons exposé dans cette étude les effets de l'infection par le VIH et de la transfection du genome du VIH sur l'expression de différents gènes impliqués dans la cascade de l'interferon.

**CONCLUSIONS**

---

Malgré des milliers d'études sur le virus de l'immunodéficience humaine depuis sa découverte en 1983, les mécanismes par lesquels il échappe aux défenses antivirales naturelles demeurent incompris. Il est connu que le VIH perturbe la cascade de l'interféron, responsable en partie pour la première ligne de défense contre les pathogènes infectieux. Cependant, des résultats contradictoires sont issus d'études qui ont tenté d'incorporer l'interféron aux thérapies des patients, ainsi que d'études sur les cellules en culture. De plus, contrairement à d'autres virus tels que le virus de l'hépatite C, le mécanisme d'action du VIH lors de l'inhibition de la signalisation par l'IFN n'a toujours pas été éclairci. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier le rôle du VIH dans la modulation de la cascade de l'interféron. Notre première approche consistait à étudier l'effet de l'infection par le VIH sur l'activation de IRF-3 et IRF-7, des facteurs de transcription impliqués dans l'initiation de la cascade de l'IFN. Cependant, nous n'avons pas réussi à démontrer l'activation d'IRF-3 par le SeV, un stimulus souvent utilisé pour cet usage. Nous avons ensuite procédé à l'étude de la modulation des gènes impliqués dans la cascade de l'IFN par le VIH. Nous avons utilisé une micro puce commerciale contenant une centaine de gènes spécifiques à la cascade de l'IFN afin de comparer le patron d'expression des gènes dans des cellules infectées avec celui de cellules non-infectées. Nous avons trouvé que le VIH induit l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la résistance à l'IFN ainsi que des gènes qui stimulent la croissance des cellules. Le VIH induit par exemple les gènes des suppresseurs de signalisation par les cytokines -1 et -3 (SOCS-1 et SOCS-3) qui sont entravent la cascade de l'IFN en inhibant la signalisation par les STAT. L'infection par le VIH a aussi pour effet de stimuler le gène de la neuréguline-1, qui favorise la croissance cellulaire ainsi que le gène PRKRIP-1 qui inhibe l'activation de PRK. La transfection du génome du VIH dans les cellules mène à la

répression des gènes de l'IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\beta$  et de PML, un suppresseur de tumeurs avec des propriétés antivirales.

Ces résultats démontrent les effets d'ensemble sur la cascade de l'interféron causés par le VIH dans les cellules. La prochaine étape est de confirmer ces résultats en vérifiant si ces changements génétiques corrént avec des changements au niveau des protéines et d'établir quelles des protéines virales sont responsables pour ces modulations. Une fois que le mécanisme d'action du VIH aura été élucidé, il sera possible de mettre au point des thérapies ciblées sur les protéines virales responsables ou bien sur les éléments de la cascade affectées par le VIH.

**BIBLIOGRAPHIE**

- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R and Flavell RA (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**:732-8.
- Alimonti JB, Ball TB and Fowke KR (2003) Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol* **84**:1649-61.
- Armant MA and Fenton MJ (2002) Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol* **3**:REVIEWS3011.
- Au WC, Yeow WS and Pitha PM (2001) Analysis of functional domains of interferon regulatory factor 7 and its association with IRF-3. *Virology* **280**:273-82.
- Baca-Regen L, Heinzinger N, Stevenson M and Gendelman HE (1994) Alpha interferon-induced antiretroviral activities: restriction of viral nucleic acid synthesis and progeny virion production in human immunodeficiency virus type 1-infected monocytes. *J Virol* **68**:7559-65.
- Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, Kurrle R, Haigwood N, Sekaly RP and Finkel TH (1992) Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis. *J Exp Med* **176**:1099-106.
- Barchet W, Krug A, Cella M, Newby C, Fischer JA, Dzionek A, Pekosz A and Colonna M (2005) Dendritic cells respond to influenza virus through TLR7- and PKR-independent pathways. *Eur J Immunol* **35**:236-42.
- Barnes BJ, Kellum MJ, Field AE and Pitha PM (2002) Multiple regulatory domains of IRF-5 control activation, cellular localization, and induction of chemokines that mediate recruitment of T lymphocytes. *Mol Cell Biol* **22**:5721-40.
- Barnes BJ, Kellum MJ, Pinder KE, Frisancho JA and Pitha PM (2003) Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer Res* **63**:6424-31.

- Bednarik DP, Mosca JD, Raj NB and Pitha PM (1989) Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) replication by HIV-trans-activated alpha 2-interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:4958-62.
- Beignon AS, McKenna K, Skoberne M, Manches O, Dasilva I, Kavanagh DG, Larsson M, Gorelick RJ, Lifson JD and Bhardwaj N (2005) Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor- viral RNA interactions. *J Clin Invest* **115**:3265-3275.
- Bekisz J, Schmeisser H, Hernandez J, Goldman ND and Zoon KC (2004) Human interferons alpha, beta and omega. *Growth Factors* **22**:243-51.
- Bennett RL, Blalock WL and May WS (2004) Serine 18 phosphorylation of RAX, the PKR activator, is required for PKR activation and consequent translation inhibition. *J Biol Chem* **279**:42687-93.
- Bernstein HB, Tucker SP, Kar SR, McPherson SA, McPherson DT, Dubay JW, Lebowitz J, Compans RW and Hunter E (1995) Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41. *J Virol* **69**:2745-50.
- Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP, Wagner H, Kirschning CJ, Ter Meulen V and Schneider-Schaulies S (2002) Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* **76**:8729-36.
- Bose S and Banerjee AK (2003) Innate immune response against nonsegmented negative strand RNA viruses. *J Interferon Cytokine Res* **23**:401-12.
- Braganca J and Civas A (1998) Type I interferon gene expression: differential expression of IFN-A genes induced by viruses and double-stranded RNA. *Biochimie* **80**:673-87.

- Breiman A, Grandvaux N, Lin R, Ottone C, Akira S, Yoneyama M, Fujita T, Hiscott J and Meurs EF (2005) Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. *J Virol* **79**:3969-78.
- Cantin R, Methot S and Tremblay MJ (2005) Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses. *J Virol* **79**:6577-87.
- Capon DJ and Ward RH (1991) The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annu Rev Immunol* **9**:649-78.
- Caraglia M, Marra M, Pelaia G, Maselli R, Caputi M, Marsico SA and Abbruzzese A (2005) Alpha-interferon and its effects on signal transduction pathways. *J Cell Physiol* **202**:323-35.
- Certa U, Seiler M, Padovan E and Spagnoli GC (2002) Interferon- $\alpha$  sensitivity in melanoma cells: detection of potential response marker genes. *Recent Results Cancer Res* **160**:85-91.
- Chakravarti P, Henry MK and Quelle FW (2005) Prolactin and heregulin override DNA damage-induced growth arrest and promote phosphatidylinositol-3 kinase-dependent proliferation in breast cancer cells. *Int J Oncol* **26**:509-14.
- Chen J and Naumovski L (2002) Intracellular redistribution of interferon-inducible proteins Nmi and IFP 35 in apoptotic cells. *J Interferon Cytokine Res* **22**:237-43.
- Colamonici OR, Uyttendaele H, Domanski P, Yan H and Krolewski JJ (1994) p135tyk2, an interferon- $\alpha$ -activated tyrosine kinase, is physically associated with an interferon- $\alpha$  receptor. *J Biol Chem* **269**:3518-22.

- Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT and Finberg RW (2003) Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* **77**:4588-96.
- Cordelier P, Calarota SA, Pomerantz RJ, Xiaoshan J and Strayer DS (2003) Inhibition of HIV-1 in the central nervous system by IFN-alpha2 delivered by an SV40 vector. *J Interferon Cytokine Res* **23**:477-88.
- Cremer I, Vieillard V and De Maeyer E (2000) Retrovirally mediated IFN-beta transduction of macrophages induces resistance to HIV, correlated with up-regulation of RANTES production and down-regulation of C-C chemokine receptor-5 expression. *J Immunol* **164**:1582-7.
- Crozat K and Beutler B (2004) TLR7: A new sensor of viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:6835-6.
- Davis HE, Morgan JR and Yarmush ML (2002) Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophys Chem* **97**:159-72.
- de Mendoza C, Martin-Carbonero L, Gallego O, Corral A, Gonzalez-Lahoz J and Soriano V (2005) Relationship between drug resistance mutations, plasma viremia, and CD4+ T-cell counts in patients with chronic HIV infection. *J Med Virol* **76**:1-6.
- Del Corno M, Gauzzi MC, Penna G, Belardelli F, Adorini L and Gessani S (2005) Human immunodeficiency virus type 1 gp120 and other activation stimuli are highly effective in triggering alpha interferon and CC chemokine production in circulating plasmacytoid but not myeloid dendritic cells. *J Virol* **79**:12597-601.

- Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S and Reis e Sousa C (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**:1529-31.
- Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, Qazi N, Gilmour J, Gotch F and Patterson S (2001) Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* **98**:2574-6.
- D'Souza V and Summers MF (2005) How retroviruses select their genomes. *Nat Rev Microbiol* **3**:643-55.
- Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC and Levy DE (1996) Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* **84**:443-50.
- Erlandsson L, Blumenthal R, Eloranta ML, Engel H, Alm G, Weiss S and Leanderson T (1998) Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Curr Biol* **8**:223-6.
- Fall LS, Chams V, Le Coq H, Fouchard M, M'Bika JP, Gringeri A, Santagostino E and Bizzini B (1995) Evidence for an antiviral effect and interferon neutralizing capacity in human sera; variability and implications for HIV infection. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **41**:409-16.
- Fatkenheuer G, Theisen A, Rockstroh J, Grabow T, Wicke C, Becker K, Wieland U, Pfister H, Reiser M, Hegener P, Franzen C, Schwenk A and Salzberger B (1997) Virological treatment failure of protease inhibitor therapy in an unselected cohort of HIV-infected patients. *Aids* **11**:F113-6.

- Feinberg MB, Baltimore D and Frankel AD (1991) The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:4045-9.
- Felber BK, Drysdale CM and Pavlakis GN (1990) Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein. *J Virol* **64**:3734-41.
- Feldman SB, Milone MC, Kloser P and Fitzgerald-Bocarsly P (1995) Functional deficiencies in two distinct interferon alpha-producing cell populations in peripheral blood mononuclear cells from human immunodeficiency virus seropositive patients. *J Leukoc Biol* **57**:214-20.
- Ferbas J, Navratil J, Logar A and Rinaldo C (1995) Selective decrease in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-induced alpha interferon production by peripheral blood mononuclear cells during HIV-1 infection. *Clin Diagn Lab Immunol* **2**:138-42.
- Ferguson MR, Rojo DR, von Lindern JJ and O'Brien WA (2002) HIV-1 replication cycle. *Clin Lab Med* **22**:611-35.
- Fernandez-Cruz E, Lang JM, Frissen J, Furner V, Chateauvert M, Boucher CA, Dowd P and Stevens J (1995) Zidovudine plus interferon-alpha versus zidovudine alone in HIV-infected symptomatic or asymptomatic persons with CD4+ cell counts > 150 x 10(6)/L: results of the Zidon trial. Zidon Study Group. *Aids* **9**:1025-35.
- Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM and Golenbock DT (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* **198**:1043-55.
- Flexner C (1998) HIV-protease inhibitors. *N Engl J Med* **338**:1281-92.

- Floyd-Smith G and Denton JS (1988) A (2'-5')An-dependent endonuclease: tissue distribution in BALB/c mice and the effects of IFN-beta treatment and anti-IFN-alpha/beta immunoglobulin on the levels of the enzyme. *J Interferon Res* **8**:517-25.
- Fogli M, Costa P, Murdaca G, Setti M, Mingari MC, Moretta L, Moretta A and De Maria A (2004) Significant NK cell activation associated with decreased cytolytic function in peripheral blood of HIV-1-infected patients. *Eur J Immunol* **34**:2313-21.
- Fonteneau JF, Larsson M, Beignon AS, McKenna K, Dasilva I, Amara A, Liu YJ, Lifson JD, Littman DR and Bhardwaj N (2004) Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* **78**:5223-32.
- Fowke KR, D'Amico R, Chernoff DN, Pottage JC, Jr., Benson CA, Sha BE, Kessler HA, Landay AL and Shearer GM (1997) Immunologic and virologic evaluation after influenza vaccination of HIV-1-infected patients. *Aids* **11**:1013-21.
- Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R, Jr., Ikeda M, Lemon SM and Gale M, Jr. (2003) Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* **300**:1145-8.
- Francis ML, Meltzer MS and Gendelman HE (1992) Interferons in the persistence, pathogenesis, and treatment of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**:199-207.
- Freed EO (2001) HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* **26**:13-33.
- Friedrich TC, Dodds EJ, Yant LJ, Vojnov L, Rudersdorf R, Cullen C, Evans DT, Desrosiers RC, Mothe BR, Sidney J, Sette A, Kunstman K, Wolinsky S, Piatak M, Lifson J, Hughes AL, Wilson N, O'Connor DH and Watkins DI (2004) Reversion of CTL escape-variant immunodeficiency viruses in vivo. *Nat Med* **10**:275-81.

- Frissen PH, van der Ende ME, ten Napel CH, Weigel HM, Schreij GS, Kauffmann RH, Koopmans PP, Hoepelman AI, de Boer JB, Weverling GJ and et al. (1994) Zidovudine and interferon-alpha combination therapy versus zidovudine monotherapy in subjects with symptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* **169**:1351-5.
- Gale M, Jr. and Foy EM (2005) Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* **436**:939-45.
- Gallay P, Swingler S, Song J, Bushman F and Trono D (1995) HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* **83**:569-76.
- Gao X, Nelson GW, Karacki P, Martin MP, Phair J, Kaslow R, Goedert JJ, Buchbinder S, Hoots K, Vlahov D, O'Brien SJ and Carrington M (2001) Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N Engl J Med* **344**:1668-75.
- Garcia JV and Miller AD (1992) Downregulation of cell surface CD4 by nef. *Res Virol* **143**:52-5.
- Gendelman HE, Friedman RM, Joe S, Baca LM, Turpin JA, Dveksler G, Meltzer MS and Dieffenbach C (1990) A selective defect of interferon alpha production in human immunodeficiency virus-infected monocytes. *J Exp Med* **172**:1433-42.
- Gluzman Y (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**:175-82.
- Goepfert PA, Bansal A, Edwards BH, Ritter GD, Jr., Tellez I, McPherson SA, Sabbaj S and Mulligan MJ (2000) A significant number of human immunodeficiency virus epitope-

specific cytotoxic T lymphocytes detected by tetramer binding do not produce gamma interferon. *J Virol* **74**:10249-55.

Goodbourn S, Didcock L and Randall RE (2000) Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* **81**:2341-64.

Gottlinger HG, Sodroski JG and Haseltine WA (1989) Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5781-5.

Gougeon ML, Lecoœur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, Debord T and Montagnier L (1996) Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol* **156**:3509-20.

Grandvaux N, Servant MJ, tenOever B, Sen GC, Balachandran S, Barber GN, Lin R and Hiscott J (2002a) Transcriptional profiling of interferon regulatory factor 3 target genes: direct involvement in the regulation of interferon-stimulated genes. *J Virol* **76**:5532-9.

Grandvaux N, tenOever BR, Servant MJ and Hiscott J (2002b) The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. *Curr Opin Infect Dis* **15**:259-67.

Gringeri A, Santagostino E, Mannucci PM, Siracusano L, Marinoni A, Criscuolo M, Carcagno M, Fall LS, M'Bika JP, Bizzini B and et al. (1995) Anti-alpha interferon immunization: safety and immunogenicity in asymptomatic HIV positive patients at high risk of disease progression. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **41**:381-7.

Hamid T, Malik MT and Kakar SS (2005) Ectopic expression of PTTG1/securin promotes tumorigenesis in human embryonic kidney cells. *Mol Cancer* **4**:3.

- Harrison GP and Lever AM (1992) The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure. *J Virol* **66**:4144-53.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H and Bauer S (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**:1526-9.
- Heinzinger NK, Bukinsky MI, Haggerty SA, Ragland AM, Kewalramani V, Lee MA, Gendelman HE, Ratner L, Stevenson M and Emerman M (1994) The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:7311-5.
- Henriet S, Richer D, Bernacchi S, Decroly E, Vigne R, Ehresmann B, Ehresmann C, Paillart JC and Marquet R (2005) Cooperative and specific binding of Vif to the 5' region of HIV-1 genomic RNA. *J Mol Biol* **354**:55-72.
- Herzer K, Weyer S, Krammer PH, Galle PR and Hofmann TG (2005) Hepatitis C virus core protein inhibits tumor suppressor protein promyelocytic leukemia function in human hepatoma cells. *Cancer Res* **65**:10830-7.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM and Markowitz M (1995) Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123-6.
- Honda K, Mizutani T and Taniguchi T (2004a) Negative regulation of IFN-alpha/beta signaling by IFN regulatory factor 2 for homeostatic development of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2416-21.
- Honda K, Yanai H, Mizutani T, Negishi H, Shimada N, Suzuki N, Ohba Y, Takaoka A, Yeh WC and Taniguchi T (2004b) Role of a transductional-transcriptional processor

complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:15416-21.

Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N and Taniguchi T (2005) IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* **434**:772-7.

Hornung V, Schlender J, Guenther-Biller M, Rothenfusser S, Endres S, Conzelmann KK and Hartmann G (2004) Replication-dependent potent IFN-alpha induction in human plasmacytoid dendritic cells by a single-stranded RNA virus. *J Immunol* **173**:5935-43.

Iordanov MS, Wong J, Bell JC and Magun BE (2001) Activation of NF-kappaB by double-stranded RNA (dsRNA) in the absence of protein kinase R and RNase L demonstrates the existence of two separate dsRNA-triggered antiviral programs. *Mol Cell Biol* **21**:61-72.

Isaacs A and Lindenmann J (1987) Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res* **7**:429-38.

Izmailova E, Bertley FM, Huang Q, Makori N, Miller CJ, Young RA and Aldovini A (2003) HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages. *Nat Med* **9**:191-7.

Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ and Varmus HE (1988) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**:280-3.

Joseph AM, Kumar M and Mitra D (2005) Nef: "necessary and enforcing factor" in HIV infection. *Curr HIV Res* **3**:87-94.

- Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML and Chen IS (1995) The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol* **69**:6304-13.
- Kamga I, Kahi S, Develioglu L, Lichtner M, Maranon C, Deveau C, Meyer L, Goujard C, Lebon P, Sinet M and Hosmalin A (2005) Type I interferon production is profoundly and transiently impaired in primary HIV-1 infection. *J Infect Dis* **192**:303-10.
- Kanazawa N, Kurosaki M, Sakamoto N, Enomoto N, Itsui Y, Yamashiro T, Tanabe Y, Maekawa S, Nakagawa M, Chen CH, Kakinuma S, Oshima S, Nakamura T, Kato T, Wakita T and Watanabe M (2004) Regulation of hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 1. *J Virol* **78**:9713-20.
- Karin M (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **270**:16483-6.
- Kato A, Kiyotani K, Sakai Y, Yoshida T and Nagai Y (1997) The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *Embo J* **16**:578-87.
- Katze MG, He Y and Gale M, Jr. (2002) Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* **2**:675-87.
- Katze MG, Wambach M, Wong ML, Garfinkel M, Meurs E, Chong K, Williams BR, Hovanessian AG and Barber GN (1991) Functional expression and RNA binding analysis of the interferon-induced, double-stranded RNA-activated, 68,000-Mr protein kinase in a cell-free system. *Mol Cell Biol* **11**:5497-505.
- Kawai T, Sato S, Ishii KJ, Coban C, Hemmi H, Yamamoto M, Terai K, Matsuda M, Inoue J, Uematsu S, Takeuchi O and Akira S (2004) Interferon-alpha induction through Toll-

- like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* **5**:1061-8.
- Kedzierska K, Crowe SM, Turville S and Cunningham AL (2003) The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev Med Virol* **13**:39-56.
- Kim SY, Byrn R, Groopman J and Baltimore D (1989) Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol* **63**:3708-13.
- Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, Martin MA and Orenstein JM (1990) The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* **64**:621-9.
- Knight SC and Patterson S (1997) Bone marrow-derived dendritic cells, infection with human immunodeficiency virus, and immunopathology. *Annu Rev Immunol* **15**:593-615.
- Kostense S, Vandenberghe K, Joling J, Van Baarle D, Nanlohy N, Manting E and Miedema F (2002) Persistent numbers of tetramer+ CD8(+) T cells, but loss of interferon-gamma+ HIV-specific T cells during progression to AIDS. *Blood* **99**:2505-11.
- Krug A, French AR, Barchet W, Fischer JA, Dzionek A, Pingel JT, Orihuela MM, Akira S, Yokoyama WM and Colonna M (2004a) TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* **21**:107-19.
- Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S and Colonna M (2004b) Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* **103**:1433-7.

- Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, Walsh EE, Freeman MW, Golenbock DT, Anderson LJ and Finberg RW (2000) Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* **1**:398-401.
- Kwak JC, Ongusaha PP, Ouchi T and Lee SW (2003) IFI16 as a negative regulator in the regulation of p53 and p21(Waf1). *J Biol Chem* **278**:40899-904.
- Lange JM and van Leeuwen R (2002) Antiretroviral therapy and resistance to antiretroviral drugs. *Ethiop Med J* **40 Suppl 1**:51-75.
- Lapadat-Tapolsky M, De Rocquigny H, Van Gent D, Roques B, Plasterk R and Darlix JL (1993) Interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and viral DNA may have important functions in the viral life cycle. *Nucleic Acids Res* **21**:831-9.
- Lapenta C, Santini SM, Proietti E, Rizza P, Logozzi M, Spada M, Parlato S, Fais S, Pitha PM and Belardelli F (1999) Type I interferon is a powerful inhibitor of in vivo HIV-1 infection and preserves human CD4(+) T cells from virus-induced depletion in SCID mice transplanted with human cells. *Virology* **263**:78-88.
- Lau AS and Williams BR (1990) The role of interferon and tumor necrosis factor in the pathogenesis of AIDS. *J Exp Pathol* **5**:111-22.
- Lebon P, Bernard A and Boumsell L (1982) [Identification of lymphocyte populations producing alpha-interferon by monoclonal antibodies]. *C R Seances Acad Sci III* **295**:79-82.
- Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E and Cottam HB (2003) Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:6646-51.

- Leslie AJ, Pfafferott KJ, Chetty P, Draenert R, Addo MM, Feeney M, Tang Y, Holmes EC, Allen T, Prado JG, Altfeld M, Brander C, Dixon C, Ramduth D, Jeena P, Thomas SA, St John A, Roach TA, Kupfer B, Luzzi G, Edwards A, Taylor G, Lyall H, Tudor-Williams G, Novelli V, Martinez-Picado J, Kiepiela P, Walker BD and Goulder PJ (2004) HIV evolution: CTL escape mutation and reversion after transmission. *Nat Med* **10**:282-9.
- Levy DE and Marie IJ (2004) RIGging an antiviral defense--it's in the CARDs. *Nat Immunol* **5**:699-701.
- Levy JA (2003) The search for the CD8+ cell anti-HIV factor (CAF). *Trends Immunol* **24**:628-32.
- Lewerenz M, Mogensen KE and Uze G (1998) Shared receptor components but distinct complexes for alpha and beta interferons. *J Mol Biol* **282**:585-99.
- Li K, Foy E, Ferreon JC, Nakamura M, Ferreon AC, Ikeda M, Ray SC, Gale M, Jr. and Lemon SM (2005) Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:2992-7.
- Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM and Hiscott J (1998) Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **18**:2986-96.
- Lin R, Mamane Y and Hiscott J (1999) Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol* **19**:2465-74.
- Liu Y, George CX, Patterson JB and Samuel CE (1997) Functionally distinct double-stranded RNA-binding domains associated with alternative splice site variants of the

- interferon-inducible double-stranded RNA-specific adenosine deaminase. *J Biol Chem* **272**:4419-28.
- Lore K and Larsson M (2003) The role of dendritic cells in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Apmis* **111**:776-88.
- Lu J, Chuntharapai A, Beck J, Bass S, Ow A, De Vos AM, Gibbs V and Kim KJ (1998) Structure-function study of the extracellular domain of the human IFN-alpha receptor (hIFNAR1) using blocking monoclonal antibodies: the role of domains 1 and 2. *J Immunol* **160**:1782-8.
- Lubyova B, Kellum MJ, Frisancho AJ and Pitha PM (2004) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded vIRF-3 stimulates the transcriptional activity of cellular IRF-3 and IRF-7. *J Biol Chem* **279**:7643-54.
- Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R and Iwasaki A (2003) Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* **198**:513-20.
- Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, Iwasaki A and Flavell RA (2004) Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:5598-603.
- Luria S, Chambers I and Berg P (1991) Expression of the type 1 human immunodeficiency virus Nef protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukin 2 mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:5326-30.
- Malakhov MP, Kim KI, Malakhova OA, Jacobs BS, Borden EC and Zhang DE (2003) High-throughput immunoblotting. Ubiquitin-like protein ISG15 modifies key regulators of signal transduction. *J Biol Chem* **278**:16608-13.

- Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV and Cullen BR (1989) The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-7.
- Malmgaard L (2004) Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* **24**:439-54.
- Mann DL, O'Brien SJ, Gilbert DA, Reid Y, Popovic M, Read-Connole E, Gallo RC and Gazdar AF (1989) Origin of the HIV-susceptible human CD4+ cell line H9. *AIDS Res Hum Retroviruses* **5**:253-5.
- McGrath KM, Hoffman NG, Resch W, Nelson JA and Swanstrom R (2001) Using HIV-1 sequence variability to explore virus biology. *Virus Res* **76**:137-60.
- McWhirter SM, Fitzgerald KA, Rosains J, Rowe DC, Golenbock DT and Maniatis T (2004) IFN-regulatory factor 3-dependent gene expression is defective in Tbk1-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:233-8.
- Meurs E, Chong K, Galabru J, Thomas NS, Kerr IM, Williams BR and Hovanessian AG (1990) Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* **62**:379-90.
- Meylan PR, Guatelli JC, Munis JR, Richman DD and Kornbluth RS (1993) Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferons-alpha, -beta, and -gamma in primary human macrophages. *Virology* **193**:138-48.
- Miller K, McArdle S, Gale MJ, Jr., Geller DA, Tenover B, Hiscott J, Gretch DR and Polyak SJ (2004) Effects of the hepatitis C virus core protein on innate cellular defense pathways. *J Interferon Cytokine Res* **24**:391-402.

- Miller MD, Warmerdam MT, Gaston I, Greene WC and Feinberg MB (1994) The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med* **179**:101-13.
- Minowada J, Onuma T and Moore GE (1972) Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes. *J Natl Cancer Inst* **49**:891-5.
- Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G and Uze G (1999) The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res* **19**:1069-98.
- Moog C, Fleury HJ, Pellegrin I, Kirn A and Aubertin AM (1997) Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **71**:3734-41.
- Moore CB, John M, James IR, Christiansen FT, Witt CS and Mallal SA (2002) Evidence of HIV-1 adaptation to HLA-restricted immune responses at a population level. *Science* **296**:1439-43.
- Morikawa Y (2003) HIV capsid assembly. *Curr HIV Res* **1**:1-14.
- Nakaya T, Sato M, Hata N, Asagiri M, Suemori H, Noguchi S, Tanaka N and Taniguchi T (2001) Gene induction pathways mediated by distinct IRFs during viral infection. *Biochem Biophys Res Commun* **283**:1150-6.
- Nisole S, Stoye JP and Saib A (2005) TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* **3**:799-808.
- Novick D, Cohen B and Rubinstein M (1994) The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* **77**:391-400.

- Otsuka M, Kato N, Moriyama M, Taniguchi H, Wang Y, Dharel N, Kawabe T and Omata M (2005) Interaction between the HCV NS3 protein and the host TBK1 protein leads to inhibition of cellular antiviral responses. *Hepatology* **41**:1004-12.
- Pacanowski J, Kahi S, Baillet M, Lebon P, Deveau C, Goujard C, Meyer L, Oksenhendler E, Sinet M and Hosmalin A (2001) Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* **98**:3016-21.
- Palmer P, Charley B, Rombaut B, Daeron M and Lebon P (2000) Antibody-dependent induction of type I interferons by poliovirus in human mononuclear blood cells requires the type II fcgamma receptor (CD32). *Virology* **278**:86-94.
- Palucka K and Banchereau J (2002) How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses. *Curr Opin Immunol* **14**:420-31.
- Parada CA and Roeder RG (1996) Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature* **384**:375-8.
- Paranjape RS (2005) Immunopathogenesis of HIV infection. *Indian J Med Res* **121**:240-55.
- Pestka S (1981) Interferons. Part B. Introduction. *Methods Enzymol* **79**:xxxi-xxxiv.
- Pestka S, Evinger M, Maeda S, Rehberg E, Familletti PC and Kelder B (1981) Biological properties of natural and recombinant interferons. *Tex Rep Biol Med* **41**:31-6.
- Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ, Fink LM, Zhou JY, Zhou JT, Bolognesi DP, Fauci AS and Montefiori DC (1997) Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J Infect Dis* **176**:924-32.
- Platanias LC and Fish EN (1999) Signaling pathways activated by interferons. *Exp Hematol* **27**:1583-92.

- Platanias LC, Uddin S, Yetter A, Sun XJ and White MF (1996) The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 2. *J Biol Chem* **271**:278-82.
- Poli G, Biswas P and Fauci AS (1994) Interferons in the pathogenesis and treatment of human immunodeficiency virus infection. *Antiviral Res* **24**:221-33.
- Quaranta MG, Mattioli B, Giordani L and Viora M (2004) HIV-1 Nef equips dendritic cells to reduce survival and function of CD8+ T cells: a mechanism of immune evasion. *Faseb J* **18**:1459-61.
- Rassa JC and Ross SR (2003) Viruses and Toll-like receptors. *Microbes Infect* **5**:961-8.
- Reich NC (2002) Nuclear/cytoplasmic localization of IRFs in response to viral infection or interferon stimulation. *J Interferon Cytokine Res* **22**:103-9.
- Roebuck KA and Saifuddin M (1999) Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Expr* **8**:67-84.
- Rogel ME, Wu LI and Emerman M (1995) The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J Virol* **69**:882-8.
- Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U and Sinigaglia F (1997) Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* **185**:825-31.
- Romagnani S (1992) Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol Today* **13**:379-81.
- Roy S, Delling U, Chen CH, Rosen CA and Sonenberg N (1990) A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for Tat binding and Tat-mediated trans-activation. *Genes Dev* **4**:1365-73.

- Ruben S, Perkins A, Purcell R, Joung K, Sia R, Burghoff R, Haseltine WA and Rosen CA (1989) Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* **63**:1-8.
- Rybarczyk BJ, Montefiori D, Johnson PR, West A, Johnston RE and Swanstrom R (2004) Correlation between env V1/V2 region diversification and neutralizing antibodies during primary infection by simian immunodeficiency virus sm in rhesus macaques. *J Virol* **78**:3561-71.
- Sambrook J, Fritsch, E. F., and T. Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, New York.
- Samuel CE (2001) Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**:778-809, table of contents.
- Sato A, Igarashi H, Adachi A and Hayami M (1990) Identification and localization of vpr gene product of human immunodeficiency virus type 1. *Virus Genes* **4**:303-12.
- Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K and Akira S (2003) Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* **171**:4304-10.
- Schindler C, Shuai K, Prezioso VR and Darnell JE, Jr. (1992) Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* **257**:809-13.
- Schmidt B, Ashlock BM, Foster H, Fujimura SH and Levy JA (2005) HIV-infected cells are major inducers of plasmacytoid dendritic cell interferon production, maturation, and migration. *Virology* **343**:256-66.

- Schneider U, Schwenk HU and Bornkamm G (1977) Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* **19**:621-6.
- Schubert U, Bour S, Ferrer-Montiel AV, Montal M, Maldarell F and Strebel K (1996) The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *J Virol* **70**:809-19.
- Sen GC (2001) Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* **55**:255-81.
- Servant MJ, Grandvaux N, tenOever BR, Duguay D, Lin R and Hiscott J (2003) Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA. *J Biol Chem* **278**:9441-7.
- Servant MJ, ten Oever B, LePage C, Conti L, Gessani S, Julkunen I, Lin R and Hiscott J (2001) Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Biol Chem* **276**:355-63.
- Seya T, Oshiumi H, Sasai M, Akazawa T and Matsumoto M (2005) TICAM-1 and TICAM-2: toll-like receptor adapters that participate in induction of type 1 interferons. *Int J Biochem Cell Biol* **37**:524-9.
- Sharf R, Azriel A, Lejbkowitz F, Winograd SS, Ehrlich R and Levi BZ (1995) Functional domain analysis of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) and its association with interferon regulatory factors. *J Biol Chem* **270**:13063-9.
- Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R and Hiscott J (2003) Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* **300**:1148-51.
- Shirazi Y and Pitha PM (1992) Alpha interferon inhibits early stages of the human immunodeficiency virus type 1 replication cycle. *J Virol* **66**:1321-8.

- Shirazi Y and Pitha PM (1993) Interferon alpha-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 provirus synthesis in T-cells. *Virology* **193**:303-12.
- Shuai K, Ziemiecki A, Wilks AF, Harpur AG, Sadowski HB, Gilman MZ and Darnell JE (1993) Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature* **366**:580-3.
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S and Liu YJ (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**:1835-7.
- Sierra S, Kupfer B and Kaiser R (2005) Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol* **34**:233-44.
- Skillman DR, Malone JL, Decker CF, Wagner KF, Mapou RL, Liao MJ, Testa D and Meltzer MS (1996) Phase I trial of interferon alfa-n3 in early-stage human immunodeficiency virus type 1 disease: evidence for drug safety, tolerance, and antiviral activity. *J Infect Dis* **173**:1107-14.
- Smith MS, Thresher RJ and Pagano JS (1991) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 morphogenesis in T cells by alpha interferon. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:62-7.
- Smith PL, Lombardi G and Foster GR (2005) Type I interferons and the innate immune response--more than just antiviral cytokines. *Mol Immunol* **42**:869-77.
- Soumelis V, Scott I, Gheyas F, Bouhour D, Cozon G, Cotte L, Huang L, Levy JA and Liu YJ (2001) Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* **98**:906-12.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH and Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* **67**:227-64.

- Stranden AM, Staeheli P and Pavlovic J (1993) Function of the mouse Mx1 protein is inhibited by overexpression of the PB2 protein of influenza virus. *Virology* **197**:642-51.
- Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T and Martin MA (1987) The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **328**:728-30.
- Stylianou E, Aukrust P, Muller F, Nordoy I and Froland SS (2001) Complex effects of interferon-alpha on the cytokine network in HIV infection--possible contribution to immunosuppression. *Cytokine* **14**:56-62.
- Sundstrom C and Nilsson K (1976) Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* **17**:565-77.
- Tahara E, Jr., Tahara H, Kanno M, Naka K, Takeda Y, Matsuzaki T, Yamazaki R, Ishihara H, Yasui W, Barrett JC, Ide T and Tahara E (2005) G1P3, an interferon inducible gene 6-16, is expressed in gastric cancers and inhibits mitochondrial-mediated apoptosis in gastric cancer cell line TMK-1 cell. *Cancer Immunol Immunother* **54**:729-40.
- Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, Kano S, Honda K, Ohba Y, Mak TW and Taniguchi T (2005) Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* **434**:243-9.
- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A and Tanaka N (2001) IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu Rev Immunol* **19**:623-55.
- Taylor MW, Grosse WM, Schaley JE, Sanda C, Wu X, Chien SC, Smith F, Wu TG, Stephens M, Ferris MW, McClintick JN, Jerome RE and Edenberg HJ (2004) Global effect of PEG-IFN-alpha and ribavirin on gene expression in PBMC in vitro. *J Interferon Cytokine Res* **24**:107-18.

- tenOever BR, Servant MJ, Grandvaux N, Lin R and Hiscott J (2002) Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J Virol* **76**:3659-69.
- Thali M, Bukovsky A, Kondo E, Rosenwirth B, Walsh CT, Sodroski J and Gottlinger HG (1994) Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* **372**:363-5.
- Thornton AM, Buller RM, DeVico AL, Wang IM and Ozato K (1996) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 and vaccinia virus infection by a dominant negative factor of the interferon regulatory factor family expressed in monocytic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:383-7.
- Tosi MF (2005) Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol* **116**:241-9; quiz 250.
- Tripp RA, Oshansky C and Alvarez R (2005) Cytokines and respiratory syncytial virus infection. *Proc Am Thorac Soc* **2**:147-9.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T and Tada K (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* **26**:171-6.
- Veals SA, Schindler C, Leonard D, Fu XY, Aebersold R, Darnell JE, Jr. and Levy DE (1992) Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **12**:3315-24.
- Vieillard V, Cremer I, Lauret E, Rozenbaum W, Debre P, Autran B and De Maeyer E (1997) Interferon beta transduction of peripheral blood lymphocytes from HIV-infected donors increases Th1-type cytokine production and improves the proliferative response to recall antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:11595-600.

- Wang K, Scheel-Toellner D, Wong SH, Craddock R, Caamano J, Akbar AN, Salmon M and Lord JM (2003) Inhibition of neutrophil apoptosis by type 1 IFN depends on cross-talk between phosphoinositol 3-kinase, protein kinase C-delta, and NF-kappa B signaling pathways. *J Immunol* **171**:1035-41.
- Weaver BK, Kumar KP and Reich NC (1998) Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1. *Mol Cell Biol* **18**:1359-68.
- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD and Shaw GM (2003) Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**:307-12.
- Wilflingseder D, Mullauer B, Schramek H, Banki Z, Pruenster M, Dierich MP and Stoiber H (2004) HIV-1-induced migration of monocyte-derived dendritic cells is associated with differential activation of MAPK pathways. *J Immunol* **173**:7497-505.
- Willey RL, Maldarelli F, Martin MA and Strebel K (1992) Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* **66**:7193-200.
- Williams BR (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene* **18**:6112-20.
- Wisdom R (1999) AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res* **253**:180-5.
- Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z and Shu HB (2005) VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* **19**:727-40.
- Yan H, Krishnan K, Greenlund AC, Gupta S, Lim JT, Schreiber RD, Schindler CW and Krolewski JJ (1996) Phosphorylated interferon-alpha receptor 1 subunit (IFN $\alpha$ R1) acts as a docking site for the latent form of the 113 kDa STAT2 protein. *Embo J* **15**:1064-74.

- Yang H, Lin CH, Ma G, Orr M, Baffi MO and Wathélet MG (2002) Transcriptional activity of interferon regulatory factor (IRF)-3 depends on multiple protein-protein interactions. *Eur J Biochem* **269**:6142-51.
- Yin Z, Haynie J, Williams BR and Yang YC (2003) C114 is a novel IL-11-inducible nuclear double-stranded RNA-binding protein that inhibits protein kinase R. *J Biol Chem* **278**:22838-45.
- Yokota S, Yokosawa N, Okabayashi T, Suzutani T, Miura S, Jimbow K and Fujii N (2004) Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 contributes to inhibition of the interferon signaling pathway. *J Virol* **78**:6282-6.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M, Jr., Akira S, Yonehara S, Kato A and Fujita T (2005) Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* **175**:2851-8.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S and Fujita T (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5**:730-7.
- Yoneyama M, Suhara W and Fujita T (2002) Control of IRF-3 activation by phosphorylation. *J Interferon Cytokine Res* **22**:73-6.
- Yonezawa A, Morita R, Takaori-Kondo A, Kadowaki N, Kitawaki T, Hori T and Uchiyama T (2003) Natural alpha interferon-producing cells respond to human immunodeficiency virus type 1 with alpha interferon production and maturation into dendritic cells. *J Virol* **77**:3777-84.
- Zagury D, Lachgar A, Chams V, Fall LS, Bernard J, Zagury JF, Bizzini B, Gringeri A, Santagostino E, Rappaport J, Feldman M, Burny A and Gallo RC (1998) Interferon

alpha and Tat involvement in the immunosuppression of uninfected T cells and C-C chemokine decline in AIDS. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3851-6.

Zapp ML and Green MR (1989) Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* **342**:714-6.

Zhang HM, Yuan J, Cheung P, Chau D, Wong BW, McManus BM and Yang D (2005) Gamma interferon-inducible protein 10 induces HeLa cell apoptosis through a p53-dependent pathway initiated by suppression of human papillomavirus type 18 E6 and E7 expression. *Mol Cell Biol* **25**:6247-58.

Zhao C, Denison C, Huibregtse JM, Gygi S and Krug RM (2005) Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:10200-5.

**ANNEXES**

---

**ANNEXE I : LISTE DES GÈNES ET PLAN DE LA MICRO PUCE**

| <b>Array Layout</b> |              |                |              |               |               |               |              |
|---------------------|--------------|----------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| ADAR<br>1           | ARL5<br>2    | ATF5<br>3      | B2M<br>4     | BAG3<br>5     | BST2<br>6     | IFI44L<br>7   | C6orf85<br>8 |
| CASP1<br>9          | CAV1<br>10   | CBFB<br>11     | CDKN1B<br>12 | CNP<br>13     | COL16A1<br>14 | CXCL10<br>15  | DAD1<br>16   |
| DIABLO<br>17        | DNAJB2<br>18 | SHFM1<br>19    | G1P2<br>20   | G1P3<br>21    | GBP1<br>22    | GBP2<br>23    | GCH1<br>24   |
| H19<br>25           | HLA-A<br>26  | HLA-B<br>27    | HOXB2<br>28  | HSPA6<br>29   | IFI16<br>30   | IFI27<br>31   | IFI30<br>32  |
| IFI35<br>33         | IFI44<br>34  | IFIT1<br>35    | IFIT2<br>36  | IFIT3<br>37   | IFIT5<br>38   | IFITM1<br>39  | IFITM2<br>40 |
| IFNA1<br>41         | IFNAR1<br>42 | IFNAR2<br>43   | IFNB1<br>44  | IFNG<br>45    | IFNW1<br>46   | IFRD1<br>47   | IFRD2<br>48  |
| IL2RB<br>49         | IRF1<br>50   | IRF2<br>51     | IRF3<br>52   | IRF5<br>53    | IRF7<br>54    | ISG20<br>55   | ISGF3G<br>56 |
| ITIH2<br>57         | JAK1<br>58   | KIAA1268<br>59 | KLK3<br>60   | LAMP1<br>61   | MAL<br>62     | MAP2K1<br>63  | MET<br>64    |
| MNT<br>65           | MX1<br>66    | MX2<br>67      | MYC<br>68    | MYD88<br>69   | NMI<br>70     | NRG1<br>71    | OAS1<br>72   |
| OAS2<br>73          | OASL<br>74   | PLA2G1B<br>75  | PML<br>76    | PRKCZ<br>77   | PRKRA<br>78   | PRKRIP1<br>79 | PSME2<br>80  |
| PTTG1<br>81         | RCBTB1<br>82 | SAMSN1<br>83   | SH2D1A<br>84 | SLC1A2<br>85  | SOCS1<br>86   | SOCS3<br>87   | STAT1<br>88  |
| STAT2<br>89         | TAP1<br>90   | TNFSF10<br>91  | TNFSF7<br>92 | TRIM22<br>93  | TRIM34<br>94  | TYK2<br>95    | VEGF<br>96   |
| PUC18<br>97         | PUC18<br>98  | PUC18<br>99    | Blank<br>100 | Blank<br>101  | Blank<br>102  | GAPDH<br>103  | GAPDH<br>104 |
| PPIA<br>105         | PPIA<br>106  | PPIA<br>107    | PPIA<br>108  | RPL13A<br>109 | RPL13A<br>110 | ACTB<br>111   | ACTB<br>112  |

## Gene Table

| Position | Unigene   | GeneBank  | Symbol  | Description  | Gene Name      |
|----------|-----------|-----------|---------|--|----------------|
| 1        | Hs.12341  | NM_001111 | ADAR    | Adenosine deaminase, RNA-specific  | ADAR1/DRADA    |
| 2        | Hs.470233 | NM_177985 | ARL5    | ADP-ribosylation factor-like 5   | ARL5           |
| 3        | Hs.9754   | NM_012068 | ATF5    | Activating transcription factor 5  | ATFX/HMFN0395  |
| 4        | Hs.534255 | NM_004048 | B2M     | Beta-2-microglobulin   | B2M            |
| 5        | Hs.523309 | NM_004281 | BAG3    | BCL2-associated athanogene 3   | BAG-3/BIS      |
| 6        | Hs.118110 | NM_004335 | BST2    | Bone marrow stromal cell antigen 2   | BST2           |
| 7        | Hs.389724 | NM_006820 | IFI44L  | Interferon-induced protein 44-like   | GS3686         |
| 8        | Hs.132340 | NM_021945 | C6orf85 | Chromosome 6 open reading frame 85   | LOC390007      |
| 9        | Hs.2490   | NM_033292 | CASP1   | Caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase) | ICE/IL1BC      |
| 10       | Hs.74034  | NM_001753 | CAV1    | Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa  | 22KD/CAV       |
| 11       | Hs.460988 | NM_001755 | CBFB    | Core-binding factor, beta subunit  | PEBP2B         |
| 12       | Hs.238990 | NM_004064 | CDKN1B  | Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)                                 | CDKN4/KIP1     |
| 13       | Hs.273621 | NM_033133 | CNP     | 2',3'-cyclic nucleotide 3' phosphodiesterase                                     | CNP1           |
| 14       | Hs.368921 | NM_001856 | COL16A1 | Collagen, type XVI, alpha 1  | 447AA/FP1572   |
| 15       | Hs.413924 | NM_001565 | CXCL10  | Chemokine (C-X-C motif) ligand 10  | C7/CRG-2       |
| 16       | Hs.82890  | NM_001344 | DAD1    | Defender against cell death 1  | DAD-1          |
| 17       | Hs.169611 | NM_138930 | DIABLO  | Diablo homolog (Drosophila)  | DIABLO-S/SMAC  |
| 18       | Hs.77768  | NM_006736 | DNAJB2  | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 2                                      | HSJ1/HSPF3     |
| 19       | Hs.489201 | NM_006304 | SHFM1   | Split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1                               | DSS1/ECD       |
| 20       | Hs.458485 | NM_005101 | G1P2    | Interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)                              | IFI15/ISG15    |
| 21       | Hs.523847 | NM_002038 | G1P3    | Interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-6-16)                             | 6-16/IFI616    |
| 22       | Hs.62661  | NM_002053 | GBP1    | Guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa                         | 67KD           |
| 23       | Hs.386567 | NM_004120 | GBP2    | Guanylate binding protein 2, interferon-inducible                                | GBP2           |
| 24       | Hs.86724  | NM_000161 | GCH1    | GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia)                                  | DYT5/GCH       |
| 25       | Hs.415722 | BC040073  | H19     | H19, imprinted maternally expressed untranslated mRNA                            | LOC283120      |
| 26       | Hs.549038 | NM_002116 | HLA-A   | Major histocompatibility complex, class I, A                                     | HLA-A          |
| 27       | Hs.77961  | NM_005514 | HLA-B   | Major histocompatibility complex, class I, B                                     | B*4601         |
| 28       | Hs.514289 | NM_002145 | HOXB2   | Homeo box B2   | HOX2/HOX2H     |
| 29       | Hs.3268   | NM_002155 | HSPA6   | Heat shock 70kDa protein 6 (HSP70B')   | HSP70B         |
| 30       | Hs.380250 | NM_005531 | IFI16   | Interferon, gamma-inducible protein 16   | IFNGIP1/PYHIN2 |
| 31       | Hs.532634 | NM_005532 | IFI27   | Interferon, alpha-inducible protein 27   | ISG12/P27      |
| 32       | Hs.14623  | NM_006332 | IFI30   | Interferon, gamma-inducible protein 30   | GILT/IFI-30    |
| 33       | Hs.50842  | NM_005533 | IFI35   | Interferon-induced protein 35  | IFP35          |
| 34       | Hs.82316  | NM_006417 | IFI44   | Interferon-induced protein 44  | MTAP44/P44     |
| 35       | Hs.20315  | NM_001548 | IFIT1   | Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1                      | G10P1/GARG-16  |
| 36       | Hs.437609 | NM_001547 | IFIT2   | Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2                      | CIG42/G10P2    |
| 37       | Hs.549041 | NM_001549 | IFIT3   | Interferon-induced protein with tetratricopeptide                                | CIG-49/GARG-49 |

|    |           |           |          |  |                     |
|----|-----------|-----------|----------|--|---------------------|
| 38 | Hs.252839 | NM_012420 | IFIT5    | repeats 3<br>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5           | RI58                |
| 39 | Hs.458414 | NM_003641 | IFITM1   | Interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)                                  | 9-27/CD225          |
| 40 | Hs.174195 | NM_006435 | IFITM2   | Interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)                                  | 1-8D                |
| 41 | Hs.37026  | NM_024013 | IFNA1    | Interferon, alpha 1  | IFL/IFN             |
| 42 | Hs.529400 | NM_000629 | IFNAR1   | Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1                                      | AVP/IFN-ALPHA-REC   |
| 43 | Hs.549042 | NM_000874 | IFNAR2   | Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2                                      | IFN-ALPHA-REC/IFN-R |
| 44 | Hs.93177  | NM_002176 | IFNB1    | Interferon, beta 1, fibroblast   | IFB/IFF             |
| 45 | Hs.856    | NM_000619 | IFNG     | Interferon, gamma  | IFG/IFI             |
| 46 | Hs.73010  | NM_002177 | IFNW1    | Interferon, omega 1  | IFNW1               |
| 47 | Hs.7879   | NM_001550 | IFRD1    | Interferon-related developmental regulator 1                                       | PC4/TIS7            |
| 48 | Hs.315177 | NM_006764 | IFRD2    | Interferon-related developmental regulator 2                                       | IFNRP/SKMC15        |
| 49 | Hs.474787 | NM_000878 | IL2RB    | Interleukin 2 receptor, beta   | P70-75              |
| 50 | Hs.436061 | NM_002198 | IRF1     | Interferon regulatory factor 1   | IRF-1/MAR           |
| 51 | Hs.374097 | NM_002199 | IRF2     | Interferon regulatory factor 2   | IRF-2               |
| 52 | Hs.75254  | NM_001571 | IRF3     | Interferon regulatory factor 3   | IRF-3               |
| 53 | Hs.521181 | NM_002200 | IRF5     | Interferon regulatory factor 5   | IRF5                |
| 54 | Hs.166120 | NM_001572 | IRF7     | Interferon regulatory factor 7   | IRF-7H/IRF7A        |
| 55 | Hs.459265 | NM_002201 | ISG20    | Interferon stimulated gene 20kDa   | HEM45               |
| 56 | Hs.1706   | NM_006084 | ISGF3G   | Interferon-stimulated transcription factor 3, gamma 48kDa                          | IRF-9/IRF9          |
| 57 | Hs.75285  | NM_002216 | ITIH2    | Inter-alpha (globulin) inhibitor H2  | H2P                 |
| 58 | Hs.551505 | NM_002227 | JAK1     | Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)   | JAK1A/JAK1B         |
| 59 | Hs.152925 | XM_291055 | KIAA1268 | KIAA1268 protein   | KIAA1268            |
| 60 | Hs.171995 | NM_001648 | KLK3     | Kallikrein 3, (prostate specific antigen)  | APS/HK3             |
| 61 | Hs.494419 | NM_005561 | LAMP1    | Lysosomal-associated membrane protein 1  | CD107A/LAMPA        |
| 62 | Hs.80395  | NM_002371 | MAL      | Mal, T-cell differentiation protein  | MAL                 |
| 63 | Hs.145442 | NM_002755 | MAP2K1   | Mitogen-activated protein kinase kinase 1  | MAPKK1/MEK1         |
| 64 | Hs.132966 | NM_000245 | MET      | Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)                             | HGFR/RCCP2          |
| 65 | Hs.253552 | NM_020310 | MNT      | MAX binding protein  | MAD6/MXD6           |
| 66 | Hs.517307 | NM_002462 | MX1      | Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse) | IFI-78K/IFI78       |
| 67 | Hs.926    | NM_002463 | MX2      | Myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)                                   | MXB                 |
| 68 | Hs.202453 | NM_002467 | MYC      | V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)                              | C-MYC               |
| 69 | Hs.82116  | NM_002468 | MYD88    | Myeloid differentiation primary response gene (88)                                 | MyD88               |
| 70 | Hs.54483  | NM_004688 | NMI      | N-myc (and STAT) interactor  | NMI                 |
| 71 | Hs.453951 | NM_013957 | NRG1     | Neuregulin 1   | ARIA/GGF            |
| 72 | Hs.524760 | NM_002534 | OAS1     | 2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa  | IFI-4/OIAS          |

|     |           |           |         |   |                |
|-----|-----------|-----------|---------|---|----------------|
| 73  | Hs.414332 | NM_002535 | OAS2    | 2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa   | P69            |
| 74  | Hs.118633 | NM_003733 | OASL    | 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like  | P59OASL/TRIP14 |
| 75  | Hs.992    | NM_000928 | PLA2G1B | Phospholipase A2, group IB (pancreas)   | PLA2/PLA2A     |
| 76  | Hs.526464 | NM_033238 | PML     | Promyelocytic leukemia  | MYL/PP8675     |
| 77  | Hs.496255 | NM_002744 | PRKCZ   | Protein kinase C, zeta (PRKCZ), mRNA  | PKC2           |
| 78  | Hs.405537 | NM_003690 | PRKRA   | Protein kinase, interferon-inducible double stranded RNA dependent activator          | HSD14/PACT     |
| 79  | Hs.406395 | NM_024653 | PRKRIP1 | PRKR interacting protein 1 (IL11 inducible)   | C114           |
| 80  | Hs.434081 | NM_002818 | PSME2   | Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)                       | PA28B/PA28BETA |
| 81  | Hs.350966 | NM_004219 | PTTG1   | Pituitary tumor-transforming 1  | EAP1/HPTTG     |
| 82  | Hs.508021 | NM_018191 | RCBTB1  | Regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing protein 1 | CLLD7/CLLL7    |
| 83  | Hs.473341 | NM_022136 | SAMSN1  | SAM domain, SH3 domain and nuclear localisation signals, 1                            | HACS1          |
| 84  | Hs.349094 | NM_002351 | SH2D1A  | SH2 domain protein 1A, Duncan's disease (lymphoproliferative syndrome)                | DSHP/EBVS      |
| 85  | Hs.502338 | NM_004171 | SLC1A2  | Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2         | EAAT2/GLT-1    |
| 86  | Hs.50640  | NM_003745 | SOCS1   | Suppressor of cytokine signaling 1  | CIS1/CISH1     |
| 87  | Hs.527973 | NM_003955 | SOCS3   | Suppressor of cytokine signaling 3  | CIS3/CISH3     |
| 88  | Hs.470943 | NM_007315 | STAT1   | Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa                             | ISGF-3/STAT91  |
| 89  | Hs.530595 | NM_005419 | STAT2   | Signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa                            | 113KD/ISGF-3   |
| 90  | Hs.352018 | NM_000593 | TAP1    | Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)                           | ABC17/ABCB2    |
| 91  | Hs.478275 | NM_003810 | TNFSF10 | Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10                                 | APO-2L/APO2L   |
| 92  | Hs.501497 | NM_001252 | TNFSF7  | Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7                                  | CD27L/CD27LG   |
| 93  | Hs.501778 | NM_006074 | TRIM22  | Tripartite motif-containing 22  | GPSTAF50/RNF94 |
| 94  | Hs.125300 | NM_021616 | TRIM34  | Tripartite motif-containing 6 and tripartite motif-containing 34                      | IFP1/RNF21     |
| 95  | Hs.75516  | NM_003331 | TYK2    | Tyrosine kinase 2   | JTK1           |
| 96  | Hs.73793  | NM_003376 | VEGF    | Vascular endothelial growth factor  | VEGFA          |
| 97  | N/A       | L08752    | PUC18   | PUC18 Plasmid DNA   | pUC18          |
| 98  | N/A       | L08752    | PUC18   | PUC18 Plasmid DNA   | pUC18          |
| 99  | N/A       | L08752    | PUC18   | PUC18 Plasmid DNA   | pUC18          |
| 100 |           |           |         |   |                |
| 101 |           |           |         |   |                |
| 102 |           |           |         |   |                |
| 103 | Hs.544577 | NM_002046 | GAPDH   | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  | G3PD/GAPD      |
| 104 | Hs.544577 | NM_002046 | GAPDH   | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  | G3PD/GAPD      |
| 105 | Hs.356331 | NM_021130 | PPIA    | Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)  | CYPA/CYPH      |
| 106 | Hs.356331 | NM_021130 | PPIA    | Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)  | CYPA/CYPH      |
| 107 | Hs.356331 | NM_021130 | PPIA    | Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)  | CYPA/CYPH      |

|     |                    |        |  |           |
|-----|--------------------|--------|--|-----------|
| 108 | Hs.356331NM_021130 | PPIA   | Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) | CYPA/CYPH |
| 109 | Hs.546356NM_012423 | RPL13A | Ribosomal protein L13a                     | RPL13A    |
| 110 | Hs.546356NM_012423 | RPL13A | Ribosomal protein L13a                     | RPL13A    |
| 111 | Hs.520640NM_001101 | ACTB   | Actin, beta                                | b-Actin   |
| 112 | Hs.520640NM_001101 | ACTB   | Actin, beta                                | b-Actin   |

**ANNEXE 2: RECETTES DES SOLUTIONS UTILISÉES.**

| <b>Tampon de lyse hypotonique</b> | <i>Ingredients</i>  | <i>Quantité</i> | <i>Concentration</i> |
|-----------------------------------|---|-----------------|----------------------|
| 10ml                              | HEPES pH 7.5 à 1M   | 100µL           | 10mM                 |
|                                   | KCl à 4M  | 25µL            | 10mM                 |
|                                   | MgCl <sub>2</sub> à 1M  | 30µL            | 3mM                  |
|                                   | NP-40 à 10%   | 50µL            | 0.05%                |
|                                   | EDTA à 0.5M   | 20µL            | 1mM                  |
|                                   | NaF à 1M  | 100µL           | 10mM                 |
|                                   | B-glycerophosphate à 1M   | 100µL           | 10mM                 |
|                                   | DTT à 1M  | 10µL            | 1mM                  |
|                                   | Sodium orthovanadate à 100mM  | 10µL            | 0.1mM                |
|                                   | PMSF à 50mM   | 50µL            | 0.5mM                |
| <i>Commentaires</i>               | Bien dissoudre dans de l'eau et garder à 4°C pendant 3 mois au maximum. |                 |                      |

| <b>Tampon de lyse hypertonique</b> | <i>Ingredients</i> | <i>Quantité</i> | <i>Concentration</i> |
|------------------------------------|--------------------|-----------------|----------------------|
| 10ml                               | HEPES pH 7.5 à 1M  | 500µL           | 50mM                 |

|                     |   |             |       |
|---------------------|---|-------------|-------|
|                     | KCl à 4M  | 625 $\mu$ L | 250mM |
|                     | NP-40 à 10%   | 100 $\mu$ L | 0.1%  |
|                     | EDTA à 0.5M   | 2 $\mu$ L   | 0.1mM |
|                     | NaF à 1M  | 100 $\mu$ L | 10mM  |
|                     | B-glycerophosphate<br>à 1M  | 100 $\mu$ L | 10mM  |
|                     | DTT à 1M  | 10 $\mu$ L  | 1mM   |
|                     | Sodium orthovanadate<br>à 100mM   | 10 $\mu$ L  | 0.1mM |
|                     | PMSF à 50mM   | 50 $\mu$ L  | 0.5mM |
|                     | Glycérol à 100%   | 500 $\mu$ L | 5%    |
| <i>Commentaires</i> | Bien dissoudre dans de l'eau et garder à 4°C pendant 3 mois au maximum. |             |       |