

Université de Montréal

Développement d'un système pour l'étude des récepteurs CD4, CCR5 et CXCR4
dans l'entrée du VIH et analyse d'une délétion du CCR5 du
macaque *M. nemestrina*

par

Balthazar Lauzon

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

juin 1998

© Balthazar Lauzon, 1998



3.445.1112

QH
506
U54
1999
V.021



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Développement d'un système pour l'étude des récepteurs CD4, CCR5 et CXCR4
dans l'entrée du VIH et analyse d'une délétion du CCR5 du
macaque *M. nemestrina*

présenté par:

Balthazar Lauzon

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Michel Tremblay
Dr. Eric Cohen
Dr. Rafick-P. Sékaly

Président-rapporteur
Membre du jury
Directeur de recherche

Mémoire accepté le : 99-10-21

Sommaire

Le virus d'immunodéficience humain peut infecter des cellules qui expriment le récepteur CD4 et un corécepteur de la classe des récepteurs de chimiokines. Les deux principaux corécepteurs pour différentes souches virales sont CCR5, un récepteur pour trois chimiokines α , RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β , et CXCR4, dont le seul ligand connu est SDF-1. Selon la classification actuelle, les différentes souches virales sont classées dans un des trois groupes X4, R5 ou X4R5 d'après le (ou les) corécepteur qui rend possible l'entrée dans la cellule. Les travaux qui font l'objet de ce mémoire avaient pour objectif de tenter de caractériser certains aspects du processus qui permet au VIH de passer la membrane cytoplasmique et d'initier l'infection. Une meilleure compréhension de cette étape du cycle de réplication peut un jour mener à l'identification ou l'élaboration de nouvelles approches thérapeutiques.

D'abord sont décrites les tentatives de production d'anticorps polyclonaux contre le CCR5 et le CXCR4. Des lapins ont été immunisés avec des protéines de fusion comprenant une région extracellulaire d'une de ces deux protéines. Les antisérums obtenus permettaient de détecter, par immunobuvardage, ces mêmes protéines recombinantes, mais aucune activité n'a pu être observée, par immunobuvardage ou en cytométrie en flux, avec des cellules transfectées et exprimant le récepteur correspondant. Un test de fusion servant à mesurer l'efficacité de l'entrée du virus dans différentes conditions, a été mis au point par la suite. Pour cela, des lignées cellulaires exprimant le CCR5 ou le CXCR4 ont été produites par transfections stables. De plus, une délétion apparente dans le gène du CCR5 d'un macaque, détectée lors de l'amplification de la séquence codante de ce gène, a fait l'objet d'une étude indépendante. La séquence modifiée a été clonée et séquencée, mais il n'a pas été possible de confirmer que cette forme du CCR5 était présente dans l'ADN génomique de cet individu ou que celui-ci était réellement hétérozygote pour une mutation encore inconnue. Ces travaux pourraient mener à certaines études plus approfondies sur la fonction des corécepteurs dans l'infection par le VIH.

Table des matières

Page d'identification du jury.....	ii
Sommaire.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xii

Introduction.....	1
1. Le virus d'immunodéficience humain.....	1
1.1 Généralités.....	1
1.2 Cycle de réplication.....	1
1.3 Phase d'entrée du virus.....	2
2. Protéines virales.....	3
2.1 Protéine de l'enveloppe du VIH.....	4
2.2 Autres protéines présentes sur le virion.....	7
3. Protéines cellulaires.....	7
3.1 Récepteur CD4.....	7
3.1.1 Structure.....	8
3.1.2 Éléments de fonction du CD4 et de son rôle dans la réponse immunitaire.....	12
3.1.3 Effets du VIH sur l'expression et la fonction du récepteur CD4.....	14

3.2 Corécepteurs: récepteurs de chimiokines.....	16
3.2.1 Classification et généralités.....	16
3.2.2 Les récepteurs CCR5 et CXCR4.....	19
3.2.2.1 Structure générale.....	20
3.2.2.2 Expression des récepteurs.....	22
3.2.2.3 Rôle et signalisation lors de l'activation.....	29
3.2.3 Récepteurs CCR5 et CXCR4 dans l'infection par le VIH.....	32
3.2.3.1 Différents récepteurs et souches virales les utilisant.....	32
3.2.3.2 Structure et fonction de la protéine de l'enveloppe avec le récepteur: résidus ou régions impliquées.....	34
3.2.3.3 Polymorphisme allélique des gènes de récepteurs de chimiokines et ses conséquences sur l'infection par le VIH.....	37
3.2.3.4 Effets de la gp120 impliquant les récepteurs de chimiokines en absence d'infection.....	39
 4. Problématique et hypothèses.....	 41
 Matériel et méthodes.....	 44
 Résultats.....	 51
1. Étude du CD4 et des récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4 lors de l'infection par le VIH.....	51

1.1 Production d'antisérums contre les récepteurs CCR5 et CXCR4.....	51
1.2 Production de lignées exprimant les récepteurs CXCR4 et CCR5 humains.....	56
1.3 Test de fusion cellulaire.....	61
2. Analyse d'une délétion du récepteur CCR5 d'un macaque.	67
Discussion	73
Bibliographie	80

Liste des Tableaux

Tableau I.	Récepteurs de chimiokines humains connus et leurs ligands.....	17
Tableau II.	Différents récepteurs de chimiokines utilisés par les virus VIH et SIV.....	18

Liste des Figures

Figure 1.	Schéma d'un modèle possible de l'étape d'entrée du virus dans la cellule cible.....	3
Figure 2.	Structure de la protéine Env du VIH-1.....	4
Figure 3.	Structure du récepteur CD4.....	9
Figure 4.	Schéma de la structure primaire des récepteurs CCR5 et CXCR4.....	21
Figure 5.	Production de protéines de fusion de la GST avec les régions amino-terminales de CCR5 ou de CXCR4.....	53
Figure 6.	Transfert et analyse par immunobuvardage avec les antisérums purifiés sur colonne d'affinité.....	55
Figure 7.	Analyse en cytofluorométrie sur les cellules Jurkat et 293T avec l'anticorps polyclonal F2.....	57
Figure 8.	Schéma des récepteurs CXCR4, CCR5 et CD4 modifiés, clonés dans les vecteurs d'expression de type Sr α	59
Figure 9.	Cellules 293T transfectées et exprimant de façon stable le CCR5 modifié.....	62
Figure 10.	Cellules 293T transfectées et exprimant de façon stable le CXCR4 modifié.....	63
Figure 11.	Transfections transitoires des cellules 293T et expression du CD4 après 24 heures d'incubation.....	65
Figure 12.	Fusion entre les cellules 293T exprimant le CXCR4 et le CD4 et des cellules HL2/3 exprimant gp160 de HxB2/3.....	66
Figure 13.	Fusion entre les cellules 293T exprimant le CXCR4 et le CD4 et des cellules HL2/3 exprimant gp160 de HxB2/3, en fonction du temps de co-incubation.....	68
Figure 14.	Réactions de PCR à partir des échantillons d'ADNc de macaques "pigtail".....	70

Figure 15.	Comparaison entre la délétion $\Delta 32$ du CCR5 humain et la délétion du CCR5 retrouvée chez un macaque “pigtail”.....	70
Figure 16.	Amplification par PCR du CCR5 de macaque “pigtail” à partir des échantillons d’ADN génomique.....	71

Liste des Abréviations

CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	cytomégalovirus
Da	dalton
ECL	boucle extracellulaire
ELISA	"enzyme-linked immunosorbent assay"
FACS	"Fluorescence activated cell sorter"
FCS	sérum fœtal de veau
gp	glycoprotéine
GPCR	récepteur couplé aux protéines G
GST	glutathione S-transférase
Ig	immunoglobulines
IgSF	superfamille des immunoglobulines
Il	interleukine
INF	interferon
kb	kilobase
LPS	lypopolysaccharide
LTR	"long terminal repeat"
MoMLV	virus de la leucémie murin de Moloney
NK	cellule tueuse
ORF	"open reading frame"
pb	paire de base
PBMC	cellule mononucléaire du sang périphérique
PBS	"phosphate buffered saline"
PCR	"polymerase chain reaction"
PHA	phytohemagglutinine
PMA	myristate acétate de phorbol

RcT	récepteur des cellules T
RE	réticulum endoplasmique
RT-PCR	"reverse-transcription polymerase chain reaction"
SDS	dodécyle sulfate de sodium
SHIV	virus de l'immunodéficience simien-humain
SIDA	syndrome de l'immunodéficience humaine
SIV	virus de l'immunodéficience simien
SNC	système nerveux central
UTR	région non-traduite
VIH	virus de l'immunodéficience humain

Remerciements

Je voudrais remercier les personnes qui m'ont aidé et appuyé au cours de ce travail de maîtrise. Premièrement mon directeur de recherches, Dr. Rafick Sékaly, qui m'a donné la chance de faire ce premier apprentissage en recherche.

Il me faut aussi mentionner Abdelkader Yachou, qui m'a guidé dans l'organisation du projet.

Je crois qu'une partie importante du travail scientifique consiste à surmonter divers obstacles et je voudrais donc mentionner ceux qui m'ont aidé dans la recherche de solutions ou d'approches différentes, dont Francois Denis, Helen McGrath, Pascal Lavoie, et bien d'autres personnes du laboratoire qui ont apporté conseils au cours de cette période. Je voudrais aussi remercier Luchino Cohen, qui a relu et critiqué une partie de ce mémoire.

Finalement je voudrais remercier mes parents pour leurs encouragements au cours de ce travail.

Introduction

1. Virus d'immunodéficience humain

1.1 Généralités

Le virus d'immunodéficience humaine (VIH) est classé dans le sous-groupe lentivirinae des rétrovirus, qui comprend VIH-1 et VIH-2 ainsi que des virus d'autres espèces comme le virus simien (SIV). Il possède donc un génome contenu sur une molécule d'ARN(+) et son cycle de réplication comprend une étape d'intégration du génome viral (sous forme d'ADN double brin) dans celui de son hôte cellulaire¹. Ces deux agents sont responsables du SIDA, qui apparaît, dans la majorité des cas, après une période asymptomatique de huit à dix ans suivant l'infection par le VIH et qui est défini par une charge virale sanguine élevée et un taux de lymphocytes CD4+ bas. L'infection est donc de type chronique et la période asymptomatique est caractérisée par un haut niveau de réplication virale dans divers compartiments de l'organisme et de renouvellement des cellules T CD4+ ; des cellules infectées de façon latente sont aussi présentes. Ici seront traités quelques aspects généraux de la biologie du VIH avant d'entrer dans les détails des protéines cellulaires et virales qui lui permet d'infecter ses cellules cibles, dont les principales sont les lymphocytes T CD4+ et les cellules de la lignée macrophages/monocytes.

1.2 Cycle de réplication

Le VIH, comme les autres rétrovirus, possède une enveloppe qui comporte le produit du gène *env*. Elle entoure la capsidie dans la structure du virion où se trouve le génome viral, présent en deux copies d'ARN, et d'autres protéines virales. Le cycle de réplication du VIH peut être divisé en une dizaine d'étapes¹. Il débute par la liaison du virus à la cellule cible, qui précède son entrée dans le cytoplasme. Les prochaines étapes

servent à modifier le génome pour permettre son intégration et comprennent le transport dans le noyau, la transcription inverse en ADN double brin et l'intégration dans l'ADN cellulaire. Les étapes suivantes mènent à la production de nouvelles particules : il y a transcription du génome viral, traitement des ARN génomiques ou messagers, synthèse des protéines virales, assemblage et bourgeonnement, suivi d'une étape de modification impliquant la protéase virale (PR) ^{1; 2}.

1.3 Phase d'entrée du virus

Un modèle des différentes étapes menant à la fusion des membranes virales et cellulaires est schématisé à la Figure 1. ³. Le mécanisme d'entrée débute avec la liaison au premier récepteur, le CD4, et se termine avec l'entrée de la partie centrale du virion dans le cytoplasme. Ce modèle tient compte d'observations expérimentales, comme l'inhibition par les peptides C-terminaux, et de la stabilité relative des différents intermédiaires. Tel qu'illustré, les différentes étapes sont associées avec des changements conformationnels de la protéine de l'enveloppe: on croit que la liaison successive à chacun des deux récepteurs induit des changements conformationnels de la sous-unité gp120, qui doivent précéder l'exposition de la partie fusogène de gp41 et son insertion dans la membrane. Contrairement à ces premières étapes, celle où se forme la structure en boucle de gp41 est plus lente, mais donne un intermédiaire très stable une fois formé. Les étapes et intermédiaires subséquents ne sont que très peu connus. On croit généralement que le mécanisme est le même, qu'il s'agisse de la fusion avec l'enveloppe virale ou avec la membrane cytoplasmique d'une cellule infectée de façon productive, malgré que certaines différences, comme la présence de certaines protéines cellulaires absentes du virion ou la densité des protéines Env, pourraient en modifier l'efficacité.

Dans les prochaines sections il sera question des principales protéines cellulaires et virales impliquées dans cette étape du cycle viral. Des aspects ayant des implications évidentes pour l'infection par le VIH sont traités, comme la structure des récepteurs et leur expression.

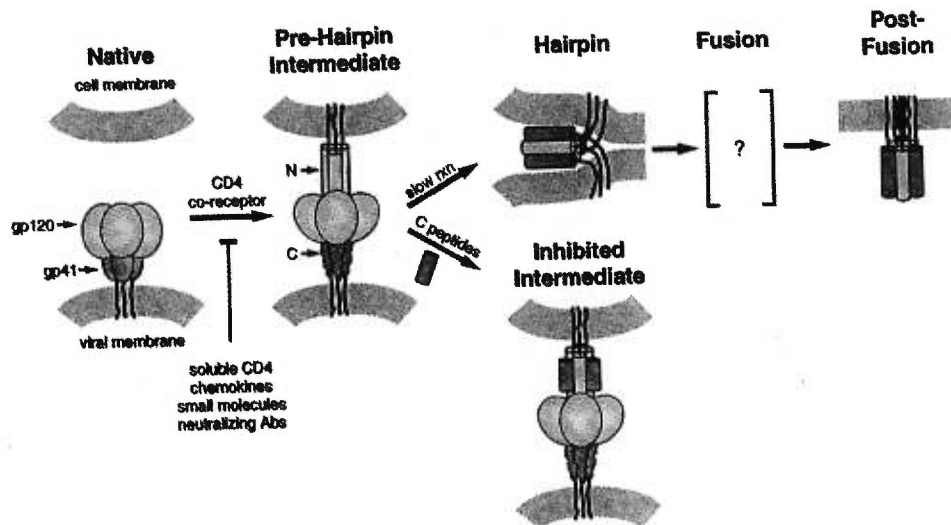


Figure 1. Schéma d'un modèle de l'étape d'entrée du virus dans la cellule. Détails dans le texte. Tiré de Chan, D. et Kim, P., 1998.

2. Déterminants viraux

Le génome du virus d'immunodéficience humain encode quinze protéines (certaines étant transcrites et traduites ensembles) dont plusieurs sont encapsidées au moment de la formation du virion. L'enveloppe comporte les deux sous-unités de la protéine de l'enveloppe, gp120 et gp41, ainsi que des protéines cellulaires qui ne sont pas exclues lors du bourgeonnement. Ces différentes molécules peuvent influencer l'étape d'entrée du cycle infectieux, bien que la fusion elle-même doit dépendre des protéines présentes sur les deux membranes. Il sera question ici premièrement de la protéine de l'enveloppe gp120/gp41, qui est étudiée en détail, et ensuite de quelques protéines

cellulaires présentes sur le virion qui ont démontré que gp160 n'est pas exclusivement impliquée dans ce processus et laissent supposer qu'il existe des mécanismes viraux de sélection de facteurs pouvant se retrouver sur les particules en formation.

2.1 Protéine Env du VIH

Le gène de la protéine membranaire du VIH encode une protéine d'environ 800 acides aminés clivée en deux sous-unités restant associées, SU et TM (de surface et transmembranaire), qui ont une masse relative d'après leur migration sur gel de 120 et 41, respectivement. Elle est traduite et insérée dans le RE rugueux où elle subit aussi un début de glycosylation sur résidus Asn⁴. Sa structure primaire est schématisée à la Figure 2., où sont indiquées les différentes régions de la gp120 et de la gp41. D'après l'analyse de protéines de surface d'isolats variés, des régions se distinguent où se concentrent les variations de séquences en acides aminés ; elles sont désignées V1 à V5 et sont séparées par des régions mieux conservées, nommées C1 à C5 (Figure 2.). La gp41 est caractérisée par une portion transmembranaire et aussi par une partie N-terminale hydrophobe nommée peptide fusogène. Dans l'appareil de golgi la gp160 est clivée par une protéase cellulaire et

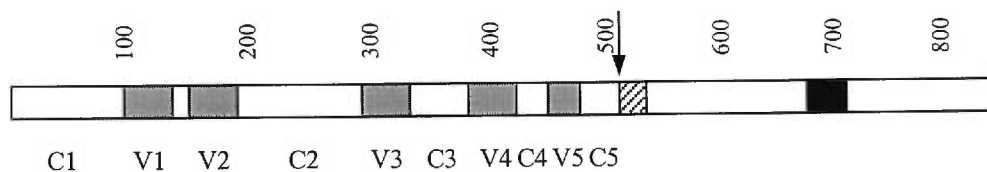


Figure 2. Structure de la protéine Env du VIH-1. Les sections blanches et grises correspondent aux positions des régions conservées et variables, respectivement, alors que les sections hachurée et noire représentent le peptide fusogène et la partie transmembranaire de gp41, respectivement. Les chiffres correspondent aux acides aminés et la flèche indique le site de clivage de gp160. Tiré de Freed, E. et Martin, M., 1995.

une partie des chaînes riches en mannose y sont modifiées. La très forte glycosilation de cette molécule (il y a 29 sites potentiels de glycosilation dans les deux sous-unités) joue un rôle important dans son interaction avec d'autres protéines, comme les anticorps neutralisants.

Les tentatives d'obtenir une structure pour la forme complète de la molécule sont longtemps restées sans succès, principalement à cause du taux élevé de résidus glucidiques et de la flexibilité de certaines régions, deux facteurs qui nuisent à la cristallisation. Les quelques structures déterminées par cristallographie ont été obtenues sur des portions précises d'une des deux sous-unités mais fournissent des indices importants sur les interactions avec les récepteurs et la fusion elle-même. Des détails importants sur la structure de la gp41 ont été obtenus suite à la cristallisation de deux peptides provenant de cette molécule ^{3;5}. Ces deux études décrivent une structure similaire où un trimère d'hélices α parallèles enroulées ("coiled-coil"), correspondant au peptide amino-terminal, forme un cœur autour duquel sont "enroulés" trois peptides carboxy-terminaux dans le sens anti-parallèle. La structure fut premièrement décrite pour un peptide C-terminal de trente-quatre résidus (118 à 151) et un peptide N-terminal de trente-six (36 à 71) ³, alors qu'un autre groupe a utilisé un peptide N-terminal chimérique composé des premiers trente et un résidus du "leucine-zipper" de GCN4 et des résidus 30 à 79 de gp41 co-cristallisé avec un peptide C-terminal correspondant aux acides aminés 113 à 154 de gp41 ⁵. La structure est analogue à la structure de HA2 du virus influenza et à celle de la sous-unité TM du virus MoMLV, d'autre virus à enveloppes. Le mécanisme de fusion proposé pour le VIH se base sur des analogies avec ce qui est connu pour le virus influenza. Il est donc supposé, notamment d'après l'analyse de l'effet inhibiteur de peptides correspondants sur la fusion par le VIH, que ces deux structures, particulièrement stables, correspondent à un intermédiaire "fusogène" qui serait différent de la conformation dans l'état natif de la protéine, maintenue par la présence de la gp120. Une partie de la gp120 a récemment été cristallisé, en complexe avec un fragment Fab d'un anticorps et la portion D1D2 du CD4 ⁶. La structure décrite est celle de la gp120 délétée de 52 résidus N-terminaux et de 19 résidus C-terminaux ainsi que de 67 et 32 résidus des boucles V1/V2 et V3, respectivement (remplacés par le tripeptide Gly-Ala-Gly) et largement déglycosilée. Il s'agit d'une protéine relativement globulaire, composée de 25 chaînes β , 5 hélices α et de 10 boucles définies,

dont la topologie ne semble pas avoir d'analogues dans les structures connues⁶. Selon les données cristallographiques, l'interaction gp120-CD4 implique une vingtaine de résidus de chaque protéine et la boucle C'C" du CD4 peut se nicher au centre d'une dépression dans la structure de la gp120, qui accommode aussi des résidus d'autres boucles du domaine D1.

Des évidences indirectes ont suggéré depuis quelque temps que la protéine de l'enveloppe serait présente sous forme d'oligomères non-covalents à la surface du virion⁷;⁸, alors que l'analyse par cristallographie des peptides dérivés de gp41 suggère que la protéine est assemblée sous forme d'un trimère³;⁵. Il est possible d'autre part que sa conformation sous forme soluble diffère pour cette raison de celle à la surface du virion, comme semble le démontrer les différences entre la liaison d'anticorps à la protéine sous ces deux formes⁹;¹⁰. La réactivité d'anticorps contre des régions de gp120 comme les boucles V2 ou V3 diffère donc entre virions intacts et gp120 solubilisée¹⁰, ce qui implique également une différence de liaison au CD4 (dans le cas d'anticorps reconnaissant le site de liaison de CD4 plus particulièrement)¹¹.

Différentes régions de la protéine de l'enveloppe sont associés à des rôles précis durant l'étape de fusion. Elles peuvent être impliquées, directement ou non, dans les interactions avec les récepteurs ou dans l'initiation de la fusion des deux membranes⁴. Par exemple, le principal déterminant du tropisme pour les macrophages est la boucle V3, ce qui a été déterminé avant l'identification des corécepteurs¹². L'on sait maintenant que cette région est directement impliquée dans l'interaction avec les récepteurs de chimiokines¹³;¹⁴ et que le tropisme est lié à l'exposition d'épitopes précis¹¹. Il ne doit pas s'agir d'un déterminant unique, par contre, car cette différence de phénotype semble dépendre, à un degré plus faible, sur la présence des boucles V1 et V2, qui modifient peut-être la conformation de la boucle V3 induite suite à la liaison du CD4¹⁵;¹⁶. Un certain nombre d'interactions de ce type ont été décrites pour des fonctions spécifiques de la gp120⁴. Il est connu que la liaison au CD4 induit des changements conformationnels dans la gp120, qui précèdent l'interaction avec le co-récepteur: ils mènent à l'exposition de la boucle V3 mais les séquences V1/V2 sont aussi impliquées dans ces changements structuraux¹⁷. Une étude récente, faite avec l'aide des données cristallographiques sur la structure de gp120, a trouvé

un rôle pour une région conservée adjacente à la boucle V3 lors de la liaison au co-récepteur ¹⁸.

2.2 Autres protéines présentes sur le virion

La protéine Env est le seul produit du génome viral qui se retrouve à la surface cellulaire et dans l'enveloppe du virion nouvellement formé. Par contre, l'incorporation de protéines cellulaires dans l'enveloppe virale durant le bourgeonnement est connue depuis quelques temps ¹⁹. Il est possible que certaines d'entre elles jouent un rôle dans l'entrée du virus (alors que d'autres pourraient agir lors de sa production par la cellule hôte). La première protéine cellulaire retrouvée dans des préparations de virus HIV-1 fut HLA-DR, une allèle du CMH-II ²⁰. Depuis ce temps, un nombre important de facteurs se sont ajoutés à la liste des protéines pouvant être présentes sur le VIH, et comprend maintenant des chaînes du CMH de classe I ou II, les co-récepteurs des cellules T CD4 et CD8, ou des molécules d'adhésion telles que LFA-1 et ICAM-1 ¹⁹. Différents mécanismes sont proposés, dont l'incorporation ou l'exclusion spécifiques par des éléments du cytosquelette, un bourgeonnement à des sites cellulaires exprimant spécifiquement les protéines incluses ou encore l'effet d'une interaction avec Env ou p17^{gag} (MA) ¹⁹. Par exemple, des séquences de p55^{gag} du VIH-1 seraient nécessaires pour l'association de la cyclophiline A, une chaperone pouvant lier la cyclosporine A, aux virions du VIH-1, alors qu'elle est absente de virions de SIVmac ²¹, un exemple d'incorporation spécifique modulée par Gag. La protéine ICAM-1, qui peut lier LFA-1 présente à la surface des cellules T durant la présentation de l'antigène, est associée aux virions du VIH-1 et son absence peut entraîner une baisse de l'efficacité de l'infection ²².

3. Déterminants cellulaires

3.1 Récepteur CD4

Le récepteur CD4 est une protéine exprimée sur une sous-population de lymphocytes T et joue le rôle de corécepteur lors de la liaison du RcT au CMH-II-peptide.

Il interagit avec le CMH de classe II exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigènes et sert également de récepteur pour le VIH.

3.1.1 Structure

Le récepteur CD4 est une protéine transmembranaire de 433 acides aminés dont les 371 en N-terminal forment la partie extracellulaire, les résidus 372 à 395 la portion transmembranaire, et les résidus en C-terminal la partie cytoplasmique (Figure 3.A.) L'alignement des séquences en acides aminés entre différentes espèces montre qu'elles sont relativement peu conservées, avec certaines régions de forte homologie qui sont généralement des résidus dont les chaînes sont dirigées vers l'intérieur des différents domaines. Les résidus 108-118 du CD4 humain, conservés entre 6 espèces différentes, en est un exemple ²³. Les chaînes latérales des résidus conservés sont généralement dirigées vers l'intérieur des domaines formés par le regroupement des feuillets β et font des interactions de type ponts salins (pour les résidus chargés), ponts hydrogènes (pour les résidus chargés ou polaires) ou ponts dissulfures.

La structure du CD4 est uniquement composée de feuillets β disposés en 4 domaines dans la portion extracellulaire (Figure 3.B.). Chaque domaine est formé par le regroupement de deux feuillets β et est analogue aux domaines IgSF (domaines de la superfamilles des immunoglobulines). La structure du CD4 a en partie été développée grâce aux analogies avec d'autres protéines de cette famille telles que les domaines V de la protéine Rei et Fab New ^{24; 25}. Les 4 domaines IgSF, initialement déterminés par l'analyse de la séquence en acides aminés, ont été confirmés par les études structurales qui ont suivi. La partie extracellulaire est composée des 4 domaines D1 à D4 où D1 est en N-terminal. Leur degré d'homologie avec d'autres domaines IgSF présents sur d'autres protéines est marqué pour D1 mais plus faible pour les trois autres: le domaine D2 possède un pont dissulfure intra-feuillet- β au lieu du plus commun pont dissulfure entre les deux feuillets du domaine, alors que le domaine D3 n'en possède aucun ²³. Les premières études par cristallographie ont analysé la structure des domaines D1 et D2 du CD4 humain ²⁴⁻²⁶ à partir de l'expression d'une forme du CD4 possédant seulement les résidus 1 à 182. Ont suivies la cristallisation d'un peptide correspondant aux domaines D3 et D4 du CD4 de rat ^{27; 28}. Ces études ont par

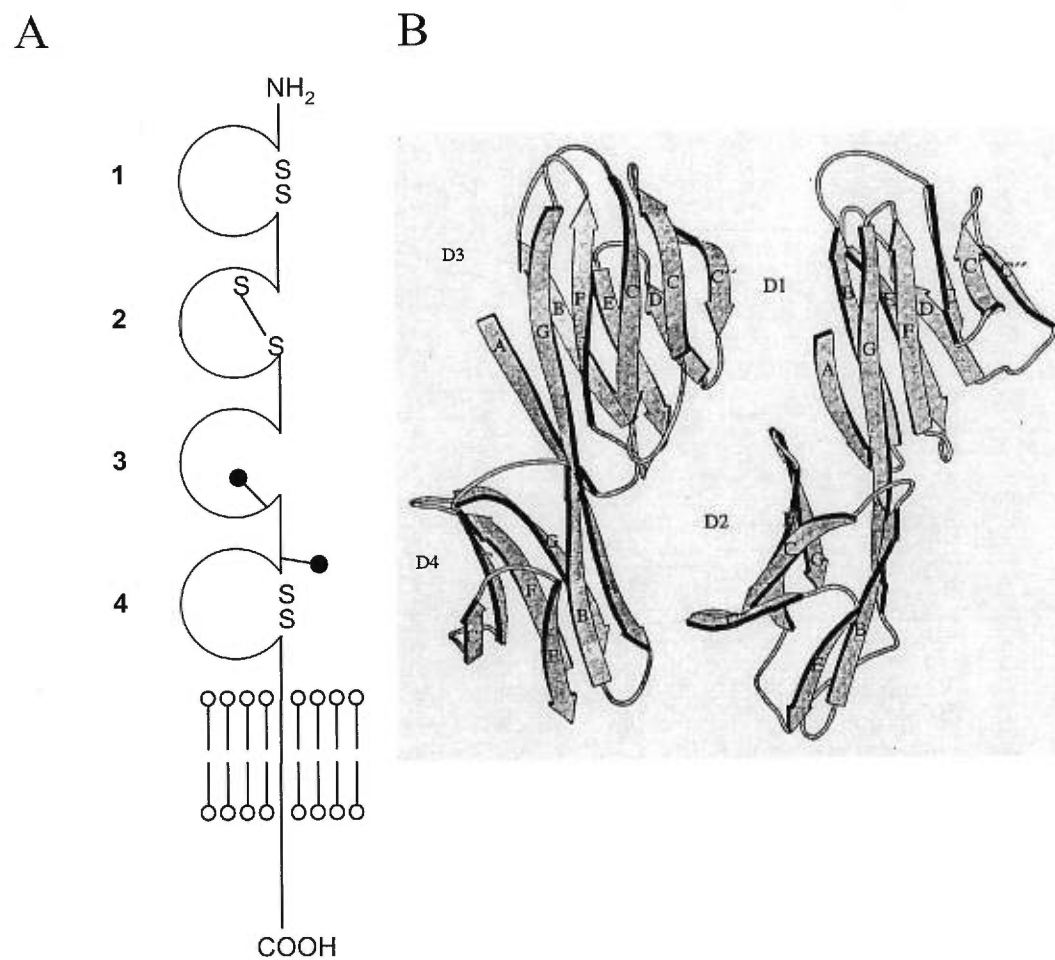


Figure 3. Structure du récepteur CD4. A. Organisation des domaines D1 à D4. Les ponts dissulfures et les sites de glycosylation sont indiqués. Tirée de Brady, R. et Barclay A., 1996. B. Structure tridimensionnelle des domaines extracellulaires avec désignation des différents brins des feuillets β . Tiré de Brady *et al.*, 1993.

la suite permis de déterminer la structure entière de la portion extracellulaire (résidus 1 à 371), les cristaux de cette protéine ne donnant qu'une faible résolution de la structure (allant de 8,0 à 4,0 Å)²⁹.

Le domaine D1 est analogue aux domaines V des immunoglobulines. Il est formé de deux feuillets β composés des brins B, D, E et A, C, C', C'', F, G, respectivement (Figure 3.). Les principales différences avec les domaines des protéines IgSF sont retrouvées au niveau du brin A et des brins qui forment les régions CDR analogues aux régions CDR des immunoglobulines: les boucles FG (principale boucle de la région CDR3) et CC' sont raccourcies alors que la boucle C'C'', qui correspond à la région CDR2, est allongée dans la structure du CD4²⁵. La région CDR2 du CD4 est au centre du site de liaison à gp120 du VIH; cette boucle est maintenue dans une conformation moins compacte que dans les domaines V des Ig par l'interaction de trois chaînes hydrophobes importantes (Leu 44, Trp 62 et Phe 67) dans l'intérieur de la structure²⁴.

Le domaine D2 du CD4 a également la structure générale des domaines Ig mais avec une ressemblance moins marquée que D1. D2 est même quelque peu caractéristique des domaines de régions constantes des Ig. Les différences importantes sont premièrement la taille (les chaînes β de D2 sont relativement plus courtes car le domaine est composé d'environ 75 résidus au lieu de 100 pour les domaines des Ig) et également la présence d'un pont dissulfure entre deux chaînes β du même feuillet: au lieu du pont dissulfure conventionnel des Ig, entre un résidu du brin β et un autre du brin F la première cystéine de D2 est localisée sur le brin C. Malgré ceci et la nature de plusieurs chaînes latérales situées entre les deux feuillets, la structure de la cavité hydrophobe de ce domaine ainsi que la position des différents brins des feuillets β sont conservés.

Les études cristallographiques ont aussi démontré que les deux domaines n'étaient pas reliés par une région flexible; le brin G de D1 est continu avec A de D2 et les deux domaines sont associés. Il y a une interface d'environ 900 Å² entre les domaines où les chaînes latérales hydrophobes de plusieurs résidus resteraient à l'abri du solvant²⁵. Ceci explique sans doute quelques propriétés du CD4 car, à la différence des séquences reliant les domaines D1 à D2 et D3 à D4, la portion reliant D2 à D3 n'est pas fixe; ceci semble être important pour l'infection par le VIH car cette région permettrait le changement

conformationnel qui se produit suivant la liaison de la protéine de l'enveloppe au CD4. Ceci a été étudié par mutagenèse et avec des anticorps contre le CD4.

La structure des domaines D3 et D4 a été déterminé pour le CD4 de rat ^{27; 28} qui, contrairement au CD4 humain, n'est pas glycosylé dans cette région. Tout comme D1, D3 possède neuf brins disposés selon le même arrangement. Quelques différences à noter sont l'absence d'un pont dissulfure dans D3 et le repliement du brin C". Le domaine D4 est superposable au domaine D2 du CD4 humain; il est analogue aux domaines de type C (domaines des régions constantes des anticorps) des protéines IgSF. Comme pour D2, le brin D de D4 est remplacé par un brin C' qui est situé dans le même feuillet que C. Il existe aussi des différences au niveau des positions de certaines boucles. Les deux domaines de cette structure semblent être associés de façon équivalente aux deux domaines N-terminaux du CD4, malgré que le brin GA de D3/D4 soit plus court de trois résidus. Il y aurait donc la même rigidité dans l'interface entre les domaines, qui est calculé à environ 900 Å², comme l'interface entre D1 et D2.

La structure de la portion extracellulaire complète à été déterminée par cristallographie par le groupe de Hendrickson ²⁹. Une résolution adéquate a été obtenue avec l'aide des deux structures partielles. Une flexibilité importante caractérise la jonction entre D2 et D3, avec jusqu'à 10 degrés de variabilité dans son orientation; cette flexibilité semble impliquer principalement les résidus Leu 177 et Ala 178, qui ne sont pas des éléments des feuillets β adjacents ²⁹. Cette étude a confirmé que le CD4 a la forme générale d'un cylindre allongé où deux moitiés rigides sont liées par une portion lui donnant une flexibilité limitée ²⁵.

Le CD4 humain est modifié par glycosilation sur deux domaines, D3 et D4. Ceci a été examiné pour le CD4 sous forme soluble : les ajouts seraient principalement des chaînes riches en mannose ou de type hybride ³⁰ et se feraient sur les sites Asn-X-Thr. La présence de chaînes de glucides plus ou moins importantes pourrait jouer un rôle dans l'orientation de la molécule à la surface de la cellule ou dans son interaction avec le complexe du RcT-CMH II. Le CD4 est aussi modifié par palmylation à deux sites dans la

portion intracellulaire, soit les cystéines 394 et 397, qui sont à proximité de la région transmembranaire ³¹.

3.1.2 Éléments de fonction du CD4 et de son rôle dans la réponse immunitaire

La réponse immunitaire des cellules T dépend de plusieurs facteurs dont la liaison du RcT au complexe peptide antigénique-CMH approprié, de la présence de certains corécepteurs ou molécules d'adhésion comme, sur les lymphocytes T, CD28, CTLA4 et LFA-1, et sur les cellules présentatrices, les ligands CD80/CD86 ou la glycoprotéine ICAM-1. Les molécules CD4 et CD8 remplissent un rôle de corécepteur sur les cellules T lors de la présentation en se liant à des régions conservées du CMH de classe II ou I, respectivement, et permettent également la signalisation qui mène à l'activation des cellules T.

Plusieurs études ont analysé la liaison du CD4 au CMH II dans le contexte de l'interaction des lymphocytes T avec les cellules présentatrices et des études de structure-fonction ont permis d'identifier les déterminants du CD4 et du CMH qui participent à cette interaction ³². Parmi les détails fonctionnels élucidés, certaines études *in vitro* confirment pratiquement un modèle de corécepteur du CD4, contrairement à un rôle analogue aux molécules d'adhésion (qui n'implique pas une interaction du CD4 avec un CMH en complexe avec le RcT). Ce modèle diffère par l'interaction du CD4 avec le RcT lors de la liaison au CMH et sa participation aux événements de signalisation subséquents. Plusieurs groupes ont évalué l'effet de différentes mutations d'une ou de l'autre molécule sur l'activation des cellules T, en mesurant des paramètres d'activation comme la production d'Il-2. Les résidus des domaines D1 et D2 du CD4 qui semblent impliqués lors du processus se retrouvent sur deux côtés opposés de la molécule. Dans le domaine D1, par exemple, certaines chaînes β comme A, B, D, ou E ainsi que les boucles A/B, B/C, D/E et F/G seraient impliquées, de même que des régions non adjacentes comme les brins C ou C'' ou les boucles C'/C'', C''/D ou C/C'. Ceci a été observé pour des régions du domaine D2 également. Dans le cas des deux autres domaines extracellulaires, leur position empêcherait une interaction avec des régions conservées du CMH II mais il est possible qu'ils soient responsables de contacts du CD4 avec certaines chaînes du RcT ou avec

d'autres CD4 concentrés au site d'interaction des deux cellules durant la présentation de l'antigène. Un mécanisme (dit séquentiel et coopératif) pour le rôle du CD4 ne l'implique pas dans la spécificité de la réponse, cette fonction étant remplie uniquement par le RcT, mais augmenterait l'affinité et/ou l'avidité en consolidant les interactions suffisamment fortes du RcT pour le complexe CMH-peptide.

La contribution du CD4 à l'activation des cellules T se produit par l'intermédiaire de la protéine de 55 kDa Lck. Il a été démontré que son association est requise pour le fonctionnement du CD4 comme corécepteur et qu'elle permet une meilleure activation de la protéine Ras suite à l'engagement du RcT³³. La voie de signalisation impliquant ras, une protéine activée par la liaison de GTP, peut être activée par phosphorylation de certains substrats sur tyrosines. Il est connu que la phosphorylation des chaînes ζ du CD3 mène au recrutement de Shc, qui peut interagir avec Grb2 (une protéine qui possède un domaine SH2 et deux domaines SH3) qui à son tour peut lier mSOS par ses domaines SH3. La présence de Lck semble augmenter le niveau de phosphorylation de Shc, soit par une modification directe par Lck ou non. D'autres éléments de signalisation impliquent le CD4 et Lck : certaines phosphatases et des kinases de lipides comme PI-3-kinase seraient requises pour la signalisation initiée par le complexe de ces deux protéines. Des résultats contradictoires à ceux-ci ont démontré que, lors de l'interaction du RcT avec l'antigène présenté, en présence du CD4 comme corécepteur, une protéine Lck délétée de son domaine kinase peut permettre la production d'Il-2 au même niveau que la protéine non-mutée³⁴.

Plusieurs recherches tentent de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'expression du CD4 chez les lymphocytes³⁵ ainsi qu'au cours du développement thymique, qui mène à la production de cellules CD4+ ou CD8+ à partir de cellules exprimant ces deux molécules. Il est à noter que, chez l'humain ou le rat, contrairement à la souris, le CD4 est exprimé dans certaines populations cellulaires non-lymphoïdes comme les monocytes, macrophages, cellules dendritiques, granulocytes et éosinophiles. Parmi les éléments régulateurs de la transcription du CD4 on peut noter un "enhancer" en 5' du site d'initiation, qui comprend quatre sites de liaison de facteurs de transcription, ainsi qu'un "silencer" en 3' du premier exon (compris dans le premier intron) qui jouerait un rôle

important dans la régulation négative de la transcription lors du développement thymique des lymphocytes T.

Un autre niveau important pour le contrôle de l'expression du CD4 se fait par l'endocytose et l'exocytose de la molécule³¹. L'activation du RcT ou le traitement avec des anticorps contre CD4 mène à une augmentation de l'internalisation du CD4 qui est acheminé vers les endosomes. La majorité du CD4 entrant dans cette voie serait recyclé à la surface mais il existe aussi un ciblage de cette protéine vers les compartiments plus tardifs et les lysosomes, où elle est dégradée. Le processus est contrôlé par la formation de puits recouverts de clathrine. Il a été observé que l'association du CD4 à Lck (4 cystéines sont requises) inhibe son internalisation, soit en masquant un déterminant dans le CD4 ou, par exemple, en permettant une association à d'autres composants cellulaires non internalisés. La portion intracellulaire du CD4 module son internalisation. Les plus importants résidus conservés sont trois serines (S408, S415 et S431) et un motif dileucine (L413, L414). Les serines sont probablement des substrats pour PKC et un effet additif a été démontré après la phosphorylation de S408 et S415. L'internalisation est donc probablement contrôlée par la phosphorylation de ces résidus.

3.1.3 Effets du VIH sur l'expression et la fonction du récepteur CD4

La capacité du VIH à moduler l'expression du CD4 est un facteur important de la pathogenèse. Les mécanismes comprennent la rétention du CD4 nouvellement synthétisé dans le réticulum endoplasmique et l'augmentation de l'internalisation du CD4 exprimé à la surface de la cellule. La première de ces deux caractéristiques est sous le contrôle de la protéine de l'enveloppe avant le clivage en ses deux sous-unités, gp160, et implique également la protéine accessoire Vpu, tandis que la deuxième fonction est remplie par Nef, une protéine virale exprimée tôt durant l'infection. Une baisse de l'expression du CD4 *in vivo* peut servir, par exemple, à éviter l'infection d'une même cellule par plus d'une souche (superinfection), à empêcher la liaison du RcT à un complexe peptide-CMH II et l'activation de la cellule ou à modifier la signalisation par Lck. Ces mécanismes sont, d'autre part, spécifiques car ils n'ont pas d'effet sur l'expression de la protéine CD8 ou des chaînes du complexe CD3, par exemple.

Bien que le mécanisme exact de la dérégulation de l'expression du CD4 par Nef n'est pas connu, on sait que celui-ci n'implique pas la phosphorylation sur des résidus serines, par PKC par exemple, qui est responsable de la désensibilisation des cellules T et qui mène à l'endocytose accrue du CD4 suivant l'activation³⁶. De plus, contrairement aux trois serines dont la phosphorylation est dispensable, le motif dileucine dans la région cytoplasmique du récepteur est requis³⁷. Le rôle exact de ces deux résidus reste incertain, mais il a été démontré qu'un peptide synthétique de la portion intracellulaire pouvait lier Nef avec une faible affinité et que les deux leucines sont requises pour cette interaction³⁸. Suivant l'internalisation par Nef, le CD4 peut être dégradé rapidement par le ciblage vers les lysosomes³⁹.

Le mécanisme contrôlé par gp160 vient s'ajouter par la suite, avec l'expression de cette protéine. Il y a rétention du CD4 dans le réticulum endoplasmique par l'interaction directe des deux protéines⁴⁰ et son efficacité dépend de l'affinité de la gp160 de la souche donnée. Il y a formation d'un complexe de ces deux protéines avec Lck, qui est retenue en même temps à ce niveau⁴¹. L'accumulation des deux protéines dans le RE est toxique, alors que la gp160 seule, sans l'expression du CD4, ne l'est pas. Il a aussi été démontré que Vpu peut induire la dégradation du CD4 lié de cette façon à la gp160, et que les résidus 418-425, dans la portion intracellulaire du récepteur, sont requis pour son élimination; ceci a pour effet le relâchement de la protéine de l'enveloppe et doit probablement précéder son expression à un niveau suffisant à la surface cellulaire⁴².

L'interaction Env-CD4 n'est pas seulement retrouvée durant l'entrée du virus mais peut aussi se produire entre gp120 soluble et le CD4 des cellules non-infectées, ce qui peut jouer un rôle durant l'infection. Certains mécanismes sont proposés, mais leur l'importance relative in-vivo n'est pas très bien connue⁴³. Le relâchement de gp120 par le virus a été observé premièrement avec les virus adaptés aux lignées cellulaires et correspond à la dissociation de la sous-unité gp120, lié à gp41 de façon non-covalente. Il peut y avoir induction de l'apoptose des cellules CD4+, par exemple par l'interaction avec gp120 suivi de l'induction de l'oligomérisation du récepteur par la liaison d'anticorps contre la protéine virale, ou encore inhibition du fonctionnement des cellules T. Ce dernier cas peut englober la délétion de cellules mémoires spécifiques à cet antigène, l'antagonisme de l'interaction CD4-CMH-II ou des effets reliés à la signalisation par la ligation du CD4⁴³. D'autres

mécanismes plus complexes ont aussi été proposés pour la lyse de cellules non-infectées, soit par des cellules effectrices CD16+ et par l'intermédiaire de la liaison d'un anticorps contre gp120, ou par exemple par des cellules CD4+ cytolytiques avec une spécificité pour gp120⁴³. Des effets cytotoxiques de gp120 par l'intermédiaires des récepteurs de chimiokines ont aussi été analysés, et seront vus plus loin.

3.2 Corécepteurs: récepteurs de chimiokines

3.2.1 Classification et généralités

Les chimiokines sont des polypeptides, généralement de moins de 100 résidus, impliquées dans diverses fonctions reliées au recrutement et à l'activation de différents types de leucocytes lors de réactions inflammatoires. Ceux-ci comprennent par exemple le contrôle de flux de calcium retenu dans des vésicules, le contrôle de la migration de cellules dans les compartiments extravasculaires (chimiotaxie), le remodelage du cytosquelette ou l'activation de lipides impliqués dans la signalisation⁴⁴⁻⁴⁶. Les chimiokines se regroupent en quatre catégories d'après la position des cystéines dans la région N-terminale ; les chimiokines CXC (ou α) possèdent deux cystéines espacées d'un résidu alors que celles du groupe CC (β) ont deux cystéines adjacentes. Les deux autres catégories ne possèdent qu'un seul membre chaque: la chimiokine lymphotactine, qui ne possède qu'une seule cystéine en N-terminal, est classée dans le groupe C et la chimiokine fractalkine est du type CX3C car trois résidus séparent les deux cystéines. Les protéines des deux premiers groupes possèdent également deux autres résidus cystéines conservés dans la région C-terminale. Les récepteurs de ces cytokines sont de types à sept passages transmembranaires et sont couplés pour leur activation aux protéines G trimériques. Il y a actuellement beaucoup plus de ligands connus que de récepteurs, mais ceux-ci peuvent généralement lier plusieurs ligands, quoiqu'avec une affinité variable (Tableau I). De même ces derniers n'ont pas une spécificité très limitée et peuvent souvent activer plus d'un récepteur. Il n'y a pas de chimiokine connue pouvant se lier à des récepteurs de plus d'un des deux groupes principaux (les CXCR et les CCR), à l'exception du récepteur DARC. Il

Récepteur	Ligand
Chimiokines CXC	
CXCR1	IL-8
CXCR2	IL-8, Gro α / β / γ , NAP-2
CXCR3	MIG, IP-10
CXCR4	SDF-1 α / β
CXCR5	BCA-1
Chimiokines CC	
CCR1	MIP-1 α , RANTES, MCP-2, MCP-3, MIP-5
CCR2A/B	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4
CCR3	Éotaxine-1, éotaxine-2, MIP-5, RANTES, MCP-2, MCP-3, MCP-4
CCR4	TARC
CCR5	RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β
CCR6	LARC
CCR7	ELC, SLC
CCR8	I-309, TARC, MIP-1 β
CCR9	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, éotaxine
Chimiokines C	
Aucun identifié	Lymphotactine
Chimiokines CX ₃ C	
CX ₃ CR1	Fractalkine
Autres	
DARC	IL-8, GRO α , RANTES, MCP-1, TARC
TYMSTR (STRL33)	Aucun ligand identifié

Tableau I. Récepteurs de chimiokines humains connus et leurs ligands. Tiré de Ward, S.G. et J. Westwick, 1998.

Récepteur	Expression	Type Viral
CCR2	Monocytes, lymphocytes T	VIH-1
CCR3	Éosinophiles, Cellules microgliales, lymphocytes Th2	VIH-1
CCR5	Monocytes, lymphocytes T	VIH-1, VIH-2, SIV
CCR8	Monocytes, thymocytes	VIH-1, SIV
CXCR4	Lymphocytes, macrophages, SNC	VIH-1, VIH-2
CX ₃ CR1	Lymphocytes, SNC	VIH-1, VIH-2
GPR1	Macrophages	SIV
GPR15	Lymphocytes T, colon	SIV, VIH-2, VIH-1
STRL33	Lymphocytes T, monocytes, placenta	SIV, VIH-2, VIH-1
US28	ORF du CMV	VIH-1, VIH-2
Apj	Leucocytes activés	VIH-1, SIV
BLTR	Leucocytes, thymus, moëlle, rate	VIH-1 (encore incertain)

Tableau II. Différents récepteurs de chimiokines utilisés par les virus VIH et SIV. Adapté de Unutmaz, D. *et al.*, 1998.

y a aussi une homologie variable entre différents récepteurs d'un même type (α ou β), qui se situe généralement entre 40% et 80% pour la séquence en acides aminés.

Les récepteurs de chimiokines, dans leur ensemble, ont une expression constitutive sur différents types cellulaires comprenant, mais sans y être limité, les cellules du système immunitaire. Leur expression sur les lymphocytes T est inductible ou constitutive, et peut être modulée selon l'état d'activation de la cellule. Par exemple, le récepteur CXCR3 est retrouvé sur les cellules T activées et les ligands IP-10 et MIG peuvent recruter spécialement ce type cellulaire. Le contrôle de l'expression des récepteurs CXCR4 et CCR5 sera vu plus loin mais on peut mentionner que leurs ligands ont un effet sur la migration de populations distinctes de lymphocytes, SDF-1 étant une chimiokine pour les cellules naïves, du phénotype CD45RA+, et RANTES étant sélective pour des cellules T mémoires, CD45RO+. L'expression de récepteurs particuliers est aussi observée sur les différents sous-types de cellules T activées⁴⁵. Par exemple, les cellules de la lignée de différenciation Th1 expriment entre autres les récepteurs CCR5 et CXCR3 alors que les récepteurs CCR3, CCR4 et CCR8 sont présents sur les cellules de la lignée Th2. Le cas du CCR3 est particulier car son ligand, l'éotaxine, recrute les cellules de type Th2 ainsi que les éosinophiles et basophiles : les premières produisent les cytokines Il-4 et Il-5 qui sont des facteurs de croissance pour les deux autres types de cellules. Ce ligand peut donc favoriser la colocalisation de plusieurs types cellulaires, comme peut se produire lors de réactions allergiques des voies respiratoires⁴⁷.

3.2.2 Les récepteurs CCR5 et CXCR4

Depuis la découverte de la nature des co-récepteurs utilisés par le VIH avec le CD4, en 1996, la liste des protéines pouvant remplir ce rôle pour différents isolats viraux s'est allongée pour comprendre une douzaine de récepteurs de chimiokines (Tableau II). Mis à part une exception (SIVrcm, dont l'hôte naturel est le primate "red-capped mangabey" et dont le récepteur est CCR2b, voir discussion) tous les isolats viraux connus utilisent l'un ou l'autre des récepteurs CCR5 ou CXCR4, mais peuvent en utiliser d'autres en plus. De plus, ces deux récepteurs sont les seuls qui sont utilisés à une haute efficacité

d'entrée par des souches de HIV ⁴⁸. Suivent donc certains détails sur la régulation, l'expression et les fonctions physiologiques de ces deux récepteurs.

3.2.2.1 Structure générale

Les récepteurs CXCR4 et CCR5 ont la structure générale des récepteurs à sept passages transmembranaires, ils ont donc une région N-terminale extracellulaire et C-terminale cytoplasmique, ainsi que des boucles reliant chaque région membranaire (Figure 4.). La région extracellulaire, de même que la partie cytoplasmique, est donc composée de quatre éléments, dont la structure tridimensionnelle n'est pas exactement connue. La méthode de liaison de la protéine de l'enveloppe à ces deux récepteurs a été étudiée par mutagenèse et à l'aide de chimères de ces récepteurs et sera traitée plus loin. Ici il est question de la structure primaire de ces deux protéines et de certains détails sur l'organisation des gènes correspondants.

Le récepteur CXCR4 a été cloné en 1994 à partir d'une banque de cDNA de monocytes humains ⁴⁹. Il s'agit d'une protéine de 352 acides aminés contenus dans un seul ORF. Il existe deux sites potentiels de glycosylation, le premier dans la région N-terminale, et un second dans la deuxième boucle extracellulaire. La séquence en acides aminés démontre une certaine homologie avec d'autres récepteurs de chimiokines α : il y a une identité de 34% entre cette séquence et celle des deux récepteurs de l'IL-8, CXCR1 et CXCR2 et une homologie de 93% avec le récepteur du neuropeptide Y bovin (boLCR1). La région codante est localisée sur deux exons séparés par une séquence intronique de 2,1 kb, dont le premier ne code que pour 5 acides aminés et comprend une séquence 5' non traduite (5' UTR) ⁵⁰. Une région de 2,7 kb correspondant au promoteur de ce gène a été analysée: à 30 pb du site d'initiation de la transcription se trouve une boîte TATA et plusieurs séquences en amont de ce site correspondent à des séquences consensus pour différents facteurs de transcription dont certains sont des facteurs impliqués dans le développement lymphocytaire ⁵⁰. Le récepteur CCR5 est une protéine de 352 acides aminés qui présente une homologie partielle avec certains autres récepteurs de chimiokines β : 76% avec CCR2, 58% avec CCR3 et 56% avec CCR1, par exemple ⁵¹. Contrairement au CXCR4, un seul site potentiel de glycosylation est présent et se situe dans la troisième

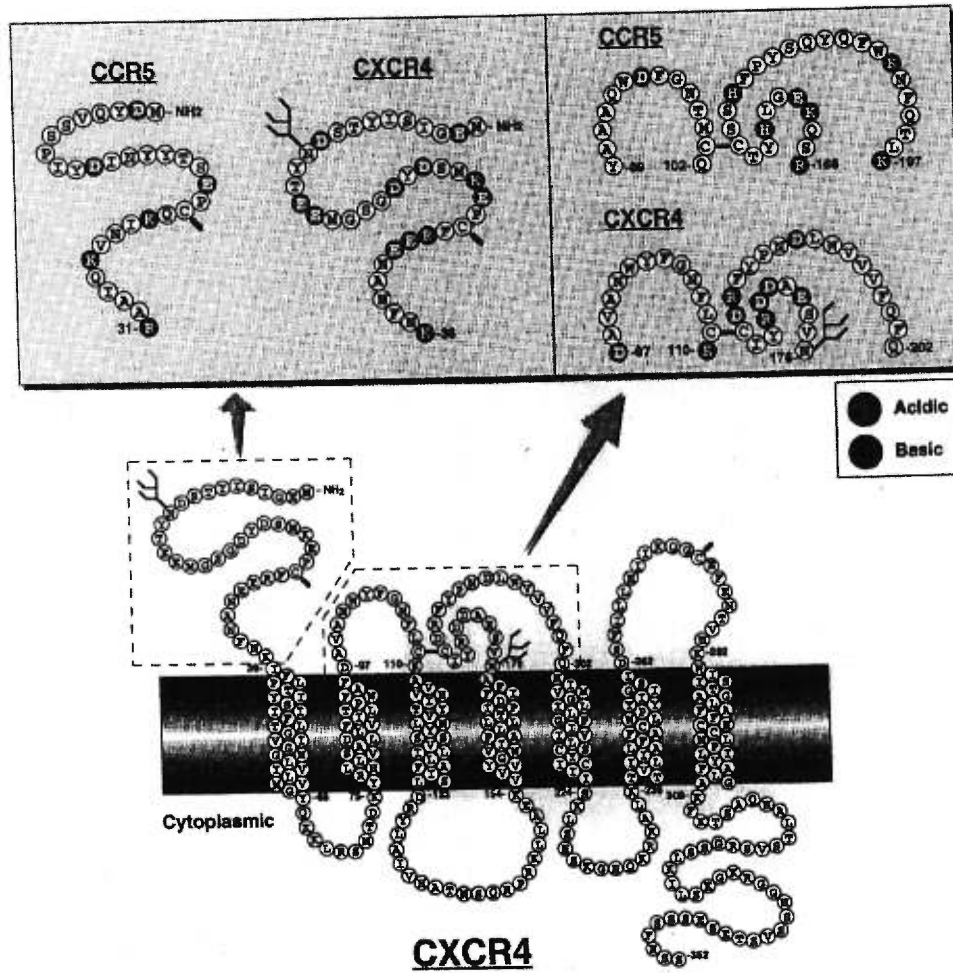


Figure 4. Schéma de la structure primaire des récepteurs CCR5 et CXCR4. Tiré de Berson J. et Doms, R., 1998.

boucle extracellulaire. Les ligands ont également été identifiés à ce moment : MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES. L'analyse du gène du CCR5 a démontré qu'il peut être transcrit sous deux formes qui diffèrent par la présence ou l'absence du deuxième exon, mais que certains transcrits tronqués de ces séquences 5' non-traduites seraient produits ⁵². La région codante est entièrement comprise dans le dernier des quatre exons. Deux introns sont compris dans la région en 5' de la séquence traduite : entre les exons 1 et 2 et entre 3 et 4 (aucun intron ne sépare les exons 2 et 3). Il est à noter que le gène de CCR2 est situé en 5' du gène de CCR5, à une distance de 17,5 kb de la région codante de celui-ci ⁵¹. Des séquences consensus pour certains facteurs de transcription, dont PU.1, Oct-1, AP-1 et de multiples sites de liaison pour les facteurs GATA-1 et Sp-1 sont situés en amont de la région codante ⁵².

Plusieurs études ont analysé le rôle de certains résidus spécifiques ou de certaines séquences à l'aide de chimères ou de mutants de ces récepteurs. Ces études ont surtout servi à délimiter les régions impliquées dans l'infection par le VIH ⁵³. La comparaison des deux récepteurs démontre quelques différences marquantes au niveau des domaines extracellulaires. Premièrement, le CCR5 n'y possède pas de site de glycosylation (Figure 4.). D'autre part la disposition des résidus chargés est différente, notamment dans la deuxième boucle extracellulaire: le CXCR4 possède surtout des résidus acides dans cette région, alors qu'ils sont surtout basiques pour le CCR5 (Figure 4.). Dans la région N-terminale du CXCR4 il y a également plus de résidus acides comparé à cette région du CCR5 ⁵³. Ces différences peuvent jouer un rôle important pour la liaison de ligands et influence probablement la liaison de la protéine de l'enveloppe du virus, ce qui explique peut-être en partie les différences de tropisme entre souches virales.

3.2.2.2 Expression des récepteurs

Le récepteur de SDF-1 est exprimé dans des tissus divers qui ne se limitent pas aux cellules du système immunitaire, contrairement à bien d'autres récepteurs de chimiokines α et β auxquels on n'a associé qu'un rôle dans la régulation de migrations leucocytaires, c'est-à-dire un rôle pro-inflammatoire comme c'est le cas pour l'I1-8 et ses deux récepteurs CXCR1 et CXCR2. SDF-1 semble diriger certaines migrations cellulaires

lors du développement embryonnaire. Des souris possédant un allèle délété à l'état homozygote ("knockout") démontrent des défauts de lymphopoïèse de cellules B et de myélopoïèse (cellules de la moelle); ces travaux l'impliqueraient aussi dans la cardiogenèse tel que dans la formation du septum interventriculaire ⁵⁴. Son expression est constitutive, pour différents tissus, chez l'adulte et ceux-ci comprennent entre autres, chez la souris, le SNC, l'intestin et les reins ⁵⁴. Son expression a été observée sur différentes lignées cellulaires comme HL-60, une lignée d'origine promyélocytaire, U937, une lignée d'origine monocytaire et les Jurkats, de type T lymphoblastoïde ainsi que sur des monocytes, neutrophiles, cellules T ⁴⁹ ou, tel qu'observé chez le macaque rhésus, dans le cerveau, le coeur, le colon et le foie ⁵⁵.

L'expression du récepteur CXCR4 dans le système nerveux a été observée sur plusieurs types cellulaires dont les neurones, les cellules microgliales et les macrophages ⁵⁶⁻⁵⁸. Les cellules de la microglie, qui forment un réservoir majeur pour l'infection du SNC par certaines souches du VIH, dont l'infection peut mener à des troubles neurologiques qui incluent la démence ⁵⁸, expriment le récepteur CXCR4 mais les niveaux de CCR5, qui est le principal cofacteur pour les isolats initialement retrouvés dans cet organe, y sont plus élevés ⁵⁶. Certaines lignées cellulaires neuronales expriment le CXCR4 ^{58; 59}. L'on croit que l'infection du SNC est premièrement causée par l'infiltration de macrophages ou monocytes infectés, vu l'incapacité du virus libre à traverser la barrière hémato-encéphalique, et qu'elle se propage ensuite à d'autres types cellulaires dont la microglie; les dommages subséquents résultent peut-être d'effets indirects sur les neurones ou les astrocytes ⁵⁸. Les neurones n'expriment pas le CD4 et ne sont donc pas infectés eux-mêmes, bien que l'expression du CXCR4 les rendent susceptibles à des effets cytotoxiques causés par gp120 libre. Une étude a démontré l'expression du récepteur par une lignée neuronale différenciée, hNT, mais pas par la lignée Ntera2 dont elle dérive, et l'inhibition, en absence du CD4, de la liaison de SDF-1 au CXCR4 par gp120 IIIB ⁵⁹.

Il a récemment été démontré que les cellules endothéliales expriment le récepteur CXCR4, contrairement aux cellules musculaires lisses des mêmes vaisseaux, et que SDF-1 induit leur migration, ce qui indique un rôle possible de SDF-1 dans l'angiogenèse ^{60; 61}. L'expression du récepteur a été étudiée au niveau de l'ARNm et à la surface cellulaire par cytofluorométrie; certaines cytokines, comme IFN- γ ou TNF- α , seraient aussi impliquées

dans sa régulation^{60;61}. Au niveau fonctionnel, il a même été démontré que l'IFN- γ pouvait inhiber l'effet chimiotactique de SDF-1⁶¹.

Les différents types de leucocytes ont été analysés avec des anticorps contre le CXCR4^{62;63}. Son expression a été observée sur la presque totalité des cellules mononucléaires, près de 75% des monocytes et près de 90% des cellules B⁶². Une autre analyse par cytofluorométrie confirme cette diversité cellulaire et montre l'expression du récepteur sur des lignées de différentes origines⁶³. Des cellules positives étaient aussi présentes parmi les sous types de lymphocytes (T et B) et parmi les monocytes, mais pas chez les neutrophiles. Une faible proportion de cellules NK était aussi faiblement réactive⁶³. Bien que le récepteur principal utilisé par les souches infectant les macrophages soit le CCR5, ces cellules expriment aussi le CXCR4, ce qui a été démontré par RT-PCR ou par marquage avec immunofluorescence^{64;65}. Chez les macrophages, le récepteur CXCR4 ne semble pas être utilisable par les virus T-tropiques, qui sont incapables de les infecter, ce qui suggère l'influence d'une ou de plusieurs autres molécules ou une modification post-traductionnelle chez ce type cellulaire^{64;65}. D'autre part, l'analyse par immunofluorescence de cellules de Langerhans isolées de l'épiderme, avec ou sans perméabilisation, a démontré qu'après 18 heures de culture ce récepteur passait de compartiments intracellulaires à la membrane cytoplasmique⁶⁵. Dans la même étude une faible proportion de cellules dendritiques sanguines (20%) étaient marquées positivement pour le CXCR4. Ces détails sur l'expression de molécules nécessaires à l'infection par le VIH ont des implications importantes sur sa transmission et sur la propagation de l'infection.

Les cellules d'origine hématopoïétique peuvent exprimer différentes molécules au cours de leur différenciation, ce qui peut servir de repère, dans le cas du CXCR4, pour identifier les compartiments cibles lors de l'émergence de formes X4 du virus, surtout chez les types cellulaires où le CCR5 est absent ou faiblement exprimé. Ces cellules seront infectables par les souches T-tropiques dont l'apparition coïncide avec l'avancement vers un état d'immunodéficience.

Le même paramètre a été suivi chez les différentes sous-populations de cellules T au cours de leur développement thymique et chez les cellules souches hématopoïétiques⁶⁶. L'expression du CXCR4 est élevée au stade CD4+CD8+ et également avant l'expression

du RcT (stade CD3⁻). Elle semble diminuer lors de la différenciation en cellules CD4⁺ ou CD8⁺ simplement positives ⁶⁶. La plupart des cellules T naïves ont un niveau élevé d'expression du CXCR4, qui doit donc être induit précédant ou suivant l'entrée dans la circulation périphérique. Des faibles niveaux ont été observés sur les cellules CD34⁺, exprimant ou non CD38, avec une diminution possible avant leur entrée dans le thymus. Par contre, ces analyses sont limitées par le modèle utilisé, soit celui des souris SCID-hu (thy/liv) et des échantillons thymiques fœtaux. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres avec le même modèle animal ⁶⁷. L'expression du RcT peut aussi être comparée : le passage au stade CD3hi et CD5hi coïncide avec une baisse des niveaux de CXCR4 ⁶⁷. Une analyse de cellules souches CD34⁺ à partir d'échantillons sanguins humains a porté sur la détection par RT-PCR d'ARNm des deux corécepteurs ⁶⁸. Plus de 80% des échantillons analysés étaient positifs pour le CXCR4 alors que seulement 25% l'étaient pour le CCR5 ⁶⁸; l'expression du CXCR4 a été observée par cette méthode autant chez les cellules CD4⁻ que CD4⁺, ces dernières pouvant donc servir de cibles pour les virus T-tropiques. L'expression des corécepteurs sur les cellules souches ou les thymocytes humains a été comparé à la capacité pour l'infection par le VIH ^{69; 70}. Avec des cellules de souris SCID-hu, l'expression élevée du CXCR4 chez les lymphocytes T immatures et les cellules souches CD34⁺ concordait avec le degré d'activation par SDF-1 et avec l'efficacité d'infection par HIV-1 LAI, une souche T-tropique : les thymocytes doublement positifs étaient de meilleures cibles pour l'infection productive que les cellules T simplement positives (mais des facteurs non-reliés à l'entrée du virus auraient pu influencer ces résultats) ⁷⁰. Malgré de faibles niveaux d'expression du CCR5 ces thymocytes pouvaient aussi être infectés par Ba-L (une souche virale R5) ⁷⁰. L'expression des deux corécepteurs, CCR5 et CXCR4, a été démontrée par cytofluorométrie et par microscopie confocale chez les cellules CD34⁺, avec la coexpression des deux molécules sur une proportion élevée de cellules, et leur infection par différentes souches, autant R5 que X4 ⁶⁹. Bien que certains résultats se contredisent sur certains points précis, il est évident qu'il y a une régulation complexe de l'expression du CXCR4 au cours de la différenciation et que ceci peut jouer un rôle dans la propagation de l'infection. La présence de ce corécepteur sur les cellules souches, permettant leur infection, est peut-être un facteur dans la baisse des taux de lymphocytes CD4⁺ chez les individus infectés.

L'expression des récepteurs de chimiokines utilisés comme second récepteur par le VIH délimite les sous-populations de lymphocytes qui peuvent être infectées par une souche virale particulière. La présence de ces récepteurs sur des cellules naïves ou mémoires, dont il existe des marqueurs, a permis de démontrer que les compartiments infectés par des virus T-tropiques ou M-tropiques sont relativement distincts et souligne l'importance de l'émergence de souches d'un nouveau tropisme dans l'évolution de l'infection. L'étude par cytofluorométrie pour le CXCR4 a permis de démontrer son expression préférentiellement sur les lymphocytes CD45RA+, les cellules naïves et non-activées, et sur une partie des cellules CD45RO+ ⁷¹. Les deux corécepteurs semblent être présents principalement sur des cellules distinctes ⁷¹. L'expression peut aussi être augmentée par traitement des PBL avec Il-2 ou avec PHA ⁷¹. Une étude sur ces deux compartiments cellulaires et l'effet d'une stimulation avec des anticorps anti-CD28 et anti-CD3 a démontré que l'ARNm pour le CXCR4 était produit aussi bien chez les cellules RO+ que RA+ et semblait diminuer suivant une costimulation CD3/CD28 de six jours ⁷². Tel que vérifié par marquage et immunofluorescence, le récepteur est présent sur approximativement 70% des cellules non traitées des deux phénotypes, avec une baisse de ce pourcentage suivant la costimulation, particulièrement chez les cellules naïves ⁷².

L'analyse par "northern blot" de tissus où est synthétisé le CCR5 démontre qu'il est présent à un haut niveau dans le thymus et la rate ainsi qu'à des niveaux plus faibles dans les PBL et dans l'intestin. Des lignées cellulaires qui l'expriment comprennent la lignée myéloïde THP-1 et, à des niveaux plus faibles, la lignée myéloïde HL-60 et la lignée T HUT 78, mais ces niveaux sont plus faibles que chez les cellules CD8+ et CD4+ ⁷³. Les cellules qui peuvent être infectées par les souches M-tropiques *in vivo*, peuvent jouer un rôle important dans l'établissement de l'infection ou servir de "réservoirs" pour le virus. Ceux-ci comprennent, entre autres, les lymphocytes T CD4+, les cellules de la lignée monocytaire et les cellules dendritiques. Les monocytes, ou les macrophages qui en dérivent, ont par contre des niveaux plus faibles d'expression du CD4 que les lymphocytes. Un certain nombre d'études ont démontré une hausse progressive dans les niveaux d'expression du CCR5 pendant la différenciation des monocytes en macrophages, ce qui est corrélé à l'efficacité d'infection par les souches R5 ^{65; 74-76}. Dans un cas on a observé une

augmentation de 20% à 80% de cellules positives pour le CCR5, chez les macrophages dérivés de monocytes après 5 jours en culture, ainsi qu'une augmentation des niveaux de la protéine ou de l'ARNm chez les cellules positives, après le même délai ⁷⁶. Des cellules de Langerhans directement isolées de l'épiderme expriment de faibles taux de CCR5, de même que les cellules dendritiques obtenues par différenciation en culture ⁶⁵. Un autre groupe a démontré des résultats similaires en cultivant des monocytes pendant une période de dix jours ⁷⁵. Durant cette période de différenciation il y avait une nette augmentation de l'expression de l'antigène de surface pendant les 7 premiers jours et une légère baisse par la suite, alors que les niveaux d'ARNm sont restés stables ⁷⁵. Il est à noter que cette modulation de l'expression du récepteur concorde avec l'efficacité d'infection par des souches virales M-tropiques.

La différenciation en culture des cellules monocytaires est effectuée avec la cytokine GM-CSF. Plusieurs autres cytokines ont un effet sur l'expression du CCR5 chez les macrophages ou monocytes, par exemple INF- γ , Il-2, Il-10 ⁷⁷⁻⁸⁰. Wang *et al.* ont mesuré l'effet de certaines cytokines sur l'expression du CCR5 par des cellules monocytaires et ont corrélé ces variations avec l'efficacité de l'infection par des souches R5, bien que pour certains de ces facteurs il existe des effets antiviraux indépendants de leur influence sur les niveaux du récepteur ⁷⁷. Une augmentation des niveaux de la protéine se produit après incubation des monocytes pendant 48 heures en présence de milieu seulement, avec une hausse supplémentaire après addition de GM-CSF ou de M-CSF. L'effet de ces cytokines est inhibé par ajout d'Il-4 ou d'Il-13, qui sont toutes deux produites par les cellules de la lignée de différenciation Th2. Certains travaux sont contradictoires quant aux effets de l'Il-10 dans ce contexte. Sans modifier les effets de GM-CSF et M-CSF sur les niveaux d'expression du CCR5 par les monocytes/macrophages, l'Il-10 possède un effet antiviral dans leur système ⁷⁷. Un autre groupe démontre que l'Il-10 peut même induire l'expression du récepteur sur les monocytes, apparemment par une augmentation de la demi-vie de l'ARNm plutôt que par un effet sur sa synthèse, et que ce traitement augmente l'efficacité d'infection par VIH-1 Ba-L ⁸⁰. Il a également été démontré que l'INF- γ induit l'expression du CCR5 sur des monocytes obtenus du sang de cordon ou à partir d'échantillons adultes ⁷⁹ et que l'Il-2 l'inhibe sur des macrophages humains ⁷⁸, contrairement au cas des cellules T, par exemple.

Certaines analyses par cytofluorométrie de différents marqueurs de cellules T et des sous-populations exprimant le CCR5 ont montré que, contrairement au CXCR4, le CCR5 était généralement retrouvé sur les cellules colorées faiblement par CD45RA ou positives pour CD45RO, un phénotype qui peut correspondre aux cellules préalablement activées. L'analyse en parallèle avec d'autres marqueurs démontre que les cellules CCR5+ sont colorées fortement avec un anti-CD26 mais sont généralement négatives pour CD25^{71; 81} ; elles sont aussi généralement CD62L- et CD95+⁸¹. Le CCR5 est aussi faiblement exprimé parmi les lymphocytes du sang de cordon, ce qui s'explique par le faible taux de cellules mémoires dans ces échantillons⁷⁴. Plusieurs études ont porté sur la modulation de l'expression du récepteur à la surface cellulaire suivant l'activation des cellules T^{71; 74; 82}. L'Il-2 semble induire l'expression du récepteur suivant un certain laps de temps, avec ou sans la présence de phytohemagglutinine (PHA)^{71; 74; 82}, qui serait principalement active sur les cellules naïves⁷⁴. En analysant des PBMCs obtenus de différents donneurs, Wu L. *et al* ont observé une hétérogénéité quant au taux de cellules positives en cytofluorométrie et quant à l'intensité moyenne de fluorescence, pour des PBMCs de donneurs homozygotes ou hétérozygotes pour la mutation $\Delta 32$ ⁸¹. Les cellules de donneurs CCR5+/+ exprimeraient en moyenne un niveau plus élevé du CCR5 par cellule⁸¹. Une baisse du niveau de l'ARNm du corécepteur, dans les cellules CD4+, se produit suivant une costimulation CD3/CD28 de 6 jours, autant chez les lymphocytes CD45RA+ que RO+^{72; 82}. L'effet contraire est obtenu, avec ce système, suivant une incubation de la même durée avec Il-2 et PHA^{72; 82}. Selon ces résultats, l'infection préférentielle des cellules naïves par des souches R5 est due à une surexpression des chimiokines- β par les cellules de phénotype mémoire, suivant une costimulation par α -CD3/ α -CD28, plutôt que par un effet sur l'expression du récepteur lui-même⁷². On ne sait pas réellement si des anticorps immobilisés produisent le même stimulus que les ligands physiologiques B7.1 et B7.2 : l'affinité d'un ligand peut être un facteur dans l'activation de son récepteur⁸³. De plus, la ligation de CTLA-4 produit des effets différents sur l'expression du CCR5 et des chimiokines- β ainsi que sur la susceptibilité à l'infection par des souches R5⁸³. On peut parfois trouver des explications possibles pour certains résultats d'apparence contradictoire en tenant compte de plus d'un facteur.

L'expression du CCR5 dans le SNC délimite les compartiments cellulaires qui y seront infectés par les souches M-tropiques, responsables de l'infection initiale du SNC. Suivant la migration de cellules mononucléaires infectées à travers la barrière hémato-encéphalique, la propagation de l'infection peut se faire à d'autres types cellulaires avec l'apparition de souches virales distinctes qui ne sont pas retrouvées ailleurs dans l'organisme⁵⁸. Les cellules principalement infectées sont les cellules de la microglie et les macrophages du SNC, tandis que les astrocytes et les cellules endothéliales le sont plus rarement⁵⁸. Ces types cellulaires sont positifs pour le CCR5, qui peut servir de corécepteur pour les souches virales du SNC telles DS-br ou RC-br^{56; 58; 84}.

3.2.2.3 Rôle et signalisation lors de l'activation

L'activation des récepteurs des chimiokines est responsable de plusieurs effets physiologiques. Parmi les chimiokines dont les effets sont caractérisés en détail se trouvent l'IL-8, MCP-1 et RANTES. Cette dernière, qui peut utiliser les récepteurs CCR5, CCR1 et CCR3, est la plus étudiée des chimiokines qui agissent sur les cellules T^{44; 45}.

L'activation par RANTES est mesurée par un flux de Ca²⁺ intracellulaire qui est biphasique selon la concentration du ligand⁸⁵. La première élévation peut être obtenue avec des concentrations nanomolaires du ligand et correspond à la relâche de Ca²⁺ à partir de compartiments intracellulaires alors que la deuxième est plus soutenue, implique le Ca²⁺ extracellulaire et ressemble à ce qui est obtenu par traitement des cellules T avec PHA⁸⁵. Il est à noter que ce type d'activation n'a pas été obtenu en présence d'autres ligands comme MIP-1 α ou MCP-1. L'usage d'inhibiteurs a démontré que le premier degré d'activation implique les protéines G tandis que le second nécessite la phosphorylation sur des résidus tyrosines (activation des PTK)⁸⁵. D'autres études ont démontré que le RcT était requis pour le second degré d'activation par RANTES, et il est possible que les signaux d'activation ne soient pas transmis par un récepteur de chimiokine⁸⁶. D'autres molécules peuvent être phosphorylées sur tyrosine par l'action de RANTES. Parmi ceux-ci se trouvent Zap-70 et p125^{FAK} ainsi que la PT kinase Pyk-2, phosphorylée lors de l'activation par RANTES ou SDF-1 des cellules T (un effet impliquant les protéines G)^{44; 87}. Les facteurs de transcriptions de type STAT peuvent être activés par les voies de signalisations

induites par RANTES et MIP-1 α , induisant la formation de complexes STAT1:1 ou STAT 1:3, menant par exemple à l'activation de gènes comme c-fos dans les lignées MOLT-4 ou Jurkat ⁸⁸.

La phosphorylation et l'activation des kinases de type PI3K a aussi été observée lors de l'activation par RANTES ^{44; 45}. Bien que le ou les mécanismes précis d'activation n'ont pas été élucidés, il a été observé que l'hétérodimère p85/p110 PI3K, de même que PI3K γ , normalement activée par couplage aux protéines G, sont activés dans certains contextes. La phospholipase D peut aussi être activée par RANTES dans les lignées de type Jurkat et la protéine RhoA serait un intermédiaire pour cette voie de signalisation ^{44; 45}.

Certaines de ces études ont aussi été effectuées sur le récepteur CXCR4. L'internalisation lors de la désensibilisation du récepteur, par exemple, est modulée en partie par la région C-terminale intracellulaire, tel que démontré par transfection d'un récepteur tronqué dans cette région ⁸⁹. Le récepteur mutant ne peut pas être phosphorylé suivant l'activation par SDF-1 ou PMA, et la cellule n'est pas réfractaire, lors d'une seconde activation par le ligand, au même degré que celle transfectée avec le récepteur non-muté ⁸⁹. L'analyse de l'internalisation du récepteur a aussi été effectuée avec une protéine de fusion du récepteur avec la GFP et a démontré qu'une fraction des récepteurs est exprimée en tout temps à la surface; ce taux étant dépendant du type cellulaire ⁹⁰. La relocalisation vers les compartiments endosomaux et lysosomaux a été observée par microscopie suivant l'incubation des cellules en présence de SDF-1 ⁹⁰. Certaines voies de signalisations étaient activées lors de la liaison de SDF-1 à CXCR4 avec l'utilisation d'une lignée pré-B murine: la phosphorylation de la kinase RAFTK, celle des kinases MAP Erk1 et Erk2, et l'activation de NF- κ B ont été observés ⁹¹. L'activation de PI3K est aussi obtenue par le ligand SDF-1 et la migration induite par celui-ci est inhibée partiellement par la Wortmannin, un inhibiteur spécifique de cette kinase ⁹¹.

Les réponses fonctionnelles aux chimiokines sont variées et comprennent la régulation de la migration dans les compartiments extravasculaires (chimiotaxie), la formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène, la relâche d'enzymes à partir de compartiments intracellulaires, la modification de la morphologie cellulaire par réarrangement du cytosquelette et l'induction de l'adhésion à l'endothélium ou à la matrice

extracellulaire⁹². Par exemple, RANTES peut induire certains de ces changements et peut aussi servir de molécule activatrice des cellules T^{44; 45} mais l'état actuel des connaissances ne permet pas de relier une voie de signalisation particulière à des conséquences fonctionnelles précises déclenchées par les chimiokines.

Des études à partir de souris "knockout" pour des gènes de chimiokines ou de leurs récepteurs ont amélioré nos connaissances quant aux rôles joués par ces molécules *in vivo*. Le CXCR4 et son récepteur SDF-1 ont tous deux fait l'objet de ce genre de travaux. La production d'une souris homozygote pour une délétion du gène SDF-1 s'est faite avant que ne soit identifié son récepteur⁹³. Ces souris meurent à la naissance, de certains défauts développementaux: les taux de cellules souches de type B, dans le foie fœtal et dans la moelle, sont nettement inférieurs à la normale et les cellules souches myéloïdes sont retrouvées à des niveaux réduits dans la moelle. Elles ont, d'autre part, un défaut de formation du septum interventriculaire⁹³. La production de souris homozygotes pour la délétion du CXCR4 a démontré que ce récepteur est requis lors de la formation des vaisseaux durant le développement, pour l'hématopoïèse et pour la cardiogenèse, de même que pour le développement cérébral^{90; 94}. La similarité des défauts dans ces deux types de souris démontre bien l'importance, *in vivo*, de ce ligand pour le CXCR4 (et vice versa) et laisse supposer que SDF-1 pourrait être son seul ligand. Des souris homozygotes pour la délétion du gène du CCR5 ont été produites, et il en a été de même pour un des ses ligands, MIP-1 α . Dans le cas du ligand, les souris ne montraient pas de défauts d'hématopoïèse, mais les réponses inflammatoires à deux pathogènes étaient modifiées⁹⁵. Des souris CCR5^{-/-} ne présentaient pas de phénotype anormal tant qu'elles n'étaient pas exposées à des pathogènes. Elles montraient, par contre, une plus faible efficacité à éliminer l'infection par *Listeria* et une résistance à l'endotoxicité induite par LPS, deux effets impliquant les macrophages, alors que deux types de réponses impliquant les cellules T étaient augmentées chez ces souris⁹⁶. C'est là un exemple de la régulation de fonctions variables, par une cytokine, dans différents types cellulaires, ce qui suggère que le réseau des chimiokines et des récepteurs n'est pas aussi redondant qu'on aurait pu le croire, dans le cas du CCR5, d'après l'absence d'effets pathologiques chez les individus homozygotes pour la délétion $\Delta 32$ et résistants à l'infection par des souches R5 de VIH.

Des antagonistes ont été produits pour les récepteurs CCR5 et CXCR4 et inhibent les fonctions induites par leurs ligands respectifs; certaines de ces molécules inhibent aussi l'entrée par les souches appropriées de VIH ^{46; 53}. Un oligopeptide, T22, de même qu'une molécule de la classe "bicyclam" AMD3100, ont tous deux un effet anti-viral contre des virus T-tropiques et agissent par un effet direct sur le récepteur CXCR4. Les inhibiteurs du CCR5 comprennent deux analogues de RANTES qui possèdent des extrémités N-terminale modifiées et qui inhibent à la fois la migration induite par ce ligand et l'infection par les souches R5.

3.2.3 Récepteurs CCR5 et CXCR4 dans l'infection par le VIH

Les deux récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR5 sont les principaux co-récepteurs utilisés par les différentes souches du VIH et leurs propriétés ont des conséquences importantes sur l'infection. Il sera question ici de quelques aspects qui ont fait l'objet d'études approfondies depuis la découverte de la nature des co-récepteurs. Nous traiterons du polymorphisme génétique de certains gènes qui influencent le cours de l'infection, de détails structuraux de ces récepteurs ainsi que de certaines conséquences de l'interaction entre gp120 et les co-récepteurs en absence d'entrée du virus.

3.2.3.1 Différents récepteurs et souches virales les utilisant

Parmi les premiers indices de l'identité des corécepteurs, il y a la découverte par le groupe de P. Lusso que les chimiokines RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β sont les principaux facteurs responsables de l'effet antiviral suppressif des cellules CD8⁺ pour les souches M-tropiques du VIH ⁹⁷. L'importance de ces molécules fut aussi soulignée lors de recherches sur certains individus exposés mais non-infectés, qui possédait des taux de ces chimiokines plus élevés que la normale et dont les lymphocytes CD4⁺ ne pouvaient soutenir une infection productive *in vitro* ⁹⁸. La première molécule pouvant servir de corécepteur, le CXCR4 (nommé LESTR, HUMSTR ou Fusin avant l'identification du ligand), fut identifiée en 1996 par le groupe de E. Berger, par clonage d'un gène, à partir d'une banque d'ADNc, qui rendait les cellules transfectées permissives pour la fusion avec des cellules

exprimant des protéines Env de souches T-tropique de VIH-1⁹⁹. Peu après, plusieurs groupes ont publié leurs travaux sur les corécepteurs des souches M-tropiques, soit principalement le CCR5 mais aussi le CCR3 (qui est fonctionnel mais à un plus faible niveau pour la plupart des souches R5)¹⁰⁰⁻¹⁰³. Un isolat primaire capable d'utiliser les récepteurs CCR5, CCR3, CCR2b et CXCR4 fut aussi caractérisé¹⁰⁴.

Peu après, le facteur SDF-1, dont l'effet sur la migration des cellules T avait déjà été caractérisé, fut identifié comme ligand du CXCR4 et sa capacité à inhiber l'infection par les souches T-tropiques fut aussi décrite^{105; 106}. Ces découvertes ont donc permis d'expliquer les différences de tropisme entre les virus pouvant infecter les lignées T et les souches n'infectant que les macrophages et les cellules T primaires; l'importance de la boucle V3 de la protéine de l'enveloppe, principal déterminant de ce tropisme, fut confirmée, notamment quant à son implication dans le mécanisme d'inhibition par les chimiokines β ¹⁰⁷. Le domaine s'est élargi avec la découverte d'autres récepteurs de type GPCR pouvant permettre l'entrée de différents types viraux. Le Tableau II donne la liste de ces récepteurs, dont certains sont des récepteurs orphelins. La liste comprend des cofacteurs efficaces seulement pour des souches de SIV dont le rôle dans le cours de l'infection par le VIH-1 *in vivo* n'est pas connu ; néanmoins, leur diversité apparente souligne la complexité qui prévaut *in vivo*, où des souches de différents tropismes et variables dans l'utilisation de corécepteurs, peuvent coexister. Les corécepteurs caractérisés de cette manière sont STRL33, GPR15 (aussi nommés Bonzo et BOB, respectivement) et GPR1 qui est un cofacteur moins efficace que les deux premiers¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Un autre corécepteur pour des souches de VIH-1 et VIH-2 *in vitro* est US28, un récepteur fonctionnel pour certaines chimiokines β , dont le gène est présent dans le génome du virus CMV¹¹¹. Bien qu'aucune recherche dans cette direction n'a été faite, ceci soulève l'hypothèse que l'infection d'individus séropositifs par le CMV peut influencer la pathogénèse par le VIH, soit en rendant une cellule susceptible à l'infection ou encore en modifiant sa susceptibilité à certaines chimiokines. Des corécepteurs identifiés plus récemment sont le CCR8, dont le ligand I-309 peut inhiber l'infection par des virus R5 ou X4 qui l'utilisent, et Apj, un récepteur orphelin servant de corécepteur pour des isolats primaires T-tropiques, bi-tropiques ou pour SIVmac316^{112; 113}. La fonction comme corécepteur viral du récepteur du leucotriène B4, BLTR, avait été démontrée initialement

pour certains isolats primaires mais a été mise en doute par des résultats de Martin *et al.* 114; 115 .

Peu après l'identification du CXCR4 comme corécepteur pour les virus T-tropiques, on a démontré qu'une souche de VIH-2 pouvait infecter des cellules en absence du récepteur CD4, par l'intermédiaire du CXCR4 ¹¹⁶. Bien que les résultats de cette étude aient été obtenus *in vitro* avec une souche adaptée, elle soulève la possibilité que l'infection puisse se propager à des tissus où le CD4 n'est pas présent et que de nouveaux réservoirs soient accessibles au virus après cette adaptation. Ce phénotype, chez la souche VIH-2 ROD/B, dépend de résidus dans la portion N-terminale du CXCR4 ¹¹⁷. Une souche de VIH-1, NDK, peut aussi infecter des cellules de lignées humaines en absence du CD4 et cette propriété dépend de mutations dans les régions C2, C3 et V3 de la protéine Env ¹¹⁸. Le CCR5 peut aussi permettre l'infection en absence du CD4, tel que démontré pour certains types de SIV dont SIV 17E-Fr ¹¹⁹. Des essais de liaison ont montré que la protéine de l'enveloppe de SIVmac239 peut se lier, en absence de CD4, au CCR5 de macaque rhésus mais non au CCR5 humain ¹²⁰, alors que les deux récepteurs permettent l'infection à des niveaux comparables pour différentes souches de VIH-1, en présence du CD4. Le phénotype dépendrait d'un résidu dans la région N-terminale du récepteur, Asp13. Les essais de liaison de la gp120 ont par contre l'inconvénient de ne pas être nécessairement équivalents à la fonction du récepteur pour l'entrée du virus.

3.2.3.2 Structure et fonction de la protéine de l'enveloppe avec le récepteur: résidus ou régions impliquées

Depuis l'identification des corécepteurs CCR5 et CXCR4, plusieurs systèmes ont été mis au point par divers groupes pour établir des liens entre les éléments structuraux de ces protéines et leur capacité pour l'infection par différentes souches virales. De nombreuses études ont porté soit sur la fonction de chimères entre ces récepteurs et des récepteurs analogues chez d'autres espèces ou des récepteurs humains homologues non permissifs pour l'infection par le VIH ou alors sur des récepteurs mutés par délétions N-terminales ou par mutations ponctuelles (dans ce dernier cas pour évaluer l'importance de la glycosilation par exemple). Bien que ces travaux ont un apport certain dans l'étude

mécanistique de l'infection par le VIH, les résultats obtenus avec ces essais d'expression et d'infection (ou à l'aide d'essais de fusion cellulaire) ne sont pas toujours généralisables. Les récepteurs chimériques ont démontré la complexité des interactions entre la protéine de l'enveloppe et le récepteur de chimiokine : les boucles extracellulaires, qui forment le site d'interaction, ne semblent pas être des éléments indépendants ou interchangeable. D'autre part, des protéines de surface d'isolats différents n'ont pas nécessairement la même interaction avec un corécepteur donné et il est possible que les régions transmembranaires soient aussi impliquées.

L'infection par les souches X4 dépendrait en bonne partie de la séquence de la deuxième boucle extracellulaire (ECL), du moins pour la majorité des souches. Les travaux de Lu *et al.*, avec des récepteurs chimériques CXCR4-CXCR2 (le CXCR2 n'étant pas un corécepteur fonctionnel pour le VIH) ont montré que des récepteurs où la deuxième ou la troisième boucle du CXCR4 étaient remplacés par la région équivalente du CXCR2 ne pouvaient permettre l'infection par les virus T-tropiques ou bi-tropiques testés ¹²¹. On a récemment confirmé que SDF-1 et les protéines d'enveloppe T-tropiques lient le CXCR4 différemment et que la signalisation est indépendante de l'entrée du virus ¹²², ce qui est connu pour le CCR5 également ^{123; 124}. D'autre part, la glycosylation du CXCR4 ne semble pas requise pour l'infection par HIV-2 ROD/B en absence de CD4, tel que démontré par des mutants des résidus N11 et N176 du récepteur; par contre l'efficacité était sensible à des délétions dans la région N-terminale ¹¹⁷.

Les études initiales sur des chimères du CCR5 ont montré que les interactions entre les protéines d'enveloppes et ce récepteur ne se résument pas à l'importance d'un seul de ces domaines. Bien que dans les travaux de Rucker *et al.* ¹²⁵ il n'y avait pas de mesure de l'expression des mutants chimériques du CCR5, certaines conclusions sont possibles d'après l'efficacité d'entrée de souches différentes. Le virus bi-tropique 89.6 est plus sensible aux délétions dans la région N-terminale que le virus M-tropique JR-FL, dans leurs travaux, mais celui-ci le devient lorsque cette région est "insérée" dans le récepteur CCR2b ¹²⁵ suggérant que d'autres résidus ou séquences du CCR5 peuvent compenser les délétions N-terminales. Des différences importantes peuvent exister entre l'efficacité d'entrée avec des chimères analogues : l'efficacité d'infection du virus Ba-L n'est pas équivalente avec des chimères de la région N-terminale du CCR5 dans le CCR2b humain

ou dans le CCR5 murin, deux récepteurs non-permissifs¹²⁶. La région V3 de la protéine virale détermine, en grande partie, l'utilisation ou non de chimères humaines/murines du CCR5¹²⁷. Un autre groupe a pu observer que des délétions progressives dans le domaine N-terminal du CCR5 diminuent l'efficacité de fusion par les souches VIH-1 JR-FL, SIVmac239 et VIH-2 ST24.1¹²⁸ mais qu'elles sont différemment sensibles au remplacement de cette région par la séquence équivalente d'un autre récepteur (la souche de VIH-1 JR-FL étant la plus sensible dans les deux expériences). Une corrélation existe peut-être entre le tropisme et les domaines du CCR5 nécessaires pour l'infection : en analysant des chimères du CCR5 et du CCR2b, Edinger et coll. ont démontré une plus forte importance de la seconde boucle extracellulaire avec un virus SIV M-tropique (SIVmac316) qu'avec deux souches T-tropiques (SIVmac239 et SIVmac251)¹²⁹ ; dans leurs expériences, le virus M-tropique SIVmac316 se comporte quelque peu comme le virus R5 JR-FL, un isolat du VIH-1. Il est possible que les souches bi-tropiques soient plus sélectives pour la séquence de la région N-terminale du CCR5 ou pour sa longueur¹³⁰. Les quatre tyrosines dans cette région du récepteur seraient aussi requises, car des mutations ponctuelles à ces positions affectent l'efficacité d'entrée de souches de HIV-1 ou de SIV¹³¹. Plus récemment, on a démontré que ces résidus sont modifiés par ajout de sulfates, un facteur dans l'entrée du virus de même que pour la liaison de chimiokines agonistes pour ce récepteur¹³².

Le CCR5 peut aussi servir de corécepteur en absence de CD4, notamment pour certaines souches de SIV, dont une souche neurovirulente qui infecte les cellules endothéliales dans le SNC, SIV 17E-Fr, alors que des récepteurs comme GPR1, GPR15 et STRL33 ne peuvent servir, pour ces mêmes virus, que si le CD4 est coexprimé par les cellules cibles¹¹⁹. D'autre part, la liaison aux cellules exprimant le CCR5 de macaque rhésus fut démontrée, en absence de CD4, pour SIVmac239 mais pas pour VIH YU2¹²⁰ ; un résidu dans la région N-terminale du CCR5rh étant responsable pour ce gain de fonction¹²⁰.

Au niveau de la protéine virale de l'enveloppe, la région V3 (troisième boucle variable) est le principal déterminant du tropisme¹² et se lie aux récepteurs de chimiokines en impliquant les domaines qui viennent d'être discutés. L'interaction de la protéine de surface virale avec un récepteur de chimiokine ou le CD4 a été étudié à l'aide d'anticorps

ou de souches virales mutées dans la séquence de cette protéine. Les boucles V1 et V2 sont impliquées dans la liaison entre la gp120 et le CD4 et un changement conformationnel induit par cet événement expose une autre région de la protéine virale¹⁷ qui possède une affinité pour le CCR5^{13; 14}. En plus de la région variable V3, une région conservée, adjacente dans la structure, serait importante pour l'interaction avec le CCR5¹⁸. Peu après l'identification du CCR5 comme co-récepteur pour les souches M-tropiques, des études ont démontré que la protéine gp120 de ces virus peut inhiber, en présence du CD4, soluble ou exprimé par les cellules, la liaison d'un ligand au CCR5^{13; 14}. Dans ces expériences, la région V3 était requise et une forme du CD4 correspondant aux deux domaines D1D2 pouvait inhiber la liaison avec la même efficacité que la protéine soluble complète¹³. Une inhibition de la liaison de MIP-1 β ou MIP-1 α par le CD4 était même observée, dans ce système, en absence de gp120¹³. Des analyses similaires ont été entreprises pour le récepteur CXCR4, et ont démontré le même type d'interaction avec la protéine de l'enveloppe de souches T-tropiques¹³³.

3.2.3.3 Polymorphisme allélique des gènes de récepteurs de chimiokines et ses conséquences sur l'infection par le VIH

Certains individus exposés au VIH de façon répétée ne séroconvertissent pas et demeurent non-infectés. Il était connu que des PBMC de ces individus pouvaient être infectés *in vitro* par des souches X4 mais non par des virus R5 et que leurs taux de chimiokines β , produites par les cellules T, étaient plus élevés que la normale^{98; 103}. Ces observations ont été expliquées par la découverte d'une délétion de 32 nucléotides dans le gène du CCR5, que ces individus possédaient à l'état homozygote¹³⁴⁻¹³⁶. Le récepteur mutant est délété de 32 nucléotides dans une séquence correspondant à la deuxième boucle extracellulaire, ce qui modifie le cadre de lecture et introduit un codon de terminaison de la traduction une trentaine d'acides aminés plus loin pour donner une protéine tronquée^{134; 135}. Bien que l'ARN est produit à des niveaux au moins aussi abondants que chez les individus normaux, la protéine n'est pas exprimée à la surface cellulaire. La mutation est aussi retrouvée à l'état hétérozygote et sa fréquence allélique dans des populations de

descendance européenne est évaluée à près de 10% ¹³⁵. Une analyse de la fréquence allélique chez des individus infectés ou à haut risque d'infection par le VIH, sur un nombre élevé d'échantillons, a montré la forte protection conférée par le génotype homozygote contrairement aux hétérozygotes ¹³⁶. Cette étude a démontré aussi pour la première fois une association entre la présence de l'allèle mutante et la progression de la maladie : le pourcentage d'individus infectés n'ayant pas progressé au stade du SIDA (selon la définition de 1993 de cet état et en fonction de la date de séroconversion) était plus élevé pour les hétérozygotes que pour les individus normaux ¹³⁶. La délétion $\Delta 32$ dans le gène du CCR5 reste le seul facteur génétique, relié aux récepteurs de chimiokines, pour lequel on a démontré un rôle protecteur contre l'établissement de l'infection; ceci contraste avec la progression de la maladie, dont la rapidité a été associée à plusieurs facteurs génétiques de l'hôte, soit des allèles de récepteurs de chimiokines ou des complexes majeurs d'histocompatibilité, par exemple. Suite à ces études initiales, il faut mentionner que quelques très rares individus infectés et homozygotes pour $\Delta 32$ ont été identifiés ^{137; 138}. Il est possible que l'infection se soit établie par la transmission d'un virus pouvant utiliser un autre co-récepteur dans ces quelques cas isolés.

La progression de la maladie vers un stade d'immunodéficiência (caractérisé principalement par le taux de CD4+ sanguins) peut être influencé par d'autres mutations. Dans le cas de la mutation $\Delta 32$, le ralentissement de la progression de la maladie est probablement causé par une plus faible expression du récepteur par les cellules qui ne possèdent qu'une seule allèle fonctionnelle. Un mécanisme d'inhibition en trans de l'expression de la forme normale du CCR5 par la forme mutante a été suggéré pour les cellules possédant une copie de chaque allèle ¹³⁹. On a aussi démontré que les niveaux d'expression de cette protéine sur les PBMC sont généralement plus faibles chez les hétérozygotes, malgré une certaine variabilité interindividuelle ⁸¹. Il a donc été proposé qu'une corrélation plus forte avec la vitesse de progression serait obtenue d'après le phénotype (le degré d'expression) plutôt que d'après le génotype ¹⁴⁰. L'on sait que la progression de la maladie coïncide avec l'apparition de souches utilisant le CXCR4 ¹⁴¹, ce qui peut expliquer en partie l'importance de ce récepteur sur la progression.

Une mutation ponctuelle dans la première région transmembranaire du CCR2, CCR2-64I, qui remplace une valine par une isoleucine, a été corrélée avec une plus lente

progression vers le stade du SIDA sans avoir d'effet sur l'établissement de l'infection (elle est présente à des fréquences comparables dans les cohortes d'individus infectés et dans la population en général) ¹⁴². L'effet sur la progression serait similaire chez des individus hétérozygotes pour $\Delta 32$ et hétérozygotes pour 64I d'après cette étude. Un effet important pour une mutation conservative d'un résidu dans une région transmembranaire d'un récepteur jugé secondaire pour le VIH est difficile à justifier (le CCR2b permet l'entrée, à faible efficacité, pour des virus VIH-1 X4R5 utilisant plus d'un autre co-récepteur) et il a été suggéré que l'effet sur la pathogenèse serait plutôt causé, dans l'analyse statistique de 64I, par une mutation dans une région régulatrice du CCR5 qui serait en déséquilibre de linkage avec 64I vu la proximité de ces deux gènes sur le chromosome 3 ¹⁴³. Une mutation ponctuelle dans le gène du CCR5, m303, modifie une cystéine dans la première boucle extracellulaire en codon stop, donnant une protéine tronquée, et semble donner le même degré de protection contre la transmission, lorsque le deuxième allèle est $\Delta 32$, que l'état homozygote pour $\Delta 32$ ¹⁴⁴. De plus, une mutation dans la région 3' non-traduite du gène de SDF-1 corrèle, à l'état homozygote, avec une progression plus lente, dans une étude statistique sur près de 3000 individus ; son influence s'additionnerait à celle d'autres mutations qui modifient la progression ¹⁴⁵.

3.2.3.4 Effets de la gp120 impliquant les récepteurs de chimiokines en absence d'infection

Les facteurs influençant l'infection par le VIH-1 *in vivo* sont encore mal connus mais bon nombre d'évidences suggèrent que les récepteurs de chimiokines, de par l'interaction avec la gp120, seraient impliqués dans des processus importants autres que l'entrée du virus. Ceux-ci pourraient comprendre une modulation de la signalisation par ces récepteurs, une induction de l'apoptose ou encore des effets cytotoxiques non apoptotiques.

Il est connu que la fonction des récepteurs de chimiokines dans l'entrée du VIH et la signalisation par leur couplage aux protéines G ou par leur activation de seconds messagers, sont des éléments dissociables : différents récepteurs mutants qui ne répondent plus à leur ligand demeurent des corécepteurs fonctionnels ^{123; 124}. L'observation que certaines protéines d'enveloppes peuvent induire une signalisation suite à la liaison à un

récepteur de chimiokine suggère malgré cela un rôle secondaire, indépendant de l'entrée, pour cette interaction durant l'infection^{87; 146}. Alors que ceci peut dépendre de la souche virale il est possible également que gp120 puisse modifier ou inhiber la fonction habituelle des chimiokines comme cela a été reporté^{147; 148}. Ces deux études traitent de deux mécanismes différents, soit l'antagonisme direct du récepteur par la protéine virale¹⁴⁷ ou une internalisation du récepteur de chimiokine induite par la liaison au CD4 et son activation subséquente¹⁴⁸.

D'autres groupes ont étudié l'induction de l'apoptose dans les cellules exprimant le récepteur CXCR4, suite à l'interaction avec la gp120. Il semble exister un mécanisme d'induction de l'apoptose, indépendant de CD95, dans les cellules exprimant les deux récepteurs du virus¹⁴⁹. D'autres travaux ont porté sur la mort des cellules CD8+ suite à une interaction entre la protéine de l'enveloppe et le CXCR4, grâce à l'induction de l'expression du récepteur TNFRII par ces lymphocytes¹⁵⁰. Un rôle neurotoxique de la gp120, durant l'infection du SNC, a aussi été suggéré. On a démontré l'induction de la mort cellulaire dans une lignée neuronale, malgré l'absence du CD4, par la gp120 mais aussi par le ligand du CXCR4, SDF-1¹⁵¹. De plus, on a démontré que des souches retrouvées dans le sang (T-tropiques ou bi-tropiques) pouvait induire l'apoptose de neurones ou d'astrocytes dans des cultures primaires, contrairement à des souches dérivées du SNC, telles que YU2, JR-FL ou DS-br, qui n'avaient pas cette propriété¹⁵². L'utilisation du CXCR4 plutôt que du CCR5 serait le facteur principal puisque le remplacement de la boucle V3 de SG3 dans gp120 de l'isolat YU2 confère à ce virus la capacité d'induire l'apoptose dans ce modèle expérimental¹⁵². Cette étude concorde avec l'hypothèse que l'apparition de souches X4 dans le SNC serait à l'origine des effets pathologiques de l'infection dans cet organe. D'autres effets cytotoxiques, qui résulteraient de l'interaction entre ces deux protéines, peuvent aussi jouer un rôle *in vivo*, comme la lyse de cellules non-infectées par des cellules infectées de façon productive et exprimant la gp160 à la membrane cellulaire¹⁵³.

4. Problématique et hypothèses

Dans ce qui vient d'être décrit concernant les protéines virales et cellulaires impliquées dans l'entrée du virus, la majorité des résultats décrits portent sur ces éléments pris individuellement. Les déterminants structuraux par exemple, de la gp120, des récepteurs de chimiokines et du CD4, qui sont importants pour l'infection, ont été relativement bien caractérisés tandis que les détails des interactions qui sont impliquées sont peu connus. Peu après la découverte du rôle du récepteur CCR5 dans l'infection, deux groupes ont publié des résultats démontrant la liaison de complexes CD4-gp120 à ce récepteur et démontrant également que la gp120 se lie premièrement au CD4 avant que ne se produit un changement conformationnel, encore mal caractérisé, permettant une interaction de haute affinité avec le CCR5^{13;14}.

Plusieurs questions demeurent quant à l'apparition des souches T-tropiques et du changement phénotypique viral et il est possible que ce phénomène puisse être relié à des différences moléculaires entre les deux récepteurs de chimiokines. Des différences biochimiques dans l'utilisation du CCR5 ou du CXCR4 pourraient donc expliquer certaines des propriétés des différentes souches virales *in vivo*. Depuis ces observations initiales, d'autres résultats ont été publiés sur ces deux récepteurs. La colocalisation du CXCR4 et du CD4, en présence de gp120, a été visualisée par microscopie confocale¹⁵⁴, et confirme la présence d'un complexe formé de ces trois molécules. Le groupe de H. Golding a également étudié ces interactions, démontrant l'internalisation d'une forme du CD4 dont la région cytoplasmique est délétée, en présence de gp120, suivant l'activation par un ester de phorbol (PMA)¹⁵⁵, un agent qui, selon leurs résultats préalables, inhibe la fusion¹⁵⁶. Le même groupe a aussi démontré la formation de ce complexe par la coimmunoprécipitation du CD4 et du CXCR4, avec traitement des cellules par gp120¹⁵⁷. En démontrant que la concentration du CCR5 à la surface des cellules influence l'infection lorsque les niveaux de CD4 sont faibles (avec un effet de seuil sur l'efficacité maximale d'infection en fonction du niveau d'expression de CCR5), Platt *et al.* suggèrent par des moyens indirects la présence d'un complexe composé de ces deux récepteurs¹⁵⁸.

Certaines des différences entre les virus R5 et X4 pourraient s'expliquer par un effet du CD4 sur l'interaction avec le co-récepteur, bien que cela reste hypothétique. Une différence encore inexploitée est la capacité, limitée aux virus M-tropiques, à infecter les macrophages (des cellules qui expriment CXCR4 et CD4): en quelque sorte, l'utilisation du CXCR4 dépend du contexte cellulaire. On a déterminé que le CXCR4 pouvait être utilisé par une souche R5X4 mais pas par des virus X4, lors de l'infection des macrophages⁶⁴, mais il est concevable que ces différences soient reliées en partie à la comparaison d'un isolat primaire (89.6) avec des souches adaptées (comme NL4-3). D'ailleurs, l'adaptation des virus isolés à partir de PBMC d'individus infectés (isolats primaires) et la perte d'utilisation du CCR5, sont peut-être reliées à l'influence du CD4 dans l'interaction avec le co-récepteur. À ce propos, il a été démontré que l'adaptation aux lignées cellulaires n'entraîne pas nécessairement une perte de l'utilisation de CCR5¹⁵⁹. Si les changements qui se produisent lors de l'adaptation des virus est reliée aux niveaux de CD4 dans la plupart des lignées utilisées, car ce phénomène a été corrélé à une baisse de l'influence de la concentration de cette protéine dans l'efficacité d'infection¹⁶⁰, cela n'exclut pas pour autant un rôle du co-récepteur. Par contre, la susceptibilité à la neutralisation de l'infection par CD4 sous forme soluble, un paramètre qui diffère entre les virus primaires ou adaptés¹⁶¹, ne dépendrait pas de l'affinité de la protéine de l'enveloppe pour le CD4, qui ne corrèlerait donc pas avec le phénotype viral¹⁶². Récemment, un effet a été proposé pour une modification post-traductionnelle du CXCR4 dans l'efficacité d'infection de macrophages par les virus T-tropiques¹⁶³.

Peu d'indices suggèrent une interaction directe et constitutive entre le CD4 et le corécepteur, c'est-à-dire en absence de la protéine virale, malgré les recherches de plusieurs groupes. On peut tout de même mentionner l'observation de l'interaction d'une portion D1D2 du CD4 avec le CCR5 dans un essai de liaison compétitif¹³ et un faible degré de coimmunoprécipitation du CD4 et du CXCR4 en absence de gp120¹⁵⁷.

Pour tenter de mieux caractériser le mécanisme d'entrée du virus, nous voulions trouver d'autres résidus, séquences ou régions du CD4, qui seraient requises pour la pleine efficacité d'entrée du virus, mais sans être directement impliquées dans l'interaction avec la protéine de l'enveloppe, ce qui est le cas, par exemple, pour certaines parties du domaine D1 (voir plus haut). Des régions hypothétiques du CD4 pourraient interagir avec le co-

récepteur durant l'infection, donc en présence de gp120, induire un changement conformationnel de la protéine virale ou permettre sa liaison subséquente au co-récepteur. Pour mieux comprendre les interactions moléculaires qui caractérisent le processus d'entrée du virus, nous voulions analyser des mutants du CD4 pour déterminer des régions ou résidus qui seraient requis pour l'étape d'entrée, mais sans être nécessairement impliqués dans la liaison à la protéine de l'enveloppe.

Matériel et Méthodes

Cellules.

Les lignées cellulaires HOS-CD4.CCR5, HOS-CD4.CXCR4, HOS-CD4, 293T, 293T-CXCR4HA et -EP, 293T-CCR5HA et -EP, 293T-CD4HA et -EP, 293T-SR α purom, HeLa et HL2/3 étaient cultivées dans le milieu DMEM avec ajout de sérum de veau fœtal (FCS) à 10%, de l'antibiotique gentamycine à une concentration finale de 10 μ g/ml et du tampon HEPES à la concentration finale de 10 mM. La lignée cellulaire Jurkat était cultivée dans du RPMI additionné de sérum de veau fœtal à 10%, de gentamycine à 10 μ g/ml et du tampon HEPES à 10 mM. Le milieu des lignées 293T sélectionnées comprenait la puromycine à 0,250 μ g/ml et celui de la lignée HL2/3 était additionné de G418 à 500 μ g/ml. Les lignées adhérentes étaient récoltées avec un ou deux lavages avec une solution de PBS, suivi de l'ajout d'une solution de trypsine, sauf pour les lignées de cellules 293T qui étaient lavées et récoltées avec ajout d'une solution de EDTA à 0,5 mM dans le tampon PBS. Les cellules en suspension étaient récoltées par centrifugation à 1200 rpm et lavées avec le PBS avant les incubations avec des anticorps. Les cellules étaient incubées à 37°C à 5% de CO₂. Les lignées HOS provenaient du programme AIDS Research Reagent Program par l'entremise de E. Cohen. Les cellules 293T provenaient de M. Tremblay et les cellules HL2/3 provenaient du programme NIH AIDS Research and Reagent Program.

Transfections.

Les cellules 293T étaient transfectées par la méthode du phosphate de calcium (CaPO₄). Les cellules étaientensemencées la veille dans des boîtes de Petri de 60 mm à 4,5x10⁵ cellules par plaque dans 4 ml de milieu de culture et incubées à 37°C. Trois heures avant la transfection les cellules étaient lavées avec le PBS, suivi de l'ajout de 3 ml de milieu de

culture. Pour la transfection, 150 μ l d'une solution de CaCl_2 0,25 M, contenant le ou les plasmides à une concentration de 10 à 15 μ g d'ADN au total, étaient ajoutés en barbotant à un volume égal de la solution HBS 2X ("HEPES buffered saline") (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na_2HPO_4) équilibrée à pH 7,05. Après une attente de 10 minutes, le mélange était ajouté goutte-à-goutte aux cellules qui étaient incubées par la suite à 37°C pendant 24 heures.

Anticorps.

Les anticorps contre les récepteurs de chimiokines, l'anti-CXCR4 12G5 et les anti-CCR5 2D7 et 5C7, provenaient du programme NIH AIDS Research Reagent Program. Certains des anticorps utilisés en cytofluorométrie provenaient de sources commerciales : l'anti-CD4 Leu-3a couplé à la phycoérythrine (Becton Dickinson), l'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la biotine (Vector), l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à la phycoérythrine (Caltag), l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (Caltag) et la streptavidine couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine (Pharmingen). De même, certains anticorps utilisés en immunobuvardage ou en immunoprécipitations provenaient de sources commerciales : l'anticorps anti-EP (Intracel), l'anticorps anti-HA (SantaCruz), l'anticorps anti-GST (Pharmacia), l'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase (Jackson), l'anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Pierce). Les anticorps F2 et C1 ont été obtenus par immunisation de lapins NZW/KBL avec les protéines GST-CXCR4NT et GST-CCR5NT (500 μ g de protéine par immunisation), respectivement, dans l'adjuvant complet de Freund suivie de réimmunisations avec les protéines (500 μ g) dans l'adjuvant incomplet de Freund (4 réimmunisations à 3 semaines d'intervalle). Pour la purification des antisérums F2 et C1, des colonnes d'affinité ont été préparées par couplage des peptides N-terminaux de CXCR4 et de CCR5 avec des billes sépharose 4B activées par CNBr (Pharmacia) selon la procédure fournie. Les peptides ont été générés par clivage par la thrombine, tel que décrit plus loin, des protéines GST-CXCR4NT et GST-CCR5NT purifiées, séparés par migration

sur gel de polyacrylamide-SDS 15% et électroélution des bandes correspondantes, et concentrés avant leur dilution dans le tampon de couplage.

Réactions de PCR et séquences des amorces.

Pour les réactions de PCR, la température était maintenue à 94°C pendant 30 secondes, suivi d'une minute à 55°C et d'une minute à 72°C, sur trente cycles, ce qui était effectué dans un appareil DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer). Les réactions de PCR sur les échantillons d'ADNc de macaque étaient effectuées avec une préparation de polymérase Taq de haute fidélité (Boehringer Mannheim) alors que pour produire les récepteurs comportant les épitopes EP et HA et les protéines de fusion avec la GST, nous avons utilisé un mélange la polymérase Taq additionnée de polymérase Vent à 4% (New England Biolabs). Les matrices pour ces réactions de PCR étaient des plasmides d'un des gènes CD4, CXCR4 ou CCR5 clonés. Pour la préparation de l'ADNc de macaque, l'ARNm a été isolé à l'aide du réactif TriPure (Boehringer Mannheim), selon la procédure fournie, suivi d'une étape de polymérisation d'une heure à 42°C avec la polymérase Taq et une amorce de poly-dT. L'ADN génomique de macaque a été isolé avec ce réactif, à partir des mêmes cellules. Les séquences suivantes sont celles des amorces utilisées pour les différentes réactions de PCR :

FusNAB 5'- atggatccatggaggggatcagtata-3',	
FusNKD 5'- cgaattcgggtgggcaggaagatttt-3',	
CKR5BH 5'-gtggatccacgatggattatcaggtgtc-3',	
CKR5GST 5'- agaattctcgggctgcgatttgctt-3',	HATag 5'-
tgaattcacaggcttgcgtagtctggtacatcgtatggatacccggaatggggctacatgtctt-3',	PETag 5'-
tgaattcaaggttcaggttctggttcaggttctggttctggctccccgggaatggggctacatgtctt-3',	C5HA 5'-
tgactcgagtcacaggcttgcgtagtctggtacatcgtatggatacaagcccacagatatttc-3',	C5PE 5'-
tgactcgagtcacaggcttgcgtagtctggttcaggttctggttctggctccaagcccacagatatttc-3',	FHA 5'-
aaggtaccttacaggcttgcgtagtctggtacatcgtatggatagctggagtgaaaactga-3',	FPE 5'-
aaggtaccttaaggttcaggttctggttcaggttctggttctggctcgtggagtgaaaactga-3',	CCR5-5' 5'-
ctcggatccgggtgaacaagatggattat-3',	CCR5-3' 5'-ctcgtcgacatgtgcacaactctgactg-3'.

Clonage des récepteurs CD4, CXCR4 et CCR5 et plasmides.

Les gènes des récepteurs CXCR4, CCR5 et CD4 ont été clonés dans les vecteurs d'expression pSR α puro ou pSR α neo. Les vecteurs d'expression des récepteurs non modifiés sont nommés pSR α puroCCR5, pSR α puromCXCR4 et pSR α neo1CD4. Les récepteurs comportants les épitopes HA et EP ont été produits par réaction de PCR avec une amorce en 3' qui contenait la séquence de l'épitope et une amorce dans la région 5' du gène. Pour le récepteur CXCR4 les paires d'amorces étaient FusNAB et FHA ou FusNAB et FPE ; pour le CCR5 les paires d'amorces étaient CCR5-5' et C5HA ou CCR5-5' et C5PE ; pour le CD4 les paires d'amorces comprenaient un oligonucléotide s'hybridant dans la région 5' du gène et un des deux oligonucléotides HA₁Tag et PETag. Les fragments obtenus suite à l'amplification ont été introduits par clonage dirigé dans un vecteur comprenant le gène du récepteur correspondant, en remplacement de la séquence analogue non modifiée. Le séquençage par la méthode des dideoxynucléotides a confirmé qu'aucune erreur n'était introduite à l'étape de PCR. Les gènes modifiés ont par la suite été sous-clonés dans les vecteurs pSR α purom ou pSR α neom pour donner les vecteurs d'expression des récepteurs modifiés, qui sont nommés pSR α puromCXCR4HA et -EP, pSR α puromCCR5HA et -EP et pSR α neomCD4HA et -EP.

Production des protéines GST-CCR5NT et GST-CXCR4NT.

L'amplification par PCR des séquences correspondant aux régions N-terminales des récepteurs CXCR4 et CCR5 a été faite avec les oligonucléotides FusNAB et FusNKD pour le CXCR4 et les oligonucléotides CKR5BH et CKR5GST pour le CCR5. Les fragments de PCR ont été ensuite clonés dans le vecteur pGEX-2T (Pharmacia). Les protéines recombinantes étaient produites dans *E. coli* de souche DH5 α . Pour ce faire, 10 ml de milieu 2XYTA était inoculé et incubé à 37°C pendant la nuit, suivi d'une dilution à un volume de 200 ml et d'une induction avec de l'IPTG à 0,1 mM jusqu'à une densité optique lue à 600 nm supérieure à 0,5. Les bactéries étaient alors centrifugées et lavées avec du PBS avant la lyse par sonication. Les lysats étaient incubés à la température ambiante

pendant 30 minutes avec ajout de Triton à 1%. Les échantillons étaient centrifugés et le surnageant obtenu était purifié, pour la fraction contenant la GST, avec les billes de sépharose 4B-glutathione (Pharmacia). La procédure de purification consistait à incuber les lysats avec les billes pendant 45 minutes à la température ambiante, de laver celles-ci trois fois avec du PBS et de les incuber pendant 10 minutes avec un tampon contenant la glutathione pour l'élution. Pour le clivage par la thrombine, 100 µg de la protéine était incubé avec 1 U de l'enzyme pendant 24 heures à température ambiante.

Immunofluorescence et analyse en cytofluorométrie.

Pour l'analyse en cytofluorométrie des récepteurs CD4, CCR5 ou CXCR4, 5×10^5 à 1×10^6 cellules par condition étaient incubées à 4°C pour 30 minutes en présence de l'anticorps primaire à une concentration allant de 2 à 10 µg/ml dans un volume de 100 µl de PBS additionné de FCS à 2% ou sans anticorps pour les contrôles négatifs. Les cellules étaient ensuite lavées deux fois et incubées à 4°C avec l'anticorps secondaire pendant 30 minutes. Elles étaient ensuite lavées deux fois et analysées sur un cytofluoromètre FACScan (Becton Dickinson) avec ou sans fixation préalable avec une solution de paraformaldéhyde à 2% dans le PBS. 10 000 événements étaient analysés.

Immunoprécipitations et immunobuvardage.

Pour les immunoprécipitations, la lyse était effectuée sur 10×10^6 cellules par agitation à 4°C pendant 2 heures dans 1 ml d'une solution de triton à 1% dans le PBS additionnée d'inhibiteurs de protéases. Pour la liaison des anticorps aux billes de sépharose, 25 µl de billes de sépharose-protéine G (Pharmacia) étaient incubées en présence de 7 µg des anticorps anti-HA ou anti-EP ou 10 µl d'un anticorps polyclonal contrôle, dans un volume total de 300 µl de tampon de lyse, pendant 2 heures à 4°C avec agitation. Les lysats cellulaires étaient centrifugés à 12×10^3 rpm et les surnageants étaient incubés avec 50 µl de billes de sépharose liées à un anticorps contrôle pendant 2 heures à 4°C avec agitation. Ensuite, 100 µl de chaque lysat était incubé à 4°C pendant la nuit en présence des billes de sépharose liées aux anticorps, dans un volume complété à 300 µl avec le tampon de lyse. Les billes de sépharose étaient lavées trois fois avec une solution de triton à 1% dans le PBS et une fois avec une solution de Tris 0,5 M à pH 6,8 et ensuite remises en suspension dans un tampon de chargement ne contenant pas d'agent réducteur. Les échantillons étaient chargés sur gel de polyacrylamide-SDS pour l'électrophorèse et analysés par immunobuvardage avec un anticorps anti-HA ou anti-EP.

Pour les immunobuvardages, les cellules étaient premièrement lavées avec le PBS et récoltées. Pour en faire la lyse, le culot après centrifugation était remis en suspension dans un tampon de chargement contenant du SDS. L'électrophorèse se faisait sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, avec $0,5 \times 10^6$ ou 1×10^6 équivalents cellulaires par puits et les protéines étaient ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Amersham). Les membranes étaient incubées pendant une heure avec une solution de lait à 5% dans le PBS pour l'étape de blocage, et ensuite incubées pendant la nuit avec l'anticorps primaire, à une concentration entre 1 et 10 µg/ml pour les anticorps monoclonaux, dans la solution de lait à 5%. Après quatre lavages de 10 minutes avec une solution de Tween à 0,05% dans le PBS, les membranes étaient incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dans la solution de lait à 5%. Ceci était suivi d'une répétition de l'étape de lavage, de l'incubation des membranes avec le réactif luminol (Dupont) et de l'exposition d'un film aux membranes.

Test de fusion.

Les cellules 293T exprimant le récepteur CXCR4 étaient transfectées 24 heures avant le début, dans des boîtes de Petri de 60 mm, avec le vecteur LTR-Luc ainsi qu'avec le vecteur pSR α neomCD4EP, tel que décrit plus haut. Les cellules HL2/3 étaient lavées 2 fois avec du PBS, récoltées sans trypsine et remises en suspension dans le milieu DMEM-10. Environ 1×10^6 cellules HL2/3 étaient ajoutées aux cellules 293T transfectées, qui étaient maintenues en culture pendant 16 heures à 37°C. Le milieu était ensuite retiré et les cellules lavées deux fois avec du PBS, avant la lyse avec 1 ml du détergent CCLR (Promega). Les lysats étaient centrifugés et le surnageant utilisé pour les mesures de l'activité luciférase. L'intensité lumineuse était mesurée avec un luminomètre sur 15 μ l des lysats dilués à 1/1000 ou 1/10000 dans le détergent CCLR, avec ajout de 100 μ l du mélange luciférine (Promega). Des conditions contrôles, pour mesurer l'efficacité en absence d'un des deux récepteurs ou en présence du facteur Tat introduit par transfection, étaient analysées en parallèle. Les mesures étaient prises en duplicata.

Résultats

La première partie du projet avait pour but de produire certains outils qui allaient permettre d'étudier les caractéristiques des récepteurs du VIH durant l'infection. Plus précisément, cela devait mener à l'analyse de mutants de CD4 dans le but d'isoler certains résidus impliqués lors de l'entrée du virus, à une étape subséquente à sa liaison au CD4. La première section décrit la production et la mise au point d'outils pour cette analyse, soit des anticorps polyclonaux contre les deux récepteurs de chimiokines choisis, des lignées qui expriment ces deux récepteurs, ainsi qu'un test de fusion cellulaire servant à analyser l'efficacité d'entrée dans différentes conditions.

La deuxième partie du projet portait sur une délétion du CCR5 d'un macaque *M. nemestrina* ("pigtail") apparente à partir d'un échantillon d'ADNc. La mutation $\Delta 32$ chez l'humain a un effet important sur l'infection par des souches M-tropiques de VIH (introduction) d'où l'intérêt pour une mutation de ce récepteur chez une espèce qui est fréquemment choisie pour des études *in vivo*. Cette partie du projet, sans lien direct avec l'autre, avait pour but la caractérisation de cette délétion, ce qui aurait pu mener à une analyse approfondie de son effet sur l'infection. Ces résultats sont décrits à la deuxième section.

1. Étude du CD4 et des récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4 lors de l'infection par le VIH.
 - 1.1 Production d'antisérums contre les récepteurs CCR5 et CXCR4.

Au début de ce projet, des anticorps contre le CXCR4 ou le CCR5 n'étaient pas encore disponibles commercialement. Ceux-ci étaient indispensables pour des études approfondies des propriétés biochimiques de ces récepteurs et une première étape du travail avait donc pour objectif de produire des protéines recombinantes de ces deux

récepteurs pour l'immunisation de lapins afin d'obtenir des antisérums spécifiques contre chaque récepteur. Étant donné la structure très hydrophobe de récepteurs à sept passages transmembranaires, qui empêche leur purification sous forme soluble, la production de protéines de fusion de la région extracellulaire de chaque récepteur et de l'enzyme glutathione-S-transférase (GST), qui permet une purification rapide à l'aide de billes liées à son substrat, a été effectuée.

Le vecteur d'expression prokaryote qui a été utilisé permet le clonage de la protéine voulue dans le cadre de lecture de la GST (matériel et méthodes) et comporte un site de clivage de la thrombine, une endoprotéase de type serine, à la jonction entre les deux protéines (Figure 5. A.). La Figure 5. A. illustre schématiquement les protéines de fusion générées grâce à ce système. Une séquence correspondant à la région extracellulaire N-terminale de chaque récepteur a été amplifiée par PCR et introduit dans le vecteur par clonage dirigé. Le choix de cette région extracellulaire était basé sur la longueur de sa séquence (la plupart des boucles extracellulaires sont plus courtes, Figure 4.) et en partie sur le rôle de ce domaine des récepteurs de chimiokines pour certaines caractéristiques fonctionnelles comme la liaison des ligands ¹⁶⁴ (ce qui est peut-être souligné par le faible taux d'homologie des séquences N-terminales des différents récepteurs) ; des anticorps contre cette région pourraient donc se lier en compétition avec des ligands ou avec des protéines Env virales.

Les protéines de fusion ont été produites chez la bactérie *E. coli* DH5 α et détectées dans le surnageant obtenu après la lyse et la centrifugation, mais pas dans le culot (des protéines solubles surexprimées sont parfois produites dans des corps d'inclusions et doivent être purifiées par des étapes supplémentaires). La purification par adsorption sur sépharose 4B-glutathione a donné un bon rendement d'après le gel coloré au bleu de coomassie (Figure 5.B.), compte tenu qu'il s'agissait d'une méthode en une seule étape : deux bandes de forte intensité sont purifiées, dans chacun des cas (Figure 5.B.). Le clivage par la thrombine a aussi été analysé et les deux fragments libérés étaient détectables sur gel aux poids moléculaires attendus, mais seulement faiblement colorés au bleu de coomassie étant donné leur petite taille. Les poids moléculaires prédits d'après la séquence des régions amino-terminales de CXCR4 et CCR5 étaient 4 et 3 kDa, respectivement. De même, une

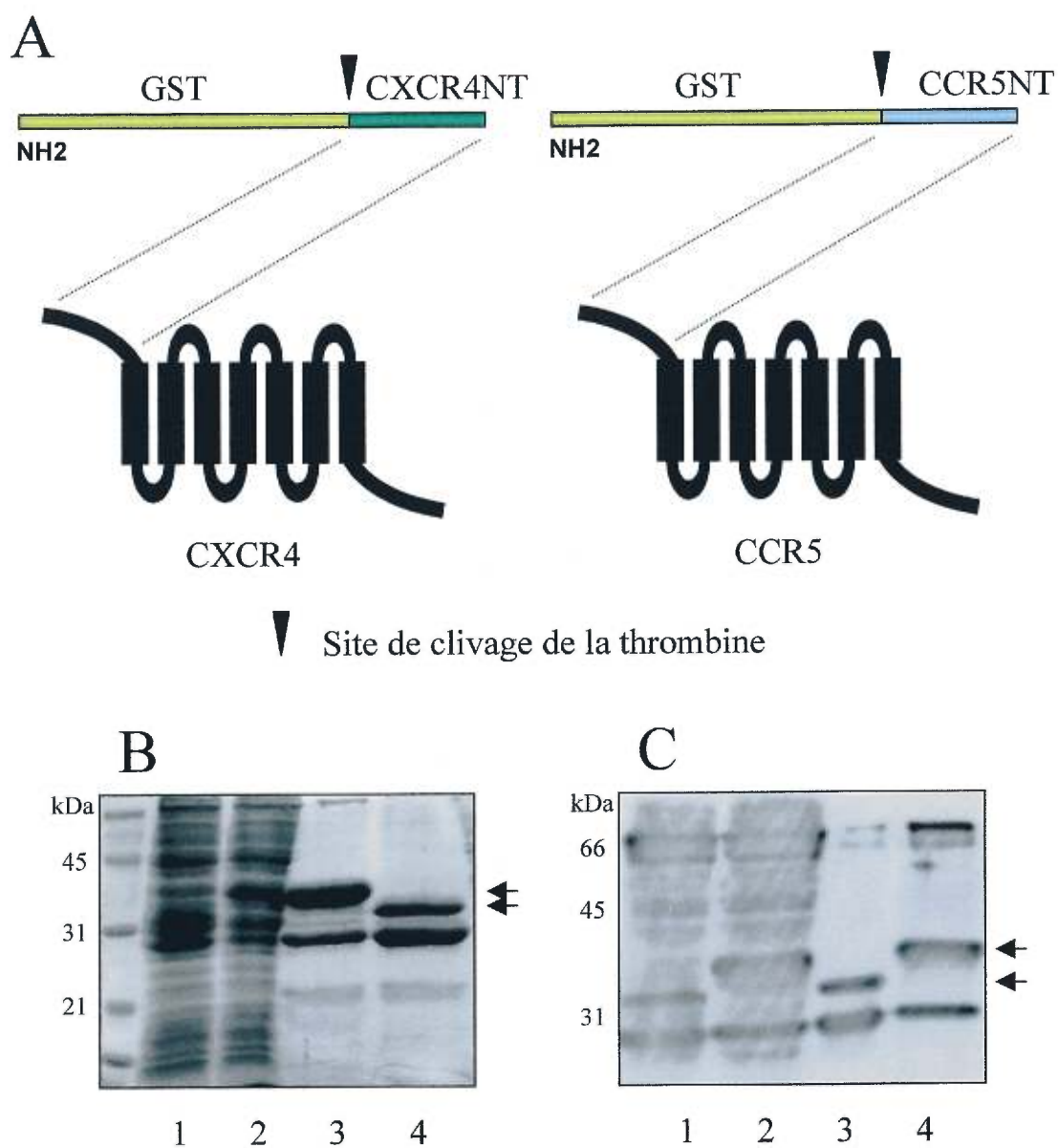


Figure 5. Production de protéines de fusion de la GST avec les régions amino-terminales de CCR5 ou de CXCR4. A. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (12%) des protéines GST-CXCR4NT (pistes 2 et 3) et GST-CCR5NT (1 et 4) avant (1 et 2) ou après (3 et 4) purification sur billes de sépharose 4B-glutathione (Pharmacia). B. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (12%) des protéines GST-CXCR4NT (puits 2 et 4) et GST-CCR5NT (1 et 3) avant (1 et 2) ou après (3 et 4) purification suivi du transfert et de la détection par immunobuvardage avec un anti-GST. C. Schéma des constructions GST-CXCR4NT et GST-CCR5NT.

différence est observable entre la migration des deux protéines de fusion (Figure 5.B. et 5.C., flèches). L'analyse par immunobuvardage avec un Ac anti-GST sur ces échantillons a confirmé que la bande inférieure correspond à la GST (Figure 5.C).

Le rendement de la purification était reproductible d'une expérience à une autre, et nous avons observé que la quantité de GST libre obtenue, par rapport à celles des protéines de fusion, diminuait lorsque les échantillons étaient rigoureusement maintenus à 4° C jusqu'à la dernière étape de purification, ce qui suggère un clivage au site de la thrombine par une protéase présente dans l'extrait. Un volume de culture de 200 ml permettait d'obtenir 1,5 ml de la protéine purifiée à une concentration approximative de 1 mg/ml.

Quatre lapins ont été immunisés, soit deux avec chacune des protéines GST-CXCR4NT et GST-CCR5NT. Des immunobuvardages en western et des analyses en cytofluorométrie sur des lignées transfectées pour le CXCR4 et le CCR5 ont servi à tester l'activité de chaque antisérum contre le récepteur correspondant. La Figure 6. montre les résultats obtenus par immunobuvardage avec les anticorps F2 et C1, provenant de lapins immunisés avec les protéines de fusion du CXCR4 et du CCR5, respectivement (les deux autres lapins avaient des titres d'anticorps plus faibles) et les anticorps F2P et C1P qui correspondent aux mêmes antisérums mais purifiés par colonne d'affinité. La partie GST des protéines de fusion correspondant à plus de 80% du poids de chaque protéine utilisée pour l'immunisation, une portion des anticorps pouvaient être réactifs pour cette partie de la molécule (ce qui dépend aussi de l'immunogénicité de différents épitopes potentiels). Pour vérifier que les sérums reconnaissaient la région amino-terminale des récepteurs, les protéines de fusion ont été analysées par immunobuvardage avec ces anticorps, avant et après clivage par la thrombine (Figure 6.A.). Les fragments clivés d'environ 4 et 3 kDa sont détectables avec une dilution 1/100 de chaque sérum (Figure 6.A., flèches). Sur des lysats de cellules des lignées HOS exprimant les récepteurs CCR5 et CXCR4, ces antisérums étaient négatifs (Figure 6.B. et C.). Pour les enrichir pour les anticorps spécifiques contre chacun des deux récepteurs, une colonne d'affinité a été préparée par couplage des peptides obtenus après clivage et élimination de la partie GST des protéines de fusion à des billes de sépharose 4B. L'élimination de la GST libre et donc l'isolation des peptides clivés a été accomplie par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et

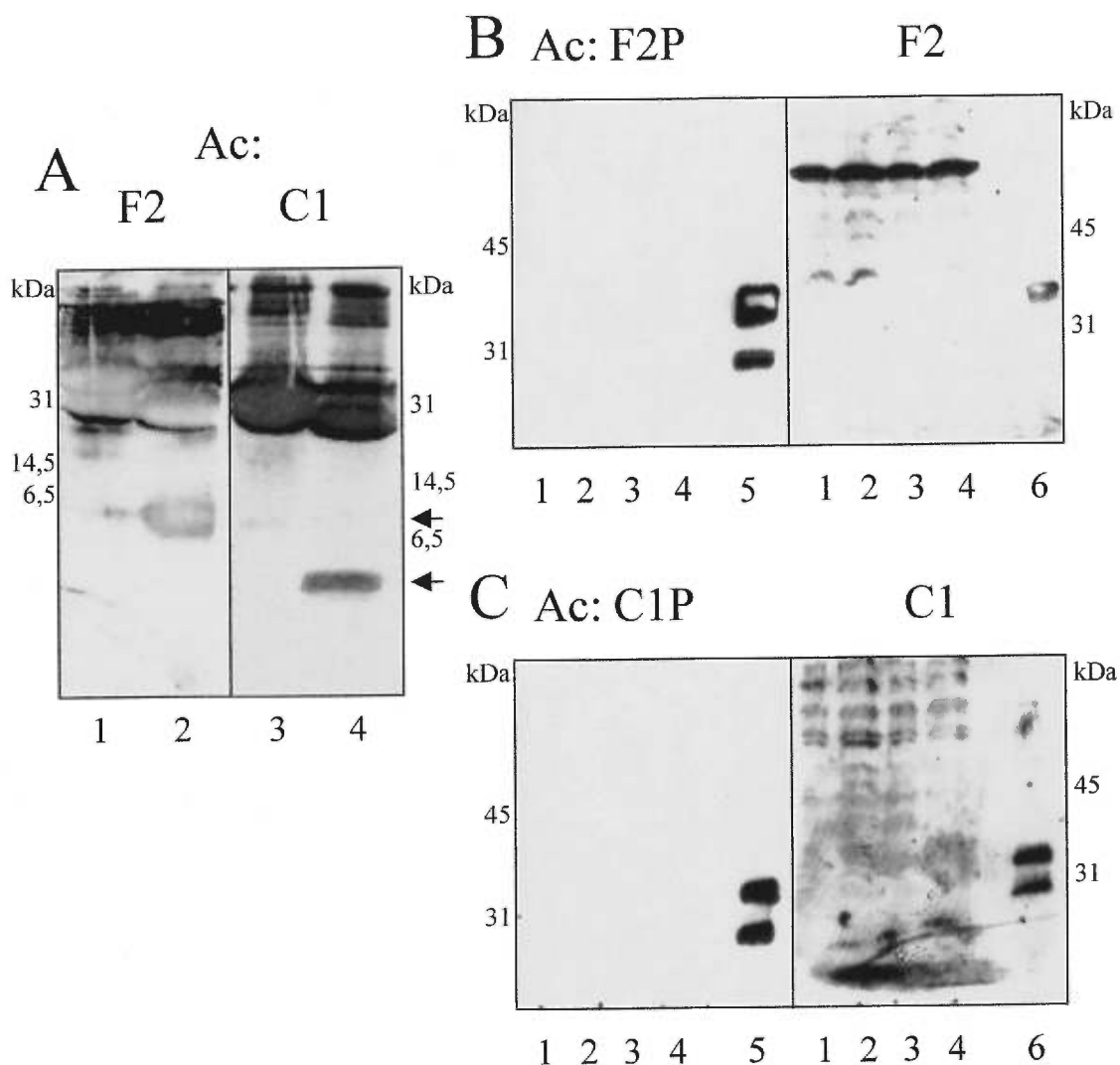


Figure 6. Transfert et analyse par immunobuvardage avec les antisérums purifiés sur colonne d'affinité. A. Détection par immunobuvardage des protéines de fusion purifiées. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (15%) des protéines de fusion GST-CXCR4NT (pistes 1 et 2) ou GST-CCR5NT (3 et 4) purifiées, avec (2 et 4) ou sans (1 et 3) clivage par la thrombine, suivi du transfert et immunobuvardage des membranes avec les anticorps polyclonaux indiqués. B. Immunobuvardage sur des lysats de transfectants de CXCR4 avec l'antisérum F2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (12%) de lysats cellulaires HOS-CD4 (pistes 1 et 2) ou HOS-CD4/CXCR4 (3 et 4) avec 0,5 (1 et 3) ou 1×10^6 (2 et 4) équivalents cellulaires par puits ou de la protéine de fusion GST-CXCR4NT à 20 (5) ou 2ng (6) par puits suivi de l'immunobuvardage avec les anticorps indiqués. C. Immunobuvardage sur lysats de transfectants de CCR5 avec l'anti-sérum C1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS (12%) de lysats cellulaires HOS-CD4 (pistes 1 et 2) ou HOS-CD4/CCR5 (3 et 4) avec les nombres d'équivalents correspondants à ceux en B ou de la protéine de fusion GST-CCR5NT à 100 (5) ou 2ng (6) par puits, suivi de l'immunobuvardage avec les anticorps indiqués.

électroélué de ceux-ci à partir des bandes à 3 et 4 kDa. Les anticorps F2P et C1P, correspondant aux sérums F2 et C1 après cette étape de chromatographie, ne détectaient toujours pas les récepteurs dans des lysats des cellules HOS-CD4/CXCR4 ou HOS-CD4/CCR5, à une dilution équivalente (en quantité d'anticorps) à la dilution des sérums, malgré une réactivité contre la protéine recombinante (Figure 6.B. et C.). La purification sur colonne de protéine G, pour éliminer les immunoglobulines autres que les IgG, n'a pas diminué le bruit de fond de façon significative.

La réactivité de l'anticorps F2 a également été vérifiée en cytofluorométrie, bien que des anticorps monoclonaux soient généralement préférés dans ce contexte. Les cellules de plusieurs lignées humaines expriment des niveaux significatifs du récepteur CXCR4 et l'antisérum F2 a été analysé sur une lignée positive, Jurkat, et une lignée négative, 293T, dont l'expression du CXCR4 a été vérifiée à l'aide de l'anti-CXCR4 12G5 (Figure 7.A.). Un marquage des cellules de la lignée Jurkat est observé avec une concentration élevée de cet anticorps, dilué à 1/50 et de façon moins importante à 1/500 (Figure 7.B.). Le même résultat est obtenu avec les cellules 293T, qui n'expriment pas le CXCR4, ce qui confirme qu'il s'agit d'une adsorption non-spécifique de l'anticorps polyclonal (Figure 7.C.).

Pour conclure, deux protéines de fusion des régions N-terminales du CXCR4 et du CCR5 ont été produites et ont servi, après purification, pour l'immunisation de lapins. Les sérums obtenus possédaient une spécificité pour les régions N-terminales des récepteurs CXCR4 et CCR5, tel que déterminé par immunobuvardage en western sur les peptides utilisés pour l'immunisation. Par contre, les récepteurs n'étaient pas détectés ni par immunobuvardage sur des lysats cellulaires avec ces anticorps ou les sérums purifiés par chromatographie, ni par analyse en cytofluorométrie en flux.

1.2 Production de lignées exprimant les récepteurs CXCR4 et CCR5 humains.

Dans l'analyse des éléments requis pour l'entrée du virus, il est indispensable de pouvoir quantifier son efficacité, par exemple pour comparer entre elles différentes mutations du CD4 ou d'un des corécepteurs. Plusieurs paramètres sont utilisés pour mesurer l'efficacité d'infection *in vitro*. Par exemple, il est possible, quelques jours après

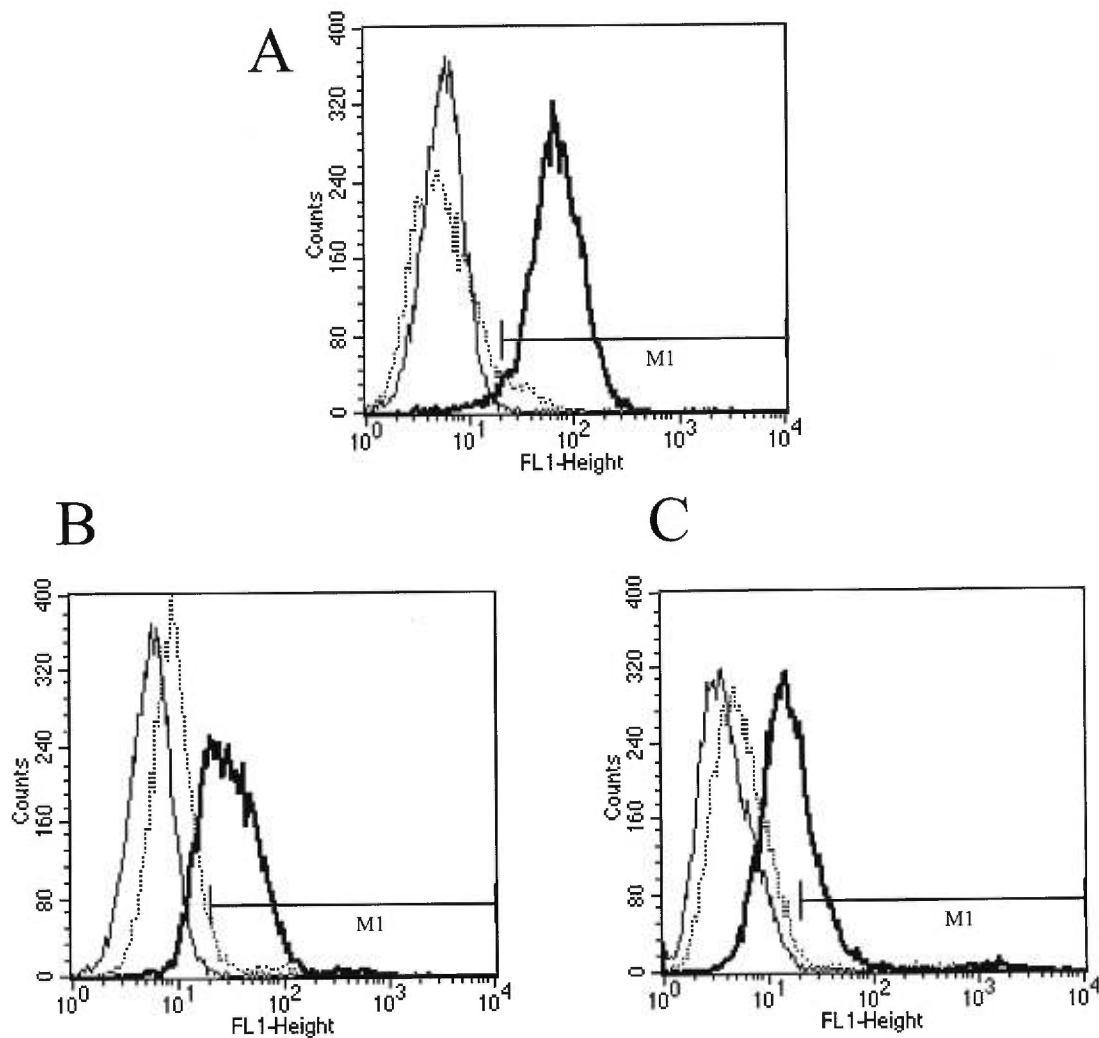


Figure 7. Analyse en cytofluorométrie sur les cellules Jurkat et 293T avec l'anticorps polyclonal F2. A. Les cellules Jurkat ont été incubées en présence (trait gras) ou absence (trait fin) de l'anti-CXCR4 12G5, suivi de l'anticorps secondaire, et les cellules 293T ont été incubées avec l'anticorps 12G5 suivi de l'anticorps secondaire (trait pointillé). B. Incubation des cellules Jurkat en absence (trait fin) ou en présence de l'antisérum F2 à une dilution de 1/50 (trait gras) ou de 1/500 (trait pointillé), suivi de l'incubation avec un anticorps secondaire couplé à la biotine et ensuite de streptavidine-FITC. C. Incubation des cellules 293T avec les mêmes dilutions de l'antisérum F2 et les mêmes anticorps secondaires qu'en B.

l'infection, de doser l'antigène p24 ou l'activité de la transcriptase inverse ou de mesurer la présence du génome viral sous la forme d'ADN double-brin par hybridation avec une sonde radiomarquée. Par contre, ces tests ne quantifient pas l'entrée proprement dite et les mesures peuvent donc être influencées par des événements à d'autres niveaux du cycle de réplication. Une alternative est un test de fusion cellulaire où le virus est remplacé par une lignée cellulaire. Il est généralement accepté que les deux phénomènes se produisent grâce au même mécanisme, ce qui est appuyé expérimentalement. Ce test mesure la fusion entre des cellules qui expriment la protéine virale de surface (gp160) et une lignée qui possède à sa surface le CD4 ainsi qu'un récepteur de chimiokine approprié. L'utilisation d'un gène rapporteur est plus fiable que le décompte des cellules polynucléaires (syncytia) dans un champ au microscope.

Dans le test employé, la protéine virale Tat est exprimée par la cellule effectrice et peut activer la transcription du gène de la luciférase (luciférase de luciole), qui est sous le contrôle du promoteur LTR du VIH, suite à la fusion des deux membranes et son entrée dans la cellule cible. Après la coincubation des deux types de cellules il peut donc y avoir augmentation de l'expression du gène (au-dessus d'un niveau basal) et dosage de l'activité de la luciférase avec l'aide d'un luminomètre. Les cellules effectrices étaient de la lignée HL2/3 et expriment plusieurs protéines de la souche HXB2/3, dont Tat et Env¹⁶⁵. Cette lignée devait être coincubée avec des cellules exprimant CXCR4. D'autre part, pour analyser les interactions entre les récepteurs du virus et la protéine de l'enveloppe, une possibilité était d'effectuer des immunoprécipitations avec un anticorps contre le récepteur de chimiokine ou le CD4, et de détecter la présence ou non d'un complexe formé de la protéine virale et des récepteurs, après ajout de gp120 d'une souche T- ou M-tropique, selon le cas. Les travaux décrits ici avaient pour but la production de lignées cellulaires, exprimant le CXCR4 ou le CCR5, qui devaient être utilisées dans le test de fusion et qui pouvaient aussi servir pour des immunoprécipitations.

Des récepteurs ont été clonés avec à leur extrémité carboxy-terminale des épitopes contre lesquels des anticorps étaient disponibles, soit les épitopes EP (une répétition d'acides glutamiques et de prolines retrouvée dans la procycline de *Trypanosoma brucei*) et HA (de l'hémagglutinine du virus influenza) (Figure 8.). Ces anticorps devaient

servir pour les immunoprécipitations de ces molécules. Des transfections stables ont été effectuées pour les récepteurs de chimiokines (quatre lignées au total) et le CD4 était exprimé par transfection transitoire. Les cellules 293T, une lignée humaine dérivée de cellules de rein, étaient choisies car elles n'expriment aucun des trois récepteurs et à cause de la facilité à obtenir un niveau élevé d'expression (transitoire) d'un gène, par transfection, sur une majorité de cellules. Les figures 9, 10 et 11 montrent les niveaux d'expression de ces récepteurs, tels que mesurés en cytofluorométrie en flux.

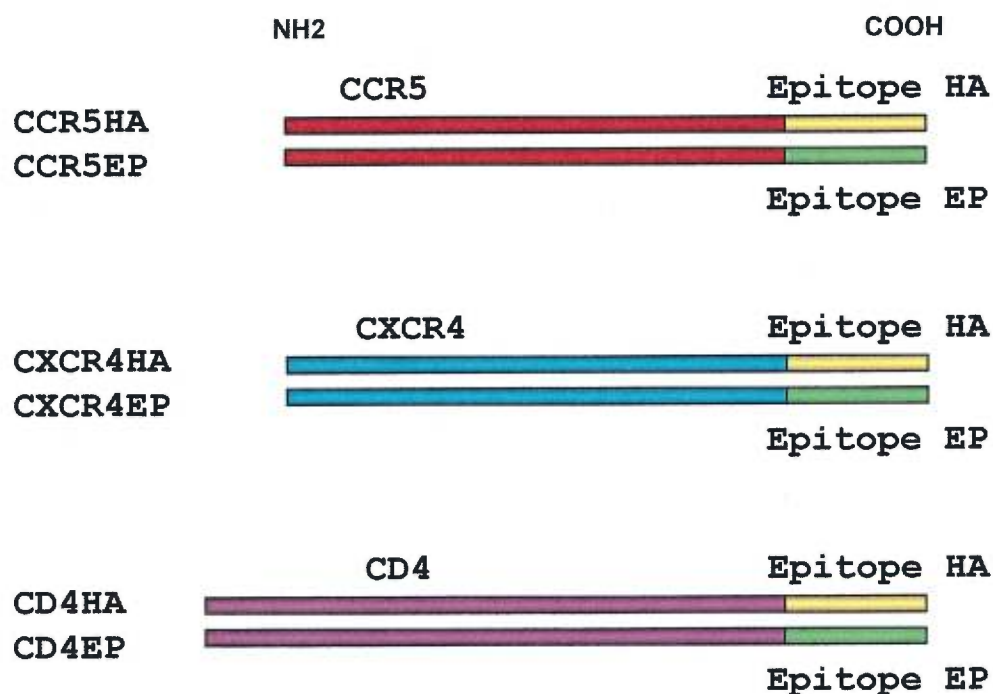


Figure 8. Schéma des récepteurs CXCR4, CCR5 et CD4 modifiés, clonés dans les vecteurs d'expression de type S α . Le CD4 et les deux récepteurs de chimiokines CXCR4 et CCR5 ont été clonés avec les épitopes HA et EP ajoutés à l'extrémité carboxy-terminale (intracellulaire) dans chacun des trois cas.

Les cellules 293T ont été transfectées avec un des vecteurs d'expression du CCR5 et maintenues en sélection par la puromycine pendant trois semaines. Les lignées exprimant le CCR5 ont été analysées par FACS (Figure 9.). Les lignées 293T-CCR5HA et 293T-CCR5EP après sélection possédaient environ 50% et 30% de cellules positives, respectivement. Elles ont été triées en ne gardant que les cellules fortement positives (plus de 95% de cellules étaient positives immédiatement après ce tri). Suite à un délai en culture d'environ une semaine, plus de 90% de cellules étaient positives (Figure 9.B.). Un deuxième tri n'a pas amélioré les niveaux d'expression de façon significative (Figure 9.C.): après cette sélection légèrement plus de 90% des cellules étaient positives pour le CCR5, dans les deux cas.

Des transfections avec les vecteurs d'expression des récepteurs CXCR4HA et CXCR4EP ont été effectuées en parallèle et l'analyse en cytofluorométrie, à l'aide de l'anticorps 12G5, des deux lignées, après sélection par la puromycine et après chacun de trois tris successifs, est représentée à la figure 10. Après trois semaines en sélection les deux lignées CXCR4HA et -EP étaient positives pour le récepteur CXCR4 à près de 15%. (Figure 10.A.). Après le premier tri et un maintien en culture pendant une semaine, les cellules étaient positives à environ 75% et 65%, pour les lignées -HA et -EP, respectivement (Figure 10.B.). De même qu'avec les deux autres lignées, les cellules étaient positives à plus de 95% immédiatement après le tri, mais l'expression du gène transfecté était perdue dans un pourcentage des cellules après une à deux semaines en culture. Pour tenter d'augmenter ce pourcentage, les cellules positives uniquement de forte intensité ont été sélectionnées en tri. La figure 10. montre l'analyse subséquente en FACS (Figure 10.C.), de même que l'analyse après un tri supplémentaire (Figure 10.D.). La lignée 293T-CXCR4HA est positive à environ 60% après le deuxième tri et à environ 40% après le troisième, alors que la lignée 293T-CXCR4EP a environ 80% et 75% de cellules positives après le deuxième et le troisième tri, respectivement (Figure 10.C et D.). Dans tous ces cas les mesures en cytofluorométrie sur des lignées triées ont été effectuées après une à deux semaines en culture. Cette méthodologie ne nous a pas permis d'obtenir des lignées exprimant le récepteur CXCR4 au même degré que le CCR5 dans les deux autres. D'ailleurs, le résultat après sélection démontre qu'il n'y avait pas de cellules d'intensité de

fluorescence très élevée pour les deux lignées positives pour CXCR4 (Figure 9.A. et Figure 10.A.).

Les cellules 293T ont été transfectées avec un vecteur d'expression de CD4 et l'expression mesurée en cytofluorométrie après 24 heures d'incubation pour déterminer les conditions donnant les meilleurs rendements (Figure 11.). Différentes préparations du vecteur ont été testées, et donnaient des efficacités différentes (Figure 11.A.). Des résultats similaires ont été obtenus avec la transfection des lignées 293T-CXCR4HA ou -EP, mais le degré d'expression du CD4 était légèrement plus élevé avec les cellules 293T (lignée d'origine). Avec le vecteur pSR α neomCD4EP, l'efficacité de transfection au phosphate de calcium était d'environ 80% de cellules positives (Figure 11.A. trait bleu foncé). La quantité du plasmide donnant de façon reproductible la meilleure efficacité de transfection, soit de 60% à 80% de cellules positives, a aussi été déterminée (Figure 11.B.). Les conditions ont été adaptées pour les essais de fusion cellulaire (plaques de 60mm et 10 μ g de plasmide, voir matériel et méthodes) pour donner le même taux de cellules positives avec une intensité de fluorescence adéquate (Figure 11.C.) (ici 70% des cellules étaient positives).

Ces résultats démontrent l'expression des récepteurs CCR5 et CXCR4 sur les cellules 293T des lignées correspondantes de même que celle du CD4 après transfection. Les cellules 293T-CXCR4 ont pu être utilisées dans le test de fusion cellulaire.

1.3 Test de fusion cellulaire

Le test de fusion a été mis au point pour une souche T-tropique du VIH-1, HXB2/3 (une chimère entre HXB2 et HXB3)¹⁶⁵ et son corécepteur, CXCR4. Tel que décrit précédemment, les cellules effectrices sont de la lignée HL2/3, des cellules HeLa sélectionnées pour l'expression de certaines protéines virales, dont Tat et Env, mais ne produisant pas de virions fonctionnels¹⁶⁵. Les cellules cibles 293T exprimant le CXCR4 sont transfectées avec un vecteur d'expression du CD4 et simultanément avec la construction LTR-Luciférase (matériel et méthodes). Après un délai de 24 heures, les cellules sont coincubées avec celles de la lignée HL2/3 et ensuite traitées avec un

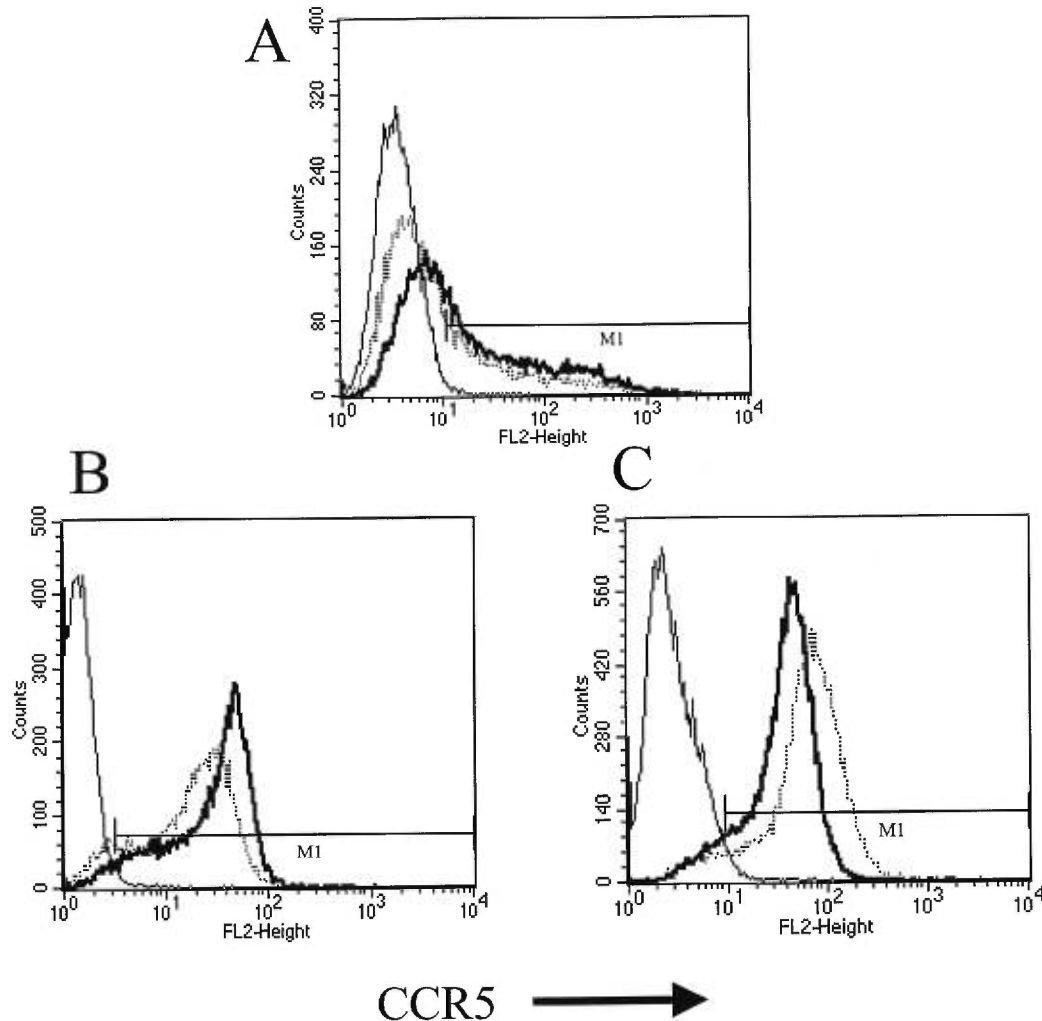


Figure 9. Cellules 293T transfectées et exprimant de façon stable le CCR5 modifié. A. Analyse par cytofluorométrie, avec l'anti-CCR5 2D7 suivi d'un anticorps secondaire, de cellules 293T transfectées avec les vecteurs pSRαpuromCCR5HA (trait plein) ou pSRαpuromCCR5EP (trait pointillé) et maintenues en sélection pendant vingt jours avec la puromycine, ou avec l'anticorps secondaire seulement de la lignée transfectée avec pSRαpuromCCR5HA (trait fin). B. Analyse avec les mêmes anticorps qu'en A. des lignées 293T-CCR5HA (trait plein) et 293T-CCR5EP (trait pointillé) triées pour l'expression du CCR5 ou des cellules 293T-CCR5HA triées, avec seulement l'anticorps secondaire (trait fin). C. Analyse avec les mêmes anticorps qu'en A. des lignées 293T-CCR5HA et 293T-CCR5EP triées une seconde fois pour l'expression du CCR5 (traits plein et pointillé, respectivement) ou avec seulement l'anticorps secondaire, de la lignée 293T-CCR5HA triée 2 fois (trait fin).

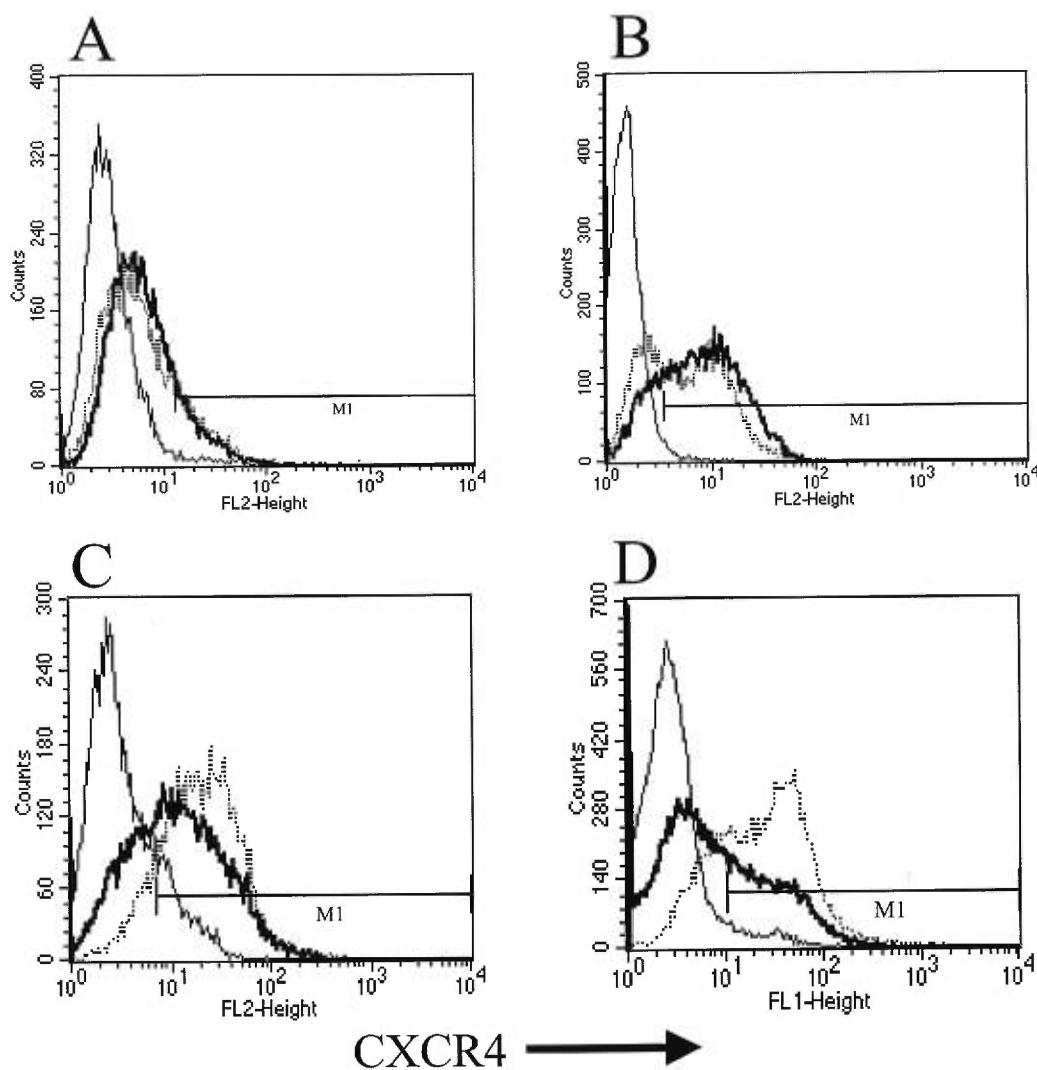


Figure 10. Cellules 293T transfectées et exprimant de façon stable le CXCR4 modifié. A. Analyse par cytofluorométrie, avec l'anti-CXCR4 12G5 suivi de l'anticorps secondaire, de cellules 293T transfectées avec les vecteurs pSR α puromCXCR4HA (trait plein) ou pSR α puromCXCR4EP (trait pointillé) et maintenues en sélection pendant vingt jours avec la puromycine ou avec l'anticorps secondaire seulement, de la lignée transfecté avec pSR α puromCXCR4HA (trait fin). B. Analyse avec les mêmes anticorps qu'en A des lignées 293T-CXCR4HA (trait plein) et 293T-CXCR4EP (trait pointillé), triées pour l'expression du CXCR4, ou avec l'anticorps secondaire seulement, des cellules 293T-CXCR4HA triées (trait fin). C. Analyse avec les mêmes anticorps qu'en A. des lignées 293T-CXCR4HA et 293T-CXCR4EP triées une seconde fois pour l'expression du CXCR4 (traits plein et pointillé, respectivement) ou avec l'anticorps secondaire seulement, de la lignée 293T-CCR5HA triée 2 fois (trait fin). D. Analyse des lignées 293T-CXCR4HA et 293T-CXCR4EP après trois tris pour l'expression du CXCR4 (traits pleins et pointillés, respectivement), avec 12G5 suivi d'un anticorps secondaire, ou avec l'anticorps secondaire seulement, de la lignée 293T-CXCR4HA triée trois fois (trait fin).

détergent. La mesure de l'activité de la luciférase se fait sur un volume prédéterminé de l'extrait cellulaire. Ce test devait servir à comparer la fonction du CD4 et de divers mutants de ce récepteur dans l'entrée du virus. Les expériences décrites avaient pour but la mise au point des conditions optimales pour la mesure de l'efficacité de fusion.

Le niveau d'activation de la transcription du gène rapporteur a été comparé à un contrôle positif correspondant à la transfection des cellules cibles de l'essai avec un vecteur d'expression du facteur Tat (Figure 12.A.). Le niveau obtenu avec la coincubation était environ trois fois moins élevé qu'en transfectant pour Tat ; d'autre part, seulement une légère baisse était mesurée avec les cellules 293T exprimant un seul des deux récepteurs (Figure 12.A., comparer 2 avec 3 ou 4). Cette expérience a été répétée avec des transfusions en duplicata (Figure 12.B.). Encore une fois, seulement une faible augmentation de l'activité de la luciférase est observée lorsque la coincubation se fait avec des cellules cibles exprimant les deux récepteurs viraux plutôt qu'une seule de ces molécules (Figure 12.B.).

L'expérience a été effectuée en faisant varier la durée de coincubation, pour déterminer si un meilleur rendement serait obtenu avant 16 heures. Malgré une variation importante entre des mesures indépendantes prises aux mêmes temps, le maximum semble apparaître après 12 heures (Figure 13.). Les écarts observés étaient probablement dus à une efficacité variable de transfection avec le vecteur de LTR-luciférase, et pourraient être contrôlés avec un standard interne de transfection comme la β -galactosidase. Les cellules cibles exprimant un seul des deux récepteurs nécessaires à la fusion avaient un niveau intermédiaire d'expression du gène rapporteur (mesuré à 12 heures), ce qui suggère que dans ces conditions expérimentales, en absence de l'un ou l'autre des deux cofacteurs, il y a un niveau de fusion supérieur au niveau basal. Il est à noter que le nombre de cellules HL2/3 ajouté a été augmenté dans cette expérience, car il peut s'agir d'un facteur limitant dans nos conditions. D'autre part, l'intensité basale, pour les cellules uniquement transférées avec la construction LTR-luciférase, était élevée et les mesures étaient donc prises sur une dilution de l'extrait pour obtenir des valeurs dans la zone linéaire de l'échelle de l'intensité lumineuse. Dans ces conditions le bruit de fond se situait entre 5 et 10 RLU.

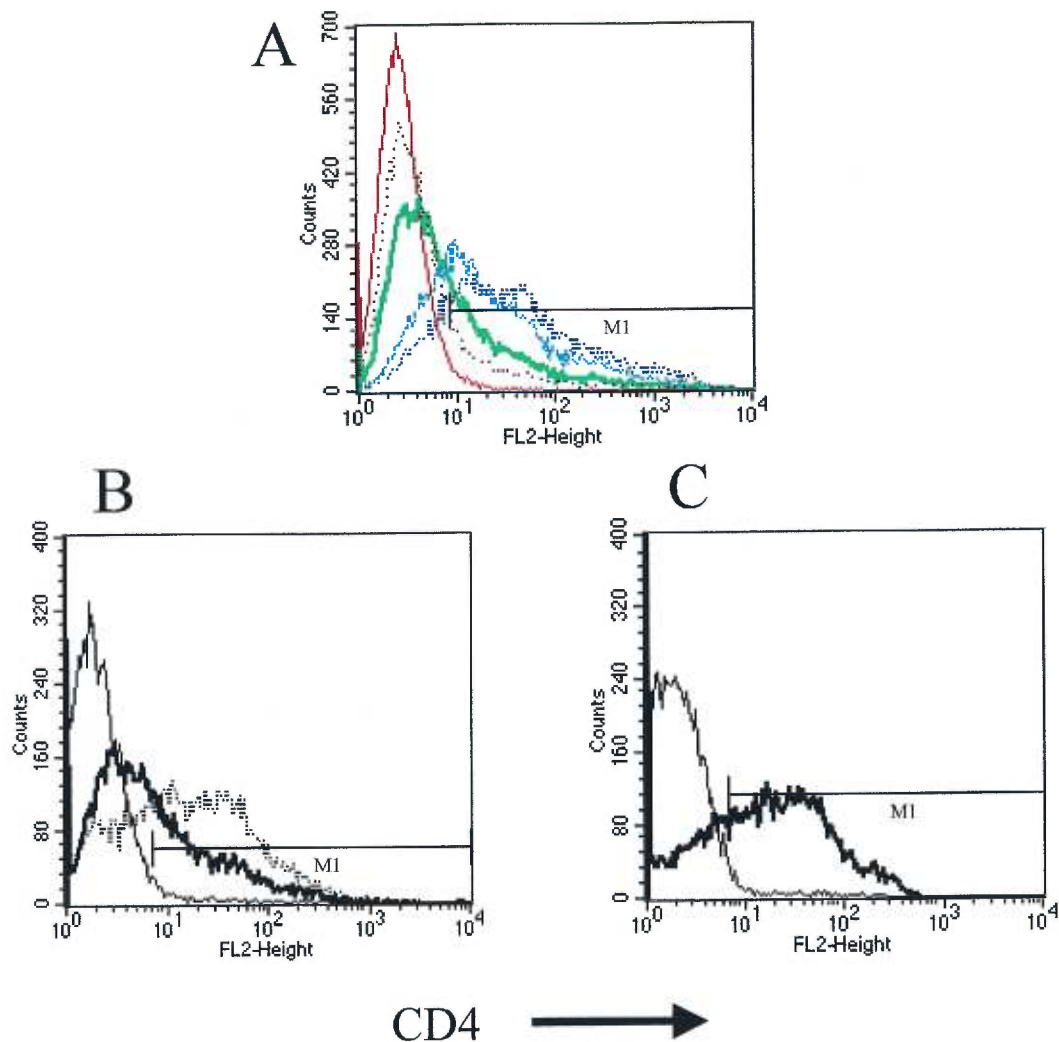


Figure 11. Transfections transitoires des cellules 293T et expression du CD4 après 24 heures d'incubation. A. Analyse par cytofluorométrie avec l'anti-CD4 Leu3a couplé à la phycoérythrine des cellules 293T-CXCR4HA, 24 heures après leur transfection avec la première ou la deuxième préparation du plasmide pSR α neomCD4HA (vert ou noir, respectivement) ou la première ou la deuxième préparations du plasmide pSR α neomCD4EP (bleu foncé ou bleu pâle, respectivement), ou des cellules 293T-Sr α puro, transfectées avec la première préparation du vecteur pSR α neomCD4HA, non-marquées (trait rouge). B. Analyse des cellules 293T, 24 heures après la transfection avec 20 μ g (trait plein et trait fin) ou 50 μ g (trait pointillé) du plasmide pSR α neo1CD4, avec l'anti-CD4 OKT4 suivi d'un anticorps secondaire (trait plein et trait pointillé) ou avec l'anticorps secondaire seulement (trait fin). C. Analyse des cellules 293T, 24 heures après la transfection avec pSR α neomCD4EP (deuxième préparation du plasmide) dans les conditions utilisées pour l'essai de fusion cellulaire, avec l'anticorps Leu3a couplé à la phycoérythrine ou sans anticorps (trait plein et trait fin, respectivement).

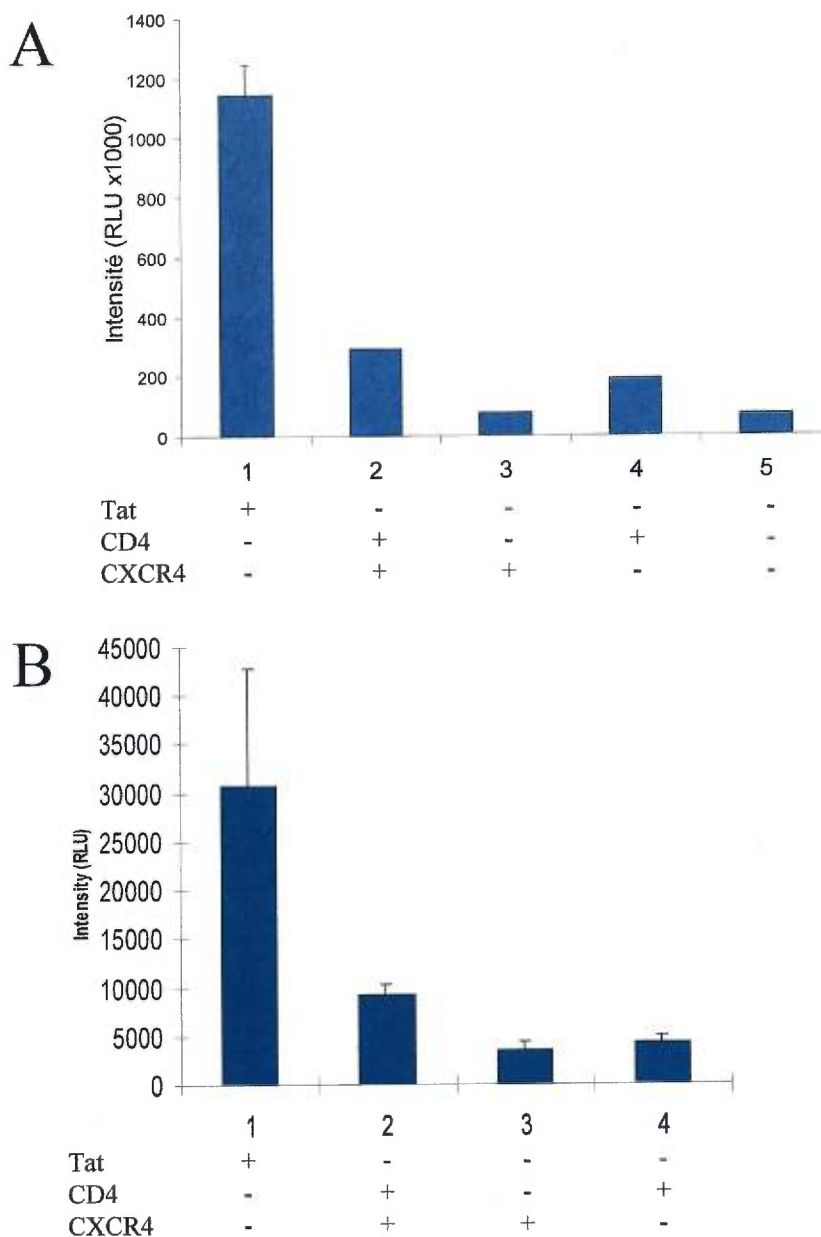


Figure 12. Fusion entre les cellules 293T exprimant le CXCR4 et le CD4 et des cellules HL2/3 exprimant gp160 de HxB2/3. A. Dosage de l'activité de la luciférase, sur des dilutions 1/1000 de lysats de cellules 293T exprimant les récepteurs indiqués et transfectées ou non avec le plasmide SVCMV-Tat et le gène rapporteur LTR-Luciférase, avec (colonne 2 à 5) ou sans (colonne 1) co-incubation avec 7×10^5 cellules HL2/3 par plaque pendant 16 heures. B. Dosage de l'activité de la luciférase sur des dilutions de 1/10000 de lysats des mêmes cellules qu'en A., avec (colonne 2 à 4) ou sans (colonne 1) co-incubation avec 8×10^5 cellules HL2/3 par plaque. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type sur des mesures en duplicata (B.) ou sur une mesure en triplicata (A.), à partir de transfections indépendantes.

Ces résultats montrent qu'un certain niveau de fusion cellulaire peut être mesuré avec les conditions utilisées, mais que le test n'est probablement pas assez précis pour pouvoir détecter des variations plus légères dans l'efficacité de fusion.

2. Analyse d'une délétion du récepteur CCR5 d'un macaque "pigtail".

La progression d'une infection virale subit l'influence de facteurs de l'hôte, ce qui explique des différences observées à ce niveau entre individus infectés. De nombreux travaux ont porté sur l'infection de primates autres que l'être humain, dont différentes espèces de macaques, avec des virus tel le SIV ou les virus chimériques de type SHIV, en tant que modèle *in vivo* de l'infection par le VIH. Des travaux publiés en 1994 par le groupe de G. Schochetman ont démontré que l'infection de macaques "pigtail" (*Macaca nemestrina*) avec une souche de VIH-2 (GB122) permettait la catégorisation des individus en trois groupes d'après sa progression, par analogie avec ce qui est observé chez l'être humain¹⁶⁶. Parmi certains facteurs génétiques de l'hôte qui peuvent influencer le cours de l'infection, un effet significatif a été associé à l'état hétérozygote pour la mutation $\Delta 32$ du CCR5¹³⁶.

Des travaux initiés par O. Jovceviski et A. Yachou ont porté sur le polymorphisme allélique de ce gène, chez différentes espèces de primates, et avaient comme objectif de tenter d'en identifier d'autres formes mutantes qui seraient en mesure d'influencer l'infection. Lors de l'amplification par PCR de l'ADNc du CCR5 à partir d'échantillons cellulaires de macaques "pigtail", une importante délétion était apparente chez un individu, et les expériences décrites ont été effectuées dans le but de caractériser cette délétion.

Des réactions de RT-PCR ont été effectuées à partir d'échantillons cellulaires (PBMC) de macaques "pigtail" infectés par le VIH-2, en collaboration avec le groupe du Centers for Disease Control and Prevention, d'Atlanta. L'ARNm a été isolé des PBMC et l'ADNc produit par RT-PCR avec un oligo-dT. L'ADNc a été isolé à partir des cellules de 11 individus qui se retrouvaient dans les trois groupes définis d'après les paramètres de la pathogenèse de l'infection¹⁶⁶. La séquence du CCR5 de macaque rhesus, par exemple,

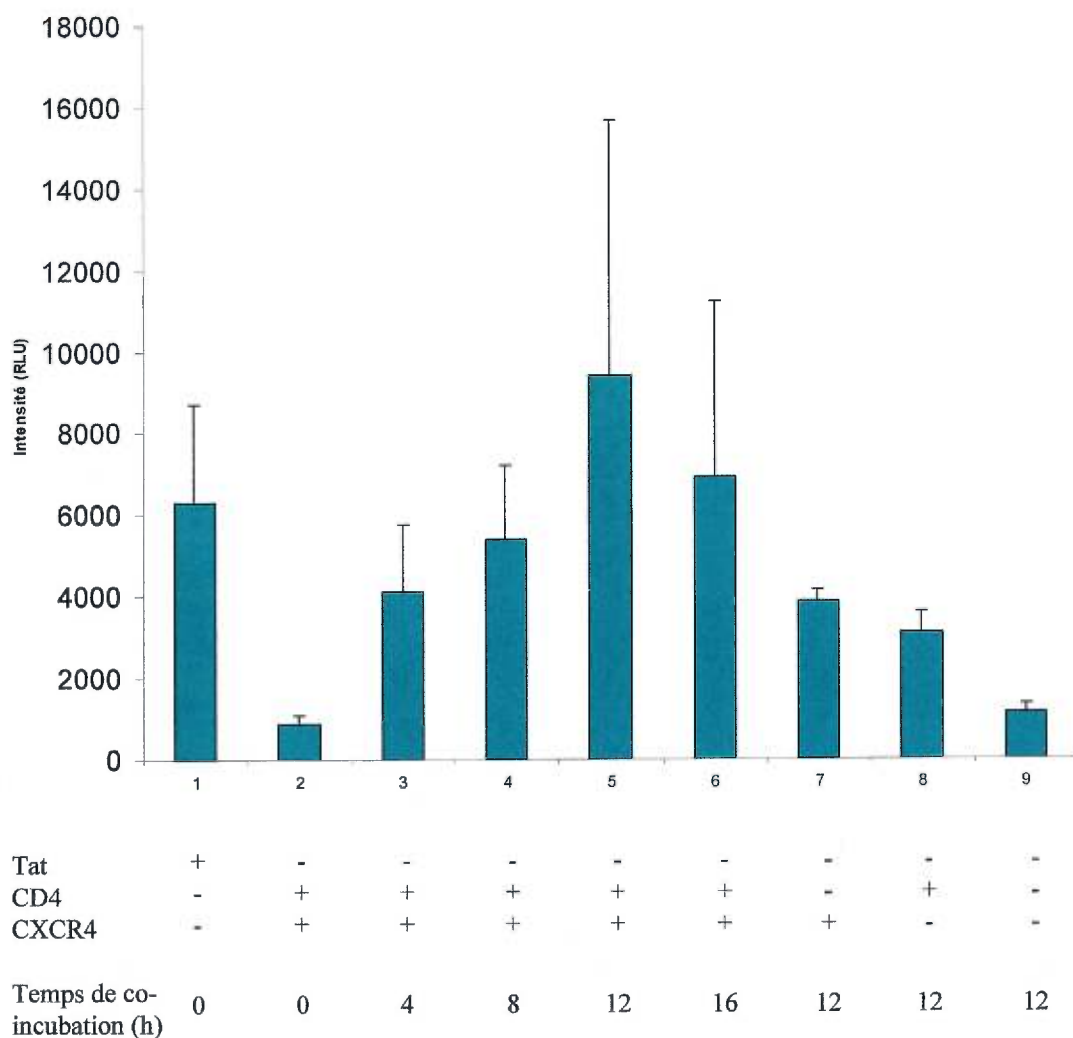


Figure 13. Fusion entre les cellules 293T exprimant le CXCR4 et le CD4 et des cellules HL2/3 exprimant gp160 de HxB2/3, en fonction du temps de co-incubation. Dosage de l'activité de la luciférase, sur des dilutions 1/10000 de lysats des cellules 293T exprimant les récepteurs indiqués et transfectées de la même manière qu'à la figure précédente, avec (colonne 2 à 5) ou sans (colonne 1) co-incubation avec $1,4 \times 10^6$ cellules HL2/3 par plaque pendant le temps indiqué. Les barres d'erreur représentent l'écart-type sur des mesures prises en duplicata à partir de transfections indépendantes.

diffère de celle de l'humain de quelques acides aminés seulement et la séquence du CCR5 de chimpanzé est aussi très homologue¹⁶⁷. Les amorces du CCR5 humain ont pu être utilisées, malgré que la séquence du CCR5 de macaque "pigtail" ne soit pas connue, étant donné la conservation de la séquence de la région codante de ce gène chez différentes espèces de primates. Ces échantillons ont donc servi pour les analyses qui ont suivi, dont l'amplification de l'ADNc du CCR5 avec les amorces CCR5-5' et CCR5-3'. La Figure 14. montre l'amplification d'une bande d'environ 1,1 kb correspondant à la taille de l'ADNc de ce gène, chez sept individus. Ces résultats ont été obtenus avec deux réactions de PCR successives de trente cycles (matériel et méthodes, après la première il n'y avait que des produits de très faible intensité). Une bande supplémentaire apparaît avec le macaque 100-95, à une taille approximative de 600 pb (Figure 14., flèche). Cette bande a été retrouvée lors d'amplifications subséquentes par PCR, à partir de cet échantillon, mais pas chez d'autres macaques.

Pour vérifier la possibilité d'une délétion dans le gène du CCR5 du macaque 100-95, les deux fragments de PCR ont été clonés et celui de 580 pb a été séquencé, de même que certaines régions du fragment de 1100 pb. Une délétion de 533 nucléotides a été identifiée dans la séquence du fragment de plus faible poids moléculaire. Elle débute dans une partie de la séquence correspondant à la deuxième boucle extracellulaire (à quelques nucléotides du début de la délétion $\Delta 32$ chez l'être humain) (Figure 15.). La délétion comprend la partie 3' du gène à partir de ce point et trente-cinq nucléotides de la région non-codante (Figure 15.). La traduction d'un tel ARNm produirait une protéine de 208 acides aminés dont les derniers 22 proviendraient de la séquence non-traduite en 3' du gène du CCR5. L'amplification par PCR se fait généralement mieux sur des séquences plus courtes ce qui peut expliquer que lors de l'amplification à partir de l'ADNc, le fragment de 580 pb est de plus forte intensité que celui de pleine longueur.

Pour vérifier si l'amplification de ce produit de PCR reflète la présence d'un allèle mutant, et donc de l'état hétérozygote chez ce singe (étant donné l'amplification simultanée de la bande de longueur habituelle) la même réaction de PCR a été effectuée sur la fraction d'ADN génomique, isolée au même moment que l'ARNm. Il a été démontré lors de la caractérisation de la mutation $\Delta 32$ que l'allèle mutant était présent sur l'ADN génomique, et qu'un parent d'un individu homozygote pour cet allèle avait le génotype hétérozygote

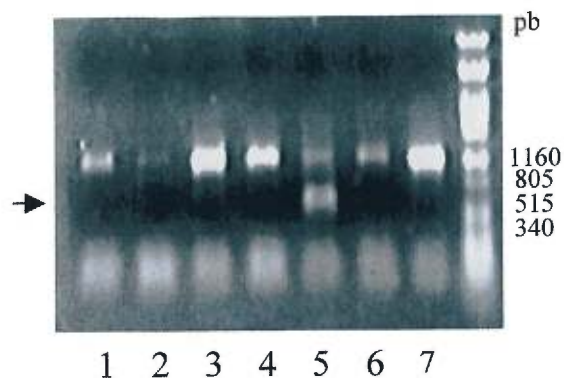


Figure 14. Réactions de PCR à partir des échantillons d'ADNc de macaques "pigtail". L'ADNc a été obtenu par une réaction de RT-PCR sur l'ARN isolé des PBMC. L'amplification a été effectuée avec les amorces CCR5-5' et CCR5-3' sur les échantillons des individus 62-313, 52-106, 72-248, 80-13, 100-95, 52-99 et 72-250 (pistes 1 à 7, respectivement).

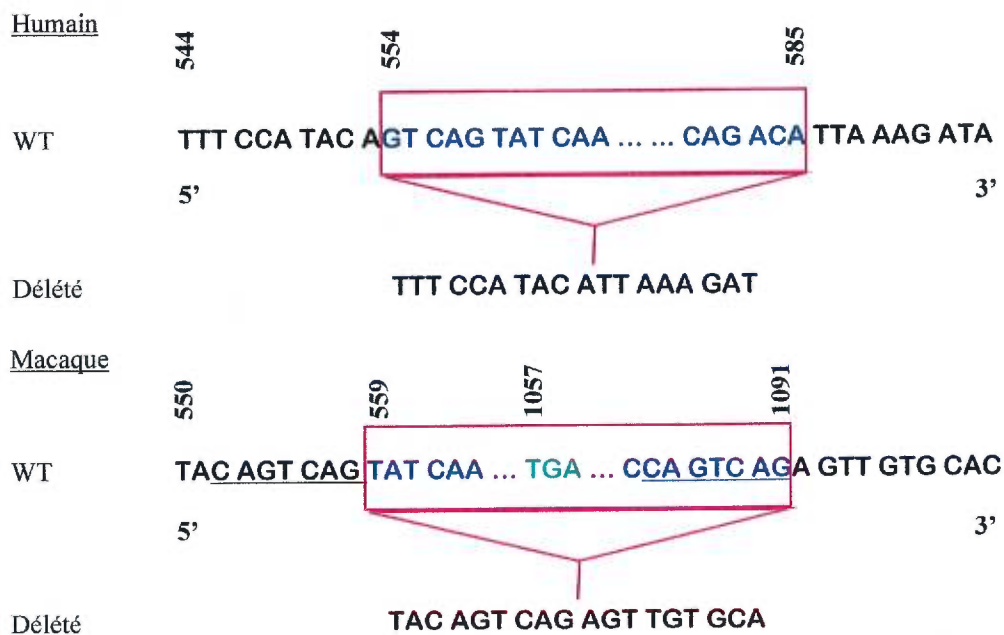


Figure 15. Comparaison entre la délétion $\Delta 32$ du CCR5 humain et la délétion du CCR5 retrouvée chez un macaque "pigtail". En bleu sont représentées les séquences délétées et le codon de terminaison de la traduction du CCR5 est montré en vert. Une répétition de sept paires de bases dans la séquence de l'ADNc du CCR5 est soulignée.

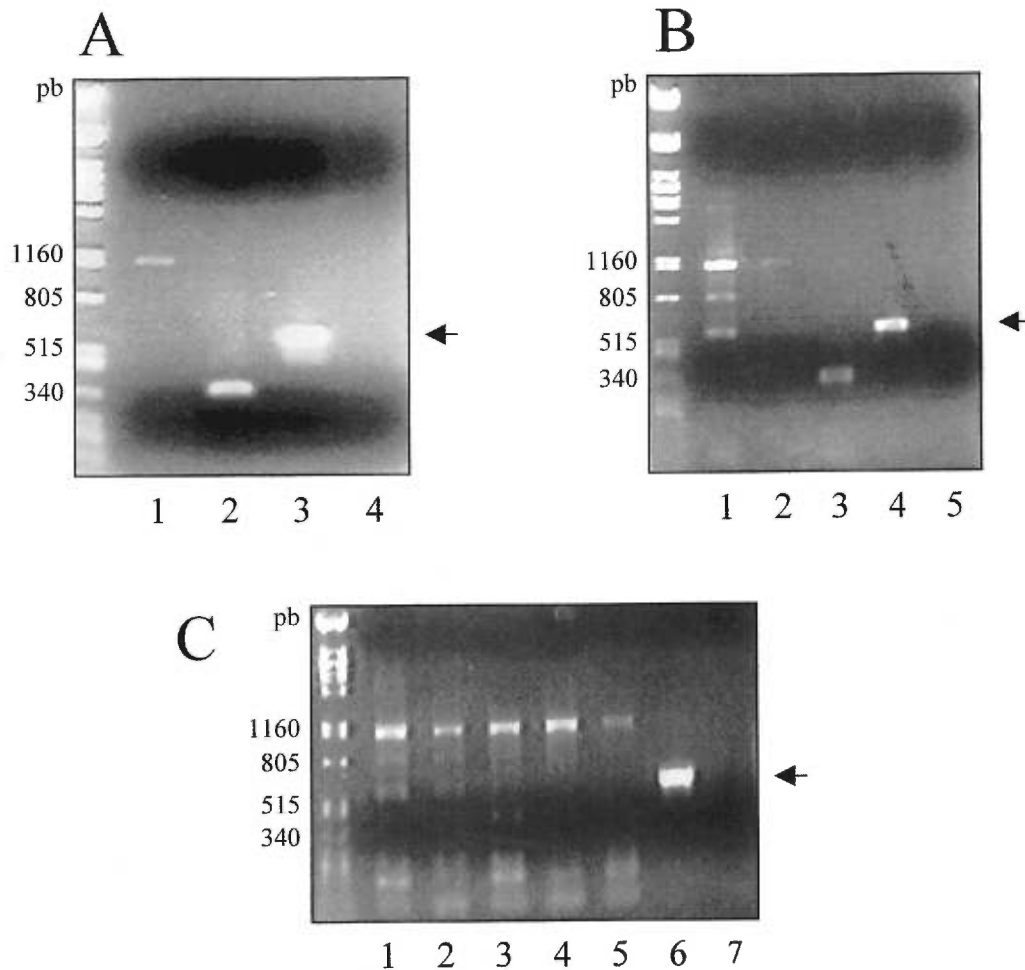


Figure 16. Amplification par PCR du CCR5 de macaque "pigtail" à partir des échantillons d'ADN génomique. A. Réaction de PCR avec les amorces CCR5-5' et CCR5-3' (piste 1) ou les amorces actin-F et actin-R (2) à partir de la fraction d'ADN génomique du macaque 100-95 (3 μ l) ou avec les amorces CCR5-5' et CCR5-3' sur le plasmide pBSCCR5mn0,6 (0,2 ng) ou en absence d'ADN (3 et 4, respectivement). B. Amplification à partir du produit de la première réaction de PCR (1 μ l) sur l'ADN génomique du macaque 100-95 avec les amorces CCR5-5' et CCR5-3' (piste 1) ou à partir de l'ADN génomique (1 μ l) de cet individu avec les amorces CCR5-5' et CCR5-3' ou actin-F et actin-R (2 et 3, respectivement); réactions de PCR avec les amorces CCR5-5' et CCR5-3' sur le plasmide pBSCCR5mn0,6 ou en absence d'ADN (4 et 5, respectivement). C. Deux réactions de PCR successives, avec les amorces CCR5-5' et CCR5-3', sur les échantillons d'ADN génomique des individus 52-99, 52-106, 62-313, 70-16 et 72-198 (pistes 1 à 5, respectivement), sur le plasmide pBSCCR5mn0,6 (6) ou sans ajout d'ADN (7).

attendu ¹³⁴. Un produit de PCR a été amplifié avec les amorces CCR5-5' et CCR5-3' à partir de l'ADN génomique du macaque 100-95 (Figure 16.A.), mais il n'avait pas la taille de la forme tronquée (Figure 16.A., flèche). Une seconde amplification a été effectuée à partir de ce produit dans le but de détecter des fragments secondaires qui seraient présents mais en trop faible quantité pour être visibles. Des bandes secondaires sont apparues suite à une seconde amplification, et une de celles-ci semblait correspondre à la taille du fragment de 580 pb (Figure 16.B., flèche). Par contre, il pouvait s'agir d'un produit secondaire détecté à cause du nombre élevé de cycles (un total de 60 cycles d'amplification avec deux réactions successives). Ceci semblait être le cas puisque les mêmes bandes secondaires étaient observées avec deux réactions successives à partir de l'ADN génomique d'au moins deux autres individus (Figure 16.C., flèche). L'amplification à partir de l'ADNc de ces macaques ne donne que le fragment de 1100 pb (Figure 15.). Il était cependant impossible de refaire l'étape RT-PCR étant donné la faible quantité de cellules disponibles pour chaque individu.

La caractérisation de la délétion dans le produit de PCR et les réactions de PCR sur des échantillons d'ADN génomique suggèrent que la délétion reflète plutôt un produit secondaire de PCR que l'hétérozygotie de l'individu pour un allèle défectueux de ce récepteur. Des expériences additionnelles pourraient servir à confirmer ces observations, en utilisant une méthode de révélation plus sensible (avec marquage des produits de PCR au ³²P et autoradiographie, par exemple) ou par "Southern blot" à partir des échantillons d'ADN génomique avec une sonde spécifique pour le CCR5, bien que cette méthode requière généralement des quantités plus importantes d'ADN que ce qui était disponible.

Discussion

Production d'anticorps contre les récepteurs CCR5 et CXCR4.

Des protéines de fusion ont été produites pour obtenir par la suite des antisérums contre les deux récepteurs de chimiokines choisis, tel que décrit précédemment. Bien que la production des protéines ait été compliquée par la longueur relativement courte des domaines N-terminaux de CXCR4 et de CCR5, ces séquences sont suffisamment immunogènes car des moyens similaires ont été utilisés par d'autres pour la production d'anticorps contre ces récepteurs. Des peptides correspondants aux séquences des domaines extracellulaires de CXCR4 et de CCR5 ont été produits par synthèse chimique par le groupe de H. Golding. Ils ont obtenu des anticorps polyclonaux par l'immunisation de lapins avec ces peptides dans l'adjuvant complet de Freund, suivi de deux ou trois immunisations subséquentes avec les peptides dans l'adjuvant incomplet de Freund^{65; 157}. De façon similaire, Förster *et al.* ont produit un anticorps monoclonal contre le CXCR4 par immunisation de rats avec des protéines recombinantes formées de la fusion entre la GST et environ soixante acides aminés N-terminaux de CXCR4⁶². Ils ont procédé par la fusion d'hybridomes avec des splénocytes et ont testé les surnageants en ELISA contre les protéines recombinantes et contre des lignées transfectées pour le CXCR4⁶². La méthode utilisée ici n'était donc pas erronée mais il est possible que des particularités des étapes de purification ou d'immunisation n'aient pas permis de donner un titre adéquat d'anticorps. Par exemple, la taille des peptides (3 et 4 kDa pour CCR5NT et CXCR4NT, respectivement) par rapport à celle de la GST (qui fait 27 à 28 kDa), empêche peut-être un niveau optimal d'activation de la production d'anticorps chez l'animal, d'où l'avantage d'utiliser des préparations des peptides synthétiques par exemple¹⁵⁷. Les immunisations ont été faites avec environ 500 µg (matériel et méthodes) de la protéine recombinante, soit approximativement 50 à 60 µg pour les portions CXCR4NT et CCR5NT, ce qui n'est peut-être pas une quantité suffisante. Il aurait peut-être été préférable d'éliminer la GST de la

protéine de fusion par clivage, malgré que la production en grande quantité de ce fragment soit peu commode étant donné la difficulté de manipuler des peptides de cette taille, qui ne peuvent être dialysés par exemple. Une réactivité contre les peptides était présente dans les deux antisérums testés mais, tel que décrit, ceci n'a pas été observé avec des lysats de cellules transfectées pour le récepteur approprié. On peut exclure une erreur lors des étapes de clonage dans le vecteur d'expression, puisque les produits amplifiés par PCR ont été séquencés et l'étape de clonage vérifiée par digestion avec des enzymes de restrictions et par réaction de PCR sur les produits clonés.

Les anticorps disponibles commercialement et qui ont été utilisés ici pour la vérification des taux d'expression des récepteurs CXCR4 et CCR5 après transfection, ont été initialement produits, dans plusieurs cas, par immunisation directe avec des cellules transfectées. L'anticorps monoclonal 12G5, qui reconnaît la partie extracellulaire du CXCR4, et qui inhibe l'infection par des souches T-tropiques de VIH, avait été isolé lors d'un criblage pour un facteur pouvant inhiber l'infection¹¹⁶. Le clone 5C7, qui a une spécificité pour le CCR5 humain, avait été isolé suite à une immunisation avec des cellules transfectées pour le CCR5^{71;81}.

Test de fusion cellulaire.

Des tests de fusion cellulaire sont utilisés couramment comme mesure de l'efficacité d'infection avec différents récepteurs ou souches virales. C'est le cas, par exemple, pour la détermination des récepteurs de chimiokines qui servent de corécepteurs pour un virus spécifique ou pour l'identification de corécepteurs secondaires qui permettent l'entrée du virus avec une efficacité plus faible. Ils servent aussi lors de l'identification de molécules, peptides ou même anticorps neutralisants qui ont un effet inhibiteur sur l'entrée du virus. Une alternative est de procéder par infection, soit par mesure de l'entrée du virus par PCR ou à l'aide d'un gène rapporteur, ou par mesure de sa réplication (quantification de l'activité de la RT ou dosage de l'antigène p24). Dans le cas des tests de fusion, différents moyens ont servi à quantifier son ampleur, comme les méthodes visuelles par microscope

ou la mesure de la redistribution de fluorochromes entre les membranes et le cytoplasme des deux types cellulaires ¹⁶⁸. Par la suite, un gène rapporteur, lacZ de E. coli en fusion avec le promoteur T7, a été utilisé dans un système où le second type cellulaire était infecté avec le virus de la vaccine encodant la polymérase T7 ¹⁶⁹. Le gène de la luciférase comme gène rapporteur, dont l'activité est facilement mesurable et donne généralement un rendement avantageux entre le signal et le bruit de fond, a été utilisé par d'autres dans le contexte de l'entrée du VIH ¹⁷⁰.

Les détails du test utilisé sont décrits plus haut. Les cellules choisies ont permis de procéder par transfections avec les vecteurs d'expression des récepteurs. Les résultats obtenus avec les lignées 293T-CCR5 et 293T-CXCR4 par cytofluorométrie montrent que leurs caractéristiques sont probablement plus avantageuses pour l'expression transitoire que pour l'expression stable de gènes transfectés, particulièrement dans un système qui doit permettre de détecter des différences non-optimales, par exemple dans l'effet de certaines mutations. Il est possible que la sélection de clones d'après les taux d'expression du récepteur aurait permis d'obtenir des populations plus homogènes ou des niveaux d'expression plus élevés. Par contre, il n'y avait pas réellement d'indication que les niveaux obtenus (Figure 9. et 10.) n'étaient pas suffisants pour l'utilisation prévue. Par exemple, bien que la détection de la fusion de cellules doit dépendre d'une concentration minimale du CD4 et du récepteur de chimiokine, il a été démontré que la concentration du corécepteur requise pour l'infection est plus faible si celle du CD4 à la surface de la cellule est relativement élevée ¹⁵⁸. L'analyse des transfections transitoires avec un vecteur d'expression du CD4 donnait de façon reproductible une intensité de plus de 1 log au-dessus du contrôle négatif. La fusion a donc été mesurée dans les conditions décrites, avec les cellules 293T-CXCR4.

Selon les résultats obtenus, il y a activation du LTR au-dessus du niveau du contrôle négatif lorsque les deux récepteurs sont présents sur les cellules cibles mais un niveau intermédiaire est obtenu, après une certaine durée de coincubation, en présence du CD4 seulement ou du CXCR4 seulement. Ceci suggère un niveau basal de fusion des deux types cellulaires ou, en comparaison, un trop faible niveau d'activation du LTR dans les conditions optimales, bien qu'une différence de près de 1 log a été mesurée entre l'activation avec des cellules qui exprimaient le CXCR4 et le CD4 et celles n'exprimant

aucun des récepteurs viraux (Figure 13.). La différence entre le cas où ces deux molécules sont absentes de la surface de la cellule et celui où un seul des deux corécepteurs est présent suggère qu'il n'y a pas d'activation du LTR par la relâche du facteur Tat par les cellules effectrices, dans ces conditions. Une meilleure induction aurait peut-être pu être observée avec une plus faible quantité du gène rapporteur car les niveaux basaux d'activation en absence de Tat étaient comparables à ceux d'un promoteur efficace. Il est possible que cet effet soit dû à la réplication de cette construction à un nombre de copies élevé dans ce type cellulaire.

Le gène de la luciférase en fusion avec LTR a été utilisé auparavant dans le contexte de l'activation de la transcription de gènes viraux. Par exemple, le clone Jurkat 1G5, porteur de cette construction, a été sélectionné pour l'étude de facteurs ou conditions activant le LTR du VIH, dont l'activation par la protéine Tat ¹⁷¹. Ce type de construction a servi, par exemple, à démontrer un effet inhibiteur, sur la transcription des gènes viraux, de la ligation du CD4 par des virions du VIH ¹⁷². Récemment, un système d'infection de cellules 293T exprimant le CD4 de façon transitoire a aussi été caractérisé avec le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur LTR du VIH ¹⁷³.

Les lignées 293T-CXCR4 et -CCR5 seraient peut-être utilisables dans d'autres conditions. Par exemple, les cellules effectrices de la lignée HL2/3 ont peut-être des caractéristiques qui ne permettent pas d'obtenir un rendement optimal dans ce test et le choix de méthodes alternatives pourrait être avantageux. Une alternative possible serait de les remplacer, dans le test de fusion, par des virions qui auraient une plus grande concentration de la protéine de surface. L'infection par un virus pseudotypé avec gp160 permettrait de contrôler ce paramètre ou encore de comparer plus d'une de ces protéines dans le cadre de l'étude de l'entrée du VIH.

Les expériences décrites ici furent initialement proposées pour l'identification de régions ou résidus du CD4 qui seraient impliqués à des étapes subséquentes à la liaison de Env à ce récepteur, dans le mécanisme d'entrée. Ces régions de la molécule pourraient interagir avec un corécepteur ou être nécessaire pour l'induction d'un changement conformationnel de la protéine virale, par exemple. Une approche par immunoprécipitation

avait été choisie comme moyen pour mettre en évidence une relation de ce type, entre des déterminants structuraux et un effet mesurable sur l'infection.

Tel que mentionné précédemment, la région CDR2 du domaine D1 du CD4, de même probablement que d'autres résidus du domaine D1, est directement mise en contact avec gp120. Différentes études ont trouvé des séquences du récepteur qui semblent importantes pour l'infection tout en étant situées hors du site d'interaction avec la protéine virale. Une région qui a fait l'objet de travaux détaillés est la boucle CDR3 dans le domaine D1. Par exemple, dans le cadre de l'étude de mutants ponctuels de cette région, la mutation E87G, correspondant au résidu 87 du CD4 de chimpanzé, semblait être inhibitrice de la formation de syncytia¹⁷⁴. D'autres résultats ont contredit ceux-ci et ont montré que les mutations inhibitrices dans la région CDR3 étaient celles qui inhibaient aussi la liaison de gp120¹⁷⁵. Une autre région d'intérêt est la boucle charnière entre les domaines D2 et D3 (introduction) qui donne une flexibilité à la molécule. Certaines observations faites avec des anticorps seraient peut-être mieux expliquées si cette région avait un rôle à jouer dans le processus d'entrée du VIH. C'est le cas de données obtenues avec les clones Q425 et Q428 qui se lient au domaine D3 et empêchent l'infection du virus mais pas la liaison de gp120¹⁷⁶. Il existe d'autres exemples de mutations dont les effets sont mal compris et des travaux plus approfondis, maintenant que les seconds récepteurs sont connus, pourraient donner une meilleure compréhension des aspects moléculaires de l'entrée du virus.

CCR5 de macaque "pigtail"

Étant le corécepteur principalement impliqué dans la transmission du VIH, le polymorphisme du CCR5 est d'un intérêt particulier. La présence d'un allèle différent peut influencer différents paramètres de l'infection. La délétion $\Delta 32$, dont la présence à l'état hétérozygote ou homozygote est liée à une plus lente progression ou à une résistance à l'infection par le VIH, respectivement, en est un exemple (introduction). Ce récepteur a la même propriété chez le primate *Macaca nemestrina*, puisque le CCR5 est le corécepteur

principal pour les différentes souches de SIV¹⁷⁷. Les travaux décrits ici ont porté sur un individu qui, en apparence, était hétérozygote pour une importante mutation de ce gène. La caractérisation de la mutation a été faite sur deux clones obtenus suite à l'amplification de la séquence de l'ADNc. Il était nécessaire de vérifier la présence de cette mutation à partir d'échantillons de l'ADN génomique du même macaque pour exclure un effet de PCR ou, par exemple, l'amplification d'une séquence contaminante. L'amplification des deux fragments, uniquement chez le macaque 100-95, a été reproduite plusieurs fois à partir de l'échantillon d'ADNc. La probabilité qu'un artefact soit produit durant la réaction de RT-PCR semble faible étant donné l'absence d'amplification à cette étape. L'utilisation d'amorces différentes sur le même échantillon aurait pu servir à déterminer s'il s'agissait d'un artefact créé par le mauvais appariement des oligonucléotides avec la séquence cible. Cette hypothèse est appuyée par la présence d'une répétition directe de sept nucléotides dans le gène du CCR5 (Figure 5., séquence soulignée), car elle est comprise dans le site d'hybridation de l'amorce CCR5-3', et correspond, plus précisément, à la séquence qui s'hybride à la partie 3' de cet oligonucléotide. Il est donc possible que la température ne soit pas assez restrictive pour empêcher l'hybridation à la répétition interne de la séquence heptanucléotidique, et la polymérisation à partir de cette séquence au lieu de celle en 3'. Par contre, cela ne concorde pas avec l'absence de bandes secondaires avec les échantillons des autres individus, alors que les réactions de PCR étaient toutes effectuées simultanément et dans les mêmes conditions. L'impossibilité de détecter le même phénomène à partir de l'échantillon d'ADN génomique laisse supposer qu'il ne s'agit pas d'un cas de polymorphisme ou d'hétérozygote.

Une délétion de 24 nucléotides ($\Delta 24$) dans le gène de CCR5 a été démontrée depuis, chez deux sous-espèces de primates (*Cercocebus torquatus atys* et *Cercocebus torquatus torquatus*, "sooty" et "red-capped mangabey")^{178; 179}. De même que pour $\Delta 32$, cette mutation crée un récepteur non-fonctionnel qui n'est pas exprimé à la surface de la cellule¹⁷⁸, probablement à cause d'un raccourcissement trop important de la quatrième région transmembranaire, où se situe la modification. Chez une de ces sous-espèces la fréquence allélique a été évaluée à 86%¹⁷⁹, avec une majorité d'individus homozygotes, ce qui n'est pas comparable à la fréquence de la mutation $\Delta 32$ qui se situe à près de 10% (introduction). La présence de l'infection d'un des singes homozygotes pour $\Delta 24$ avec une

souche de type SIVrcm de tropisme R2b (dont le principal corécepteur est CCR2b), qui n'est pas pathogène chez son hôte naturel, a des implications importantes sur les pressions sélectives créées par les mutations qui abolissent l'expression du récepteur¹⁷⁹. La présence d'une mutation donnant ce phénotype chez un macaque aurait pu apporter des explications ou hypothèses quant aux raisons de l'apparente accumulation de mutations de perte de fonction chez ce récepteur et chez différentes espèces de primates, d'autant plus que les macaques comprennent plusieurs espèces généralement préférées pour les études sur l'infection par le SIV. L'apparition des mutations $\Delta 24$ et $\Delta 32$ chez les deux espèces concernées n'est probablement pas coïncidente dans le temps, du moins selon certaines estimations qui placent la mutation du gène humain à une date plus récente, et celle du CCR5 du singe "red-capped mangabey" à un moment suivant de peu la séparation de cette sous-espèce^{179; 180}. L'infection de macaques avec le VIH-1 ou le VIH-2 ou des souches de SIV peut produire le même type de pathologie que le VIH chez l'être humain, et la présence d'une délétion du CCR5 chez ces primates serait une occasion d'étudier la sélection de souches virales dans un contexte *in vivo*. Ceci pourrait fournir des indices, par exemple, sur les raisons du changement phénotypique viral qui coïncide chez l'être humain avec une progression vers un stade d'immunodéficience.

Bibliographie

1. Coffin, J.M.(1990) Retroviridae and their replication. Dans B.N. Fields, D.M. Knipe et al. (Editeurs), *Virology* (p. 1437 à 1500). New York ; Raven Press, Ltd.
2. Frankel AD, Young JA: HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu.Rev.Biochem.* 1998;67:1-25:1-25
3. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS: Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* 1997;89:263-273
4. Freed EO, Martin MA: The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection. *J Biol Chem* 1995;270:23883-23886
5. Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC: Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 1997;387:426-430
6. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA: Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 1998;393:648-659
7. Earl PL, Moss B, Doms RW: Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol.* 1991;65:2047-2055
8. Earl PL, Doms RW, Moss B: Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:648-652
9. Broder CC, Earl PL, Long D, Abedon ST, Moss B, Doms RW: Antigenic implications of human immunodeficiency virus type 1 envelope quaternary structure: oligomer-specific and -sensitive monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11699-11703
10. Sattentau QJ, Moore JP: Human immunodeficiency virus type 1 neutralization is determined by epitope exposure on the gp120 oligomer. *J Exp Med* 1995;182:185-196
11. Stamatatos L, Cheng-Mayer C: Structural modulations of the envelope gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 upon oligomerization and differential V3 loop epitope exposure of isolates displaying distinct tropism upon virion-soluble receptor binding. *J Virol.* 1995;69:6191-6198

12. Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR: Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 1991;253:71-74
13. Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J: CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 1996;384:179-183
14. Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ, Moore JP: CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 1996;384:184-187
15. Stamatatos L, Wiskerchen M, Cheng-Mayer C: Effect of major deletions in the V1 and V2 loops of a macrophage-tropic HIV type 1 isolate on viral envelope structure, cell entry, and replication. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 1998;14:1129-1139
16. Koito A, Harrowe G, Levy JA, Cheng-Mayer C: Functional role of the V1/V2 region of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120 in infection of primary macrophages and soluble CD4 neutralization. *J Virol.* 1994;68:2253-2259
17. Wyatt R, Moore J, Accola M, Desjardin E, Robinson J, Sodroski J: Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding. *J Virol.* 1995;69:5723-5733
18. Rizzuto CD, Wyatt R, Hernandez-Ramos N, Sun Y, Kwong PD, Hendrickson WA, Sodroski J: A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 1998;280:1949-1953
19. Tremblay MJ, Fortin JF, Cantin R: The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunol.Today* 1998;19:346-351
20. Henderson LE, Sowder R, Copeland TD, Oroszlan S, Arthur LO, Robey WG, Fischinger PJ: Direct identification of class II histocompatibility DR proteins in preparations of human T-cell lymphotropic virus type III. *J Virol.* 1987;61:629-632
21. Thali M, Bukovsky A, Kondo E, Rosenwirth B, Walsh CT, Sodroski J, Gottlinger HG: Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 1994;372:363-365
22. Fortin JF, Cantin R, Lamontagne G, Tremblay M: Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are

- biologically active and enhance viral infectivity. *J.Virol.* 1997;71:3588-3596
23. Brady RL, Barclay AN: The structure of CD4. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1996;205:1-18:1-18
 24. Wang JH, Yan YW, Garrett TP, Liu JH, Rodgers DW, Garlick RL, Tarr GE, Husain Y, Reinherz EL, Harrison SC: Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature* 1990;348:411-418
 25. Ryu SE, Kwong PD, Truneh A, Porter TG, Arthos J, Rosenberg M, Dai XP, Xuong NH, Axel R, Sweet RW: Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature* 1990;348:419-426
 26. Garrett TP, Wang J, Yan Y, Liu J, Harrison SC: Refinement and analysis of the structure of the first two domains of human CD4. *J Mol.Biol* 1993;234:763-778
 27. Brady RL, Dodson EJ, Dodson GG, Lange G, Davis SJ, Williams AF, Barclay AN: Crystal structure of domains 3 and 4 of rat CD4: relation to the NH₂-terminal domains. *Science* 1993;260:979-983
 28. Lange G, Lewis SJ, Murshudov GN, Dodson GG, Moody PC, Turkenburg JP, Barclay AN, Brady RL: Crystal structure of an extracellular fragment of the rat CD4 receptor containing domains 3 and 4. *Structure.* 1994;2:469-481
 29. Wu H, Kwong PD, Hendrickson WA: Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. *Nature* 1997;387:527-530
 30. Ashford DA, Alafi CD, Gamble VM, Mackay DJ, Rademacher TW, Williams PJ, Dwek RA, Barclay AN, Davis SJ, Somoza C: Site-specific glycosylation of recombinant rat and human soluble CD4 variants expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1993;268:3260-3267
 31. Marsh M, Pelchen-Matthews A: Endocytic and exocytic regulation of CD4 expression and function. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1996;205:107-35:107-135
 32. Konig R, Fleury S, Germain RN: The structural basis of CD4-MHC class II interactions: coreceptor contributions to T cell receptor antigen recognition and oligomerization-dependent signal transduction. *Curr.Top.Microbiol.Immunol* 1996;205:19-46:19-46
 33. Ravichandran KS, Collins TL, Burakoff SJ: CD4 and signal transduction. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1996;205:47-62:47-62

34. Xu H, Littman DR: A kinase-independent function of Lck in potentiating antigen-specific T cell activation. *Cell* 1993;74:633-643
35. Killeen N, Littman DR: The regulation and function of the CD4 coreceptor during T lymphocyte development. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1996;205:89-106:89-106
36. Garcia JV, Miller AD: Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 1991;350:508-511
37. Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D: Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 1994;76:853-864
38. Grzesiek S, Stahl SJ, Wingfield PT, Bax A: The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* 1996;35:10256-10261
39. Rhee SS, Marsh JW: Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced downmodulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4. *J Virol.* 1994;68:5156-5163
40. Jabbar MA, Nayak DP: Intracellular interaction of human immunodeficiency virus type 1 (ARV- 2) envelope glycoprotein gp160 with CD4 blocks the movement and maturation of CD4 to the plasma membrane. *J Virol.* 1990;64:6297-6304
41. Crise B, Rose JK: Human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor retains a CD4-p56lck complex in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 1992;66:2296-2301
42. Lenburg ME, Landau NR: Vpu-induced degradation of CD4: requirement for specific amino acid residues in the cytoplasmic domain of CD4. *J Virol.* 1993;67:7238-7245
43. Siliciano RF: The role of CD4 in HIV envelope-mediated pathogenesis. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 1996;205:159-79:159-179
44. Ward SG, Westwick J: Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *Biochem.J.* 1998;333:457-470
45. Ward SG, Bacon K, Westwick J: Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. *Immunity* 1998;9:1-11
46. Wells TN, Power CA, Proudfoot AE: Definition, function and pathophysiological significance of chemokine receptors. *Trends Pharmacol.Sci.* 1998;19:376-380

47. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A: Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 1997;277:2005-2007
48. Choe H, Martin KA, Farzan M, Sodroski J, Gerard NP, Gerard C: Structural interactions between chemokine receptors, gp120 Env and CD4. *Semin.Immunol.* 1998;10:249-257
49. Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B: Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J.Biol.Chem.* 1994;269:232-237
50. Caruz A, Samsom M, Alonso JM, Alcamí J, Baleux F, Virelizier JL, Parmentier M, Arenzana-Seisdedos F: Genomic organization and promoter characterization of human CXCR4 gene. *FEBS Lett.* 1998;426:271-278
51. Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M: Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 1996;35:3362-3367
52. Mummidi S, Ahuja SS, McDaniel BL, Ahuja SK: The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and noncoding exons. *J.Biol.Chem.* 1997;272:30662-30671
53. Berson JF, Doms RW: Structure-function studies of the HIV-1 coreceptors. *Semin.Immunol.* 1998;10:237-248
54. Nagasawa T, Tachibana K, Kishimoto T: A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. *Semin.Immunol.* 1998;10:179-185
55. Federspiel B, Melhado IG, Duncan AM, Delaney A, Schappert K, Clark-Lewis I, Jirik FR: Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics* 1993;16:707-712
56. Albright AV, Shieh JC, Itoh T, Lee B, Pleasure D, O'Connor MJ, Doms RW, Gonzalez-Scarano F: Microglia express CCR5, CXCR4, and CCR3, but of these, CCR5 is the principal coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 dementia isolates. *J.Virol.* 1999;73:205-213
57. Lavi E, Strizki JM, Ulrich AM, Zhang W, Fu L, Wang Q, O'Connor M, Hoxie JA, Gonzalez-Scarano F: CXCR-4 (Fusin), a co-receptor for the type 1 human immunodeficiency virus (HIV-1), is expressed in the human brain in a variety of cell types, including microglia and neurons. *Am.J.Pathol.* 1997;151:1035-1042

58. Gabuzda D, He J, Ohagen A, Vallat AV: Chemokine receptors in HIV-1 infection of the central nervous system. *Semin.Immunol.* 1998;10:203-213
59. Hesselgesser J, Halks-Miller M, DelVecchio V, Peiper SC, Hoxie J, Kolson DL, Taub D, Horuk R: CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr.Biol.* 1997;7:112-121
60. Feil C, Augustin HG: Endothelial cells differentially express functional CXC-chemokine receptor-4 (CXCR-4/fusin) under the control of autocrine activity and exogenous cytokines. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1998;247:38-45
61. Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM: Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J.Biol.Chem.* 1998;273:4282-4287
62. Forster R, Kremmer E, Schubel A, Breitfeld D, Kleinschmidt A, Nerl C, Bernhardt G, Lipp M: Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J.Immunol.* 1998;160:1522-1531
63. Hori T, Sakaida H, Sato A, Nakajima T, Shida H, Yoshie O, Uchiyama T: Detection and delineation of CXCR-4 (fusin) as an entry and fusion cofactor for T cell-tropic HIV-1 by three different monoclonal antibodies. *J.Immunol.* 1998;160:180-188
64. Yi Y, Rana S, Turner JD, Gaddis N, Collman RG: CXCR-4 is expressed by primary macrophages and supports CCR5- independent infection by dual-tropic but not T-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 1998;72:772-777
65. Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, Manischewitz J, Golding H: Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat.Med* 1997;3:1369-1375
66. Berkowitz RD, Beckerman KP, Schall TJ, McCune JM: CXCR4 and CCR5 expression delineates targets for HIV-1 disruption of T cell differentiation. *J.Immunol.* 1998;161:3702-3710
67. Kitchen SG, Zack JA: CXCR4 expression during lymphopoiesis: implications for human immunodeficiency virus type 1 infection of the thymus. *J.Virol.* 1997;71:6928-6934

68. Deichmann M, Kronenwett R, Haas R: Expression of the human immunodeficiency virus type-1 coreceptors CXCR- 4 (fusin, LESTR) and CKR-5 in CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1997;89:3522-3528
69. Ruiz ME, Cicala C, Arthos J, Kinter A, Catanzaro AT, Adelsberger J, Holmes KL, Cohen OJ, Fauci AS: Peripheral blood-derived CD34+ progenitor cells: CXC chemokine receptor 4 and CC chemokine receptor 5 expression and infection by HIV. *J.Immunol.* 1998;161:4169-4176
70. Zaitseva MB, Lee S, Rabin RL, Tiffany HL, Farber JM, Peden KW, Murphy PM, Golding H: CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV- 1 infection. *J.Immunol.* 1998;161:3103-3113
71. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR: The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997;94:1925-1930
72. Riley JL, Levine BL, Craighead N, Francomano T, Kim D, Carroll RG, June CH: Naive and memory CD4 T cells differ in their susceptibilities to human immunodeficiency virus type 1 infection following CD28 costimulation: implicatip6s for transmission and pathogenesis. *J.Virol.* 1998;72:8273-8280
73. Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF: Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1 alpha. *J.Biol.Chem.* 1996;271:17161-17166
74. Mo H, Monard S, Pollack H, Ip J, Rochford G, Wu L, Hoxie J, Borkowsky W, Ho DD, Moore JP: Expression patterns of the HIV type 1 coreceptors CCR5 and CXCR4 on CD4+ T cells and monocytes from cord and adult blood. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 1998;14:607-617
75. Naif HM, Li S, Alali M, Sloane A, Wu L, Kelly M, Lynch G, Lloyd A, Cunningham AL: CCR5 expression correlates with susceptibility of maturing monocytes to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J.Virol.* 1998;72:830-836
76. Tuttle DL, Harrison JK, Anders C, Sleasman JW, Goodenow MM: Expression of CCR5 increases during monocyte differentiation and directly mediates macrophage susceptibility to infection by human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 1998;72:4962-4969
77. Wang J, Roderiquez G, Oravec T, Norcross MA: Cytokine regulation of human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. *J.Virol.* 1998;72:7642-7647

78. Kutza J, Hayes MP, Clouse KA: Interleukin-2 inhibits HIV-1 replication in human macrophages by modulating expression of CD4 and CC-chemokine receptor-5. *AIDS* 1998;12:F59-F64
79. Hariharan D, Douglas SD, Lee B, Lai JP, Campbell DE, Ho WZ: Interferon-gamma Upregulates CCR5 Expression in Cord and Adult Blood Mononuclear Phagocytes. *Blood* 1999;93:1137-1144
80. Sozzani S, Ghezzi S, Iannolo G, Luini W, Borsatti A, Polentarutti N, Sica A, Locati M, Mackay C, Wells TN, Biswas P, Vicenzi E, Poli G, Mantovani A: Interleukin 10 increases CCR5 expression and HIV infection in human monocytes. *J.Exp.Med* 1998;187:439-444
81. Wu L, Paxton WA, Kassam N, Ruffing N, Rottman JB, Sullivan N, Choe H, Sodroski J, Newman W, Koup RA, Mackay CR: CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J.Exp.Med* 1997;185:1681-1691
82. Carroll RG, Riley JL, Levine BL, Feng Y, Kaushal S, Ritchey DW, Bernstein W, Weislow OS, Brown CR, Berger EA, June CH, St: Differential regulation of HIV-1 fusion cofactor expression by CD28 costimulation of CD4+ T cells. *Science* 1997;276:273-276
83. Carroll RG, Riley JL, Levine BL, Blair PJ, St Louis DC, June CH: The role of co-stimulation in regulation of chemokine receptor expression and HIV-1 infection in primary T lymphocytes. *Semin.Immunol.* 1998;10:195-202
84. He J, Chen Y, Farzan M, Choe H, Ohagen A, Gartner S, Busciglio J, Yang X, Hofmann W, Newman W, Mackay CR, Sodroski J, Gabuzda D: CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* 1997;385:645-649
85. Bacon KB, Premack BA, Gardner P, Schall TJ: Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science* 1995;269:1727-1730
86. Dairaghi DJ, Soo KS, Oldham ER, Premack BA, Kitamura T, Bacon KB, Schall TJ: RANTES-induced T cell activation correlates with CD3 expression. *J Immunol* 1998;160:426-433
87. Davis CB, Dikic I, Unutmaz D, Hill CM, Arthos J, Siani MA, Thompson DA, Schlessinger J, Littman DR: Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J.Exp.Med* 1997;186:1793-1798
88. Wong M, Fish EN: RANTES and MIP-1alpha activate stats in T cells. *J.Biol.Chem.* 1998;273:309-314

89. Haribabu B, Richardson RM, Fisher I, Sozzani S, Peiper SC, Horuk R, Ali H, Snyderman R: Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J.Biol.Chem.* 1997;272:28726-28731
90. Tarasova NI, Stauber RH, Michejda CJ: Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXC-chemokine receptor 4. *J.Biol.Chem.* 1998;273:15883-15886
91. Ganju RK, Brubaker SA, Meyer J, Dutt P, Yang Y, Qin S, Newman W, Groopman JE: The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J.Biol.Chem.* 1998;273:23169-23175
92. Baggiolini M, Dewald B, Moser B: Human chemokines: an update. *Annu.Rev.Immunol.* 1997;15:675-705:675-705
93. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T: Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996;382:635-638
94. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T: The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998;393:591-594
95. Cook DN, Beck MA, Coffman TM, Kirby SL, Sheridan JF, Pragnell IB, Smithies O: Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science* 1995;269:1583-1585
96. Zhou Y, Kurihara T, Ryseck RP, Yang Y, Ryan C, Loy J, Warr G, Bravo R: Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J.Immunol.* 1998;160:4018-4025
97. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P: Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995;270:1811-1815
98. Paxton WA, Martin SR, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, VanDevanter NL, Padian N, Braun JF, Kotler DP, Wolinsky SM, Koup RA: Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure. *Nat.Med* 1996;2:412-417

99. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872-877
100. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J: The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996;85:1135-1148
101. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA: CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996;272:1955-1958
102. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR: Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996;381:661-666
103. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA: HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996;381:667-673
104. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW: A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996;85:1149-1158
105. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA: The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996;382:829-833
106. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B: The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996;382:833-835
107. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P: The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat.Med* 1996;2:1244-1247
108. Liao F, Alkhatib G, Peden KW, Sharma G, Berger EA, Farber JM: STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J.Exp.Med* 1997;185:2015-2023
109. Farzan M, Choe H, Martin K, Marcon L, Hofmann W, Karlsson G, Sun Y, Barrett P, Marchand N, Sullivan N, Gerard N, Gerard C, Sodroski J: Two orphan

- seven-transmembrane segment receptors which are expressed in CD4-positive cells support simian immunodeficiency virus infection. *J.Exp.Med* 1997;186:405-411
110. Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR: Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 1997;388:296-300
 111. Pleskoff O, Treboute C, Brelot A, Heveker N, Seman M, Alizon M: Identification of a chemokine receptor encoded by human cytomegalovirus as a cofactor for HIV-1 entry. *Science* 1997;276:1874-1878
 112. Choe H, Farzan M, Konkel M, Martin K, Sun Y, Marcon L, Cayabyab M, Berman M, Dorf ME, Gerard N, Gerard C, Sodroski J: The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 1998;72:6113-6118
 113. Horuk R, Hesselgesser J, Zhou Y, Faulds D, Halks-Miller M, Harvey S, Taub D, Samson M, Parmentier M, Rucker J, Doranz BJ, Doms RW: The CC chemokine I-309 inhibits CCR8-dependent infection by diverse HIV-1 strains. *J.Biol.Chem.* 1998;273:386-391
 114. Owman C, Garzino-Demo A, Cocchi F, Popovic M, Sabirsh A, Gallo RC: The leukotriene B4 receptor functions as a novel type of coreceptor mediating entry of primary HIV-1 isolates into CD4-positive cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998;95:9530-9534
 115. Martin V, Ronde P, Unett D, Wong A, Hoffman TL, Edinger AL, Doms RW, Funk CD: Leukotriene binding, signaling, and analysis of HIV coreceptor function in mouse and human leukotriene B4 receptor-transfected cells. *J Biol Chem* 1999;274:8597-8603
 116. Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, Ahuja M, Turner JD, McKnight A, Thomas JF, Stoebenau-Haggarty B, Choe S, Vance PJ, Wells TN, Power CA, Sutterwala SS, Doms RW, Landau NR, Hoxie JA: CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* 1996;87:745-756
 117. Potempa S, Picard L, Reeves JD, Wilkinson D, Weiss RA, Talbot SJ: CD4-independent infection by human immunodeficiency virus type 2 strain ROD/B: the role of the N-terminal domain of CXCR-4 in fusion and entry. *J.Virol.* 1997;71:4419-4424
 118. Dumonceaux J, Nisole S, Chanel C, Quivet L, Amara A, Baleux F, Briand P, Hazan U: Spontaneous mutations in the env gene of the human immunodeficiency virus type 1 NDK isolate are associated with a CD4-independent entry phenotype. *J.Virol.* 1998;72:512-519

119. Edinger AL, Mankowski JL, Doranz BJ, Margulies BJ, Lee B, Rucker J, Sharron M, Hoffman TL, Berson JF, Zink MC, Hirsch VM, Clements JE, Doms RW: CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997;94:14742-14747
120. Martin KA, Wyatt R, Farzan M, Choe H, Marcon L, Desjardins E, Robinson J, Sodroski J, Gerard C, Gerard NP: CD4-independent binding of SIV gp120 to rhesus CCR5. *Science* 1997;278:1470-1473
121. Lu Z, Berson JF, Chen Y, Turner JD, Zhang T, Sharron M, Jenks MH, Wang Z, Kim J, Rucker J, Hoxie JA, Peiper SC, Doms RW: Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997;94:6426-6431
122. Doranz BJ, Orsini MJ, Turner JD, Hoffman TL, Berson JF, Hoxie JA, Peiper SC, Brass LF, Doms RW: Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine receptor functions. *J Virol.* 1999;73:2752-2761
123. Farzan M, Choe H, Martin KA, Sun Y, Sidelko M, Mackay CR, Gerard NP, Sodroski J, Gerard C: HIV-1 entry and macrophage inflammatory protein-1beta-mediated signaling are independent functions of the chemokine receptor CCR5. *J.Biol.Chem.* 1997;272:6854-6857
124. Gosling J, Monteclaro FS, Atchison RE, Arai H, Tsou CL, Goldsmith MA, Charo IF: Molecular uncoupling of C-C chemokine receptor 5-induced chemotaxis and signal transduction from HIV-1 coreceptor activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997;94:5061-5066
125. Rucker J, Samson M, Doranz BJ, Libert F, Berson JF, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Broder CC, Vassart G, Doms RW, Parmentier M: Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. *Cell* 1996;87:437-446
126. Atchison RE, Gosling J, Monteclaro FS, Franci C, Digilio L, Charo IF, Goldsmith MA: Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: dissociation from response to chemokines. *Science* 1996;274:1924-1926
127. Bieniasz PD, Fridell RA, Aramori I, Ferguson SS, Caron MG, Cullen BR: HIV-1-induced cell fusion is mediated by multiple regions within both the viral envelope and the CCR-5 co-receptor. *EMBO J.* 1997;16:2599-2609
128. Hill CM, Kwon D, Jones M, Davis CB, Marmon S, Daugherty BL, DeMartino JA, Springer MS, Unutmaz D, Littman DR: The amino terminus of human CCR5 is required for its function as a receptor for diverse human and simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Virology* 1998;248:357-371

129. Edinger AL, Amedee A, Miller K, Doranz BJ, Endres M, Sharron M, Samson M, Lu ZH, Clements JE, Murphey-Corb M, Peiper SC, Parmentier M, Broder CC, Doms RW: Differential utilization of CCR5 by macrophage and T cell tropic simian immunodeficiency virus strains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1997;94:4005-4010
130. Doranz BJ, Lu ZH, Rucker J, Zhang TY, Sharron M, Cen YH, Wang ZX, Guo HH, Du JG, Accavitti MA, Doms RW, Peiper SC: Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 1997;71:6305-6314
131. Farzan M, Choe H, Vaca L, Martin K, Sun Y, Desjardins E, Ruffing N, Wu L, Wyatt R, Gerard N, Gerard C, Sodroski J: A tyrosine-rich region in the N terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp120 and CCR5. *J.Virol.* 1998;72:1160-1164
132. Farzan M, Mirzabekov T, Kolchinsky P, Wyatt R, Cayabyab M, Gerard NP, Gerard C, Sodroski J, Choe H: Tyrosine sulfation of the amino terminus of CCR5 facilitates HIV-1 entry. *Cell* 1999;96:667-676
133. Mondor I, Moulard M, Ugolini S, Klasse PJ, Hoxie J, Amara A, Delaunay T, Wyatt R, Sodroski J, Sattentau QJ: Interactions among HIV gp120, CD4, and CXCR4: dependence on CD4 expression level, gp120 viral origin, conservation of the gp120 COOH- and NH2-termini and V1/V2 and V3 loops, and sensitivity to neutralizing antibodies. *Virology* 1998;248:394-405
134. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR: Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996;86:367-377
135. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M: Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996;382:722-725
136. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ: Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 1996;273:1856-1862

137. Biti R, Ffrench R, Young J, Bennetts B, Stewart G, Liang T: HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat.Med* 1997;3:252-253
138. O'Brien TR, Winkler C, Dean M, Nelson JA, Carrington M, Michael NL, White GC: HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 delta 32. *Lancet* 1997;349:1219
139. Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT: Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32. *J.Biol.Chem.* 1997;272:30603-30606
140. Paxton WA, Kang S: Chemokine receptor allelic polymorphisms: relationships to HIV resistance and disease progression. *Semin.Immunol.* 1998;10:187-194
141. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR: Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *J.Exp.Med* 1997;185:621-628
142. Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K, Hilgartner MW, O'Brien SJ: Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* 1997;277:959-965
143. Kostrikis LG, Huang Y, Moore JP, Wolinsky SM, Zhang L, Guo Y, Deutsch L, Phair J, Neumann AU, Ho DD: A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat.Med* 1998;4:350-353
144. Quillent C, Oberlin E, Braun J, Rousset D, Gonzalez-Canali G, Metais P, Montagnier L, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Beretta A: HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet* 1998;351:14-18
145. Winkler C, Modi W, Smith MW, Nelson GW, Wu X, Carrington M, Dean M, Honjo T, Tashiro K, Yabe D, Buchbinder S, Vittinghoff E, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Detels R, Donfield S, Willoughby A, Gomperts E, Vlahov D, Phair J, O'Brien SJ: Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science* 1998;279:389-393
146. Weissman D, Rabin RL, Arthos J, Rubbert A, Dybul M, Swofford R, Venkatesan S, Farber JM, Fauci AS: Macrophage-tropic HIV and SIV envelope proteins

- induce a signal through the CCR5 chemokine receptor. *Nature* 1997;389:981-985
147. Madani N, Kozak SL, Kavanaugh MP, Kabat D: gp120 envelope glycoproteins of human immunodeficiency viruses competitively antagonize signaling by coreceptors CXCR4 and CCR5. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998;95:8005-8010
 148. Wang JM, Ueda H, Howard OM, Grimm MC, Chertov O, Gong X, Gong W, Resau JH, Broder CC, Evans G, Arthur LO, Ruscetti FW, Oppenheim JJ: HIV-1 envelope gp120 inhibits the monocyte response to chemokines through CD4 signal-dependent chemokine receptor down-regulation. *J.Immunol.* 1998;161:4309-4317
 149. Berndt C, Mopps B, Angermuller S, Gierschik P, Krammer PH: CXCR4 and CD4 mediate a rapid CD95-independent cell death in CD4(+) T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1998;95:12556-12561
 150. Herbein G, Mahlknecht U, Batliwalla F, Gregersen P, Pappas T, Butler J, O'Brien WA, Verdin E: Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature* 1998;395:189-194
 151. Hesselgesser J, Taub D, Baskar P, Greenberg M, Hoxie J, Kolson DL, Horuk R: Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 alpha is mediated by the chemokine receptor CXCR4. *Curr.Biol.* 1998;8:595-598
 152. Ohagen A, Ghosh S, He J, Huang K, Chen Y, Yuan M, Osathanondh R, Gartner S, Shi B, Shaw G, Gabuzda D: Apoptosis induced by infection of primary brain cultures with diverse human immunodeficiency virus type 1 isolates: evidence for a role of the envelope. *J.Virol.* 1999;73:897-906
 153. Heinkelein M, Sopper S, Jassoy C: Contact of human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected CD4+ T lymphocytes is highly cytolytic for both cells. *J.Virol.* 1995;69:6925-6931
 154. Ugolini S, Moulard M, Mondor I, Barois N, Demandolx D, Hoxie J, BreLOT A, Alizon M, Davoust J, Sattentau QJ: HIV-1 gp120 induces an association between CD4 and the chemokine receptor CXCR4. *J.Immunol.* 1997;159:3000-3008
 155. Golding H, Dimitrov DS, Manischewitz J, Broder CC, Robinson J, Fabian S, Littman DR, Lapham CK: Phorbol ester-induced down modulation of tailless CD4 receptors requires prior binding of gp120 and suggests a role for accessory molecules. *J.Virol.* 1995;69:6140-6148

156. Golding H, Manischewitz J, Vujcic L, Blumenthal R, Dimitrov DS: The phorbol ester phorbol myristate acetate inhibits human immunodeficiency virus type 1 envelope-mediated fusion by modulating an accessory component(s) in CD4-expressing cells. *J.Virol.* 1994;68:1962-1969
157. Lapham CK, Ouyang J, Chandrasekhar B, Nguyen NY, Dimitrov DS, Golding H: Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* 1996;274:602-605
158. Platt EJ, Wehrly K, Kuhmann SE, Chesebro B, Kabat D: Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 1998;72:2855-2864
159. Follis KE, Trahey M, LaCasse RA, Nunberg JH: Continued utilization of CCR5 coreceptor by a newly derived T-cell line- adapted isolate of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 1998;72:7603-7608
160. Kozak SL, Platt EJ, Madani N, Ferro FEJ, Peden K, Kabat D: CD4, CXCR-4, and CCR-5 dependencies for infections by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* 1997;71:873-882
161. O'Brien WA, Mao SH, Cao Y, Moore JP: Macrophage-tropic and T-cell line-adapted chimeric strains of human immunodeficiency virus type 1 differ in their susceptibilities to neutralization by soluble CD4 at different temperatures. *J Virol.* 1994;68:5264-5269
162. Brighty DW, Rosenberg M, Chen IS, Ivey-Hoyle M: Envelope proteins from clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 that are refractory to neutralization by soluble CD4 possess high affinity for the CD4 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7802-7805
163. Lapham CK, Zaitseva MB, Lee S, Romanstseva T, Golding H: Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5. *Nat.Med* 1999;5:303-308
164. Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Baggiolini M, Sykes BD, Clark-Lewis I: Solution structure and basis for functional activity of stromal cell- derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J.* 1997;16:6996-7007
165. Ciminale V, Felber BK, Campbell M, Pavlakis GN: A bioassay for HIV-1 based on Env-CD4 interaction. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 1990;6:1281-1287
166. Otten RA, Brown BG, Simon M, Lupo LD, Parekh BS, Lairmore MD, Schable CA, Schochetman G, Rayfield MA: Differential replication and pathogenic effects of HIV-1 and HIV-2 in *Macaca nemestrina*. *AIDS* 1994;8:297-306

167. Zacharova V, Zachar V, Goustin AS: Sequence of chemokine receptor gene CCR5 in chimpanzees, a natural HIV type 1 host. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 1997;13:1159-1161
168. Dimitrov DS, Golding H, Blumenthal R: Initial stages of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion monitored by a new assay based on redistribution of fluorescent dyes. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 1991;7:799-805
169. Nussbaum O, Broder CC, Berger EA: Fusogenic mechanisms of enveloped-virus glycoproteins analyzed by a novel recombinant vaccinia virus-based assay quantitating cell fusion- dependent reporter gene activation. *J.Virol.* 1994;68:5411-5422
170. Rucker J, Doranz BJ, Edinger AL, Long D, Berson JF, Doms RW: Cell-cell fusion assay to study role of chemokine receptors in human immunodeficiency virus type 1 entry. *Methods Enzymol.* 1997;288:118-33:118-133
171. Aguilar-Cordova E, Chinen J, Donehower L, Lewis DE, Belmont JW: A sensitive reporter cell line for HIV-1 tat activity, HIV-1 inhibitors, and T cell activation effects. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 1994;10:295-301
172. Berube P, Barbeau B, Cantin R, Sekaly RP, Tremblay M: Repression of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat- driven gene expression by binding of the virus to its primary cellular receptor, the CD4 molecule. *J.Virol.* 1996;70:4009-4016
173. Moir S, Boissinot M, Tremblay M, Poulin L: CD4 deletion mutants evaluated for human immunodeficiency virus type 1 infectivity in a highly efficient system of expression and detection based on LTR-dependent reporter gene activation. *J.Virol.Methods* 1997;65:209-217
174. Camerini D, Seed B: A CD4 domain important for HIV-mediated syncytium formation lies outside the virus binding site. *Cell* 1990;60:747-754
175. Broder CC, Berger EA: CD4 molecules with a diversity of mutations encompassing the CDR3 region efficiently support human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion. *J Virol.* 1993;67:913-926
176. Healey D, Dianda L, Moore JP, McDougal JS, Moore MJ, Estess P, Buck D, Kwong PD, Beverley PC, Sattentau QJ: Novel anti-CD4 monoclonal antibodies separate human immunodeficiency virus infection and fusion of CD4+ cells from virus binding. *J.Exp.Med* 1990;172:1233-1242
177. Marx PA, Chen Z: The function of simian chemokine receptors in the replication of SIV. *Semin.Immunol.* 1998;10:215-223

178. Palacios E, Digilio L, McClure HM, Chen Z, Marx PA, Goldsmith MA, Grant RM: Parallel evolution of CCR5-null phenotypes in humans and in a natural host of simian immunodeficiency virus. *Curr.Biol.* 1998;8:943-946
179. Chen Z, Kwon D, Jin Z, Monard S, Telfer P, Jones MS, Lu CY, Aguilar RF, Ho DD, Marx PA: Natural infection of a homozygous delta24 CCR5 red-capped mangabey with an R2b-tropic simian immunodeficiency virus. *J.Exp.Med* 1998;188:2057-2065
180. Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Allikmets R, Schriml L, Gerrard B, Malasky M, Ramos MD, Morlot S, Tzetis M, Oddoux C, di Giovine FS, Nasioulas G, Chandler D, Aseev M, Hanson M, Kalaydjieva L, Glavac D, Gasparini P, Dean M: Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am.J.Hum.Genet.* 1998;62:1507-1515