

Université de Montréal
Faculté de Médecine
Département de Microbiologie et Immunologie

**Rôle différentiel des cellules épithéliales intestinales
et pulmonaires dans le recrutement des cellules
Th17 vers les sites de réplication du virus de
l'immunodéficience humaine de type 1**

par

Hanane TOUIL

**Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de
l'obtention du grade de M.Sc. en microbiologie et immunologie**

Novembre 2011

© Hanane Touil, 2011

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé

**Rôle différentiel des cellules épithéliales intestinales
et pulmonaires dans le recrutement des cellules
Th17 vers les sites de réplication du virus de
l'immunodéficience humaine de type 1**

présenté par
Hanane TOUIL

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Ali Ahmad, Ph.D.
(Président-rapporteur)

Dre. Petronela Ancuta, Ph.D.
(Directrice de recherche)

Pr. Michel Roger, M.D.
(Membre de jury)

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES DES FIGURES ET DES TABLEAUX	7
Liste des abréviations.....	8
Résumé	11
Abstract.....	12
Remerciements.....	13
1. INTRODUCTION	14
1.1 Virus de l'Immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1).....	15
1.1.1 Découverte du VIH-1	15
1.1.2 La structure du VIH-1.....	16
1.1.2.1 Le génome viral du VIH-1:	18
1.1.3 Cycle de réplication :	19
1.1.3.1 Phase précoce :.....	19
1.1.3.1.1 Entrée du VIH-1	19
1.1.3.1.2 Transcription inverse et intégration.....	20
1.1.3.2 Phase tardive	21
1.1.4 La pathogenèse de l'infection à VIH-1.....	22
1.1.4.1 Phases cliniques:.....	22
1.1.4.1.1 Phase aiguë :	24
1.1.4.1.2 Phase chronique :	25
1.1.4.1.3 Phase SIDA :	25
1.2 Cellules épithéliales	27
1.2.1 Cellules épithéliales, immunité des muqueuses et infection à VIH-1	27

1.2.2	Transmission du VIH-1 à travers les muqueuses	28
1.2.2.1	Cellules épithéliales intestinales et VIH-1:	28
1.2.2.2	Cellules épithéliales pulmonaires et VIH-1 :	31
1.2.2.3	Cellules épithéliales utérines et VIH-1	32
1.2.3	Production de molécules antivirales	33
1.2.3.1	Les défensines.....	34
1.2.3.1.1	Les défensines- α	34
1.2.3.1.2	Les défensines- β	35
1.2.3.1.3	Les défensines- θ	36
1.2.4	Interaction des cellules épithéliales avec les cellules immunitaires.....	37
1.2.4.1	Neutrophiles.....	37
1.2.4.2	Cellules Th17	37
1.2.4.3	Cellules T CD8+.....	39
1.2.4.4	Chimiokines	40
1.2.4.4.1	MIP-3 α /CCL20	41
1.2.4.4.2	IL-8/CXCL8	43
1.2.5	Altération fonctionnelle des cellules épithéliales et translocation microbienne lors de l'infection à VIH-1	45
2.	Hypothèse et Objectifs.....	47
2.1	Hypothèse:.....	48
2.2	Objectifs :	48
3.	Matériel et Méthodes	49
3.1	Culture cellulaire	50

3.1.1	Cellules MAGI CD4 ⁺ CCR5 ⁺ LTR/ β -Gal ⁺	50
3.1.2	Les cellules épithéliales d'origine intestinale HT-29	50
3.1.3	Les cellules épithéliales d'origine alvéolaire A549.....	51
3.2	Cytométrie en flux	51
3.2.1	Analyse phénotypique par cytométrie en flux	52
3.3	PCR en temps réel quantitative SYBR Green	52
3.4	Souches de VIH-1 utilisées et infection	53
3.4.1	Détection des cytokines	54
3.4.2	PCR en temps réel pour la quantification de l'ADN proviral du VIH-1	54
3.5	Microscopie confocale	56
4.	Résultats	58
4.1	Rôle des cellules épithéliales intestinales et pulmonaires dans le recrutement des cellules Th17 et des neutrophiles aux sites d'inflammation.....	59
4.1.1	Production de chimiokines spécifiques pour les cellules Th17 et les neutrophiles par les cellules épithéliales intestinales et pulmonaires.....	59
4.1.2	Effet synergique de l'IL-17 et du TNF- α dans l'induction de la production de CCL20 par les cellules épithéliales intestinales et non pas alvéolaires	61
4.2	Le TNF- α et l'IL-1 β augmentent l'expression du récepteur de l'IL-17 (IL-17R) à la surface des cellules épithéliales	62
4.3	Permissivité à l'infection par le VIH-1 des cellules épithéliales intestinales <i>versus</i> pulmonaires	63
4.3.1	Analyse de l'expression du récepteur CD4 et des corécepteurs CCR5 et CXCR4 du VIH par les cellules épithéliales	63
4.3.2	Quantification de l'intégration du génome viral dans les cellules épithéliales	65
4.4	Effet du VIH-1 sur le rôle des cellules épithéliales dans l'immunité des muqueuses	

4.4.1	Effet du VIH-1 sur la production de CCL20 et CXCL8 par les cellules épithéliales intestinales <i>versus</i> alvéolaires.	66
5.	Discussion	81
5.1	Sommaire des résultats	82
5.2	Rôle des cellules épithéliales intestinales et alvéolaires dans le recrutement des lymphocytes Th17 et des neutrophiles	84
5.2.1	Les cellules épithéliales intestinales et alvéolaires produisent des chimiokines spécifiques pour les cellules Th17 et les neutrophiles	85
5.2.2	Étude de l'effet synergique de l'IL-17 et du TNF- α sur la production de chimiokines CCL20 et CXCL8.....	86
5.3	Permissivité à l'infection par le VIH-1 des cellules épithéliales intestinales <i>versus</i> alvéolaires.....	89
5.4	L'exposition des cellules épithéliales au VIH n'a pas d'effet direct sur la production de chimiokines CCL20 et CXCL8	90
6.	Bibliographie	95
7.	Annexes	113

TABLE DES MATIÈRES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figures	Page
Figure 1.....	17
Figure 2.....	19
Figure 3.....	21
Figure 4.....	23
Figure 5.....	30
Figure 6.....	68
Figure 7.....	69
Figure 8.....	70
Figure 9.....	71
Figure 10.....	72
Figure 11.....	73
Figure 12.....	74
Figure 13.....	75-76
Figure 14.....	77
Figure 15.....	78
Figure 16.....	79
Figure 17.....	80
Tableaux	Page
Tableau 1.....	41
Tableau 2.....	51
Tableau 3.....	52
Tableau 4.....	56

Liste des abréviations

Acs, anticorps
ADNc, acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNv, acide désoxyribonucléique viral linéaire
ARNm, acide ribonucléique messenger
ARNt, acide ribonucléique de transfert
CA, capsid
CAF, *cell antiviral factor*
CE, cellules épithéliales
CK, chimiokines
CMV, cytomégalovirus
DAMPs, *Damage-associated molecular pattern molecules*
DAPI, 4',6'-diamidino-2phényldindole
DC, *Dendritic Cells*
EBV, *Epstein-Barr Virus*
EC, *epithelial cells*
EDTA, acide éthylène diamine tétracétique
EGFR, *epidermal growth factor receptor*
ENV, enveloppe
FITC, *fluorescein isothiocyanate*
FMO, *Fluorescence minus one*
GalCer, galactosyl céramide
GALT, *Gut Associated Lymphoid Tissues*
GαPCRs, Protéine Gα couplée au récepteur
gp120, Glycoprotéine 120
HBD, *Human beta-defensins*
HD, *Human defensins*
HIES, *Hyper IgE Syndrome*
HIV-1, *Human immunodeficiency virus type 1*
HNP, *Human Neutrophil Protein*
HPV, *Human papilloma virus*
HRP, *horseradish peroxidase*
HTLV-III, *Human T lymphotropic virus III*

ICAM, *Intracellular adhesion molecule*
IFN, Interféron
IgA, Immunoglobuline de type A
IgG, Immunoglobuline de type G
IL, Interleukine
IN, Intégrase
LAV, *Lymphadenopathy associated virus*
LF, *Lactoférin*
LPLs, *Lamina Propria Lymphocytes*
LPS, Lipopolysaccharides
LTNP, *Long-term nonprogressors*
LTR, *Long terminal repeat*
MΦ, Macrophages
MA, Matrice
MDP, *Muramyl dipeptide*
MIP, *Macrophage inflammatory protein*
NIH, *National Institutes for Health*
NK, *Natural killer*
NLR, *NOD-like receptor*
NO, *nitric oxide*, monoxyde d'azote
PAMPs, *Pathogen-associated molecular pattern*
PE, *phycoérythrine*
PMN, Polynucléaires neutrophiles
Pol, Polymérase
PPT, *Polypurine tracts*
PR, Protéase
RAL, Raltégravir
RM, Macaque rhésus
RT, Transcriptase inverse
SDF-1, *Stromal cell-derived factor*
SIDA, Syndrome de l'immunodéficience acquise
TECK, *Thymus-expressed Chemokine*
TLR, *Toll-like receptor*
Tm, *melting temperature*

TNF, *Tumor necrosis factor*

TNFR, *TNF Receptor*

Treg, *Lymphocytes T régulatrices*

VHS, *Virus de l'herpes simplex*

Vif, *Viral infectivity factor*

VIH, *Virus de l'immunodéficience humaine*

VIS, *Virus de l'immunodéficience simienne*

Vpr, *Viral protein R*

Vpu, *Viral protein U*

Résumé : L'infection à VIH-1 est associée à une forte déplétion des lymphocytes T CD4⁺ à polarisation Th17 au niveau des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses intestinales (GALT, *gut-associated lymphoid tissues*). Ceci conduit à la translocation microbienne, qui est une cause d'activation immunitaire chronique et de progression de la maladie. Les cellules épithéliales (CE) jouent un rôle critique dans le maintien de l'intégrité et de l'homéostasie au niveau des muqueuses intestinales *via* le recrutement des cellules de l'immunité innée (*e.g.*, neutrophiles) et adaptative (*e.g.*, cellules Th17). Les neutrophiles produisent des molécules antivirales (*e.g.*, défensines- α) et ont la capacité de limiter la réplication virale au niveau des muqueuses. Les cellules Th17 jouent un double rôle lors de l'infection à VIH. Elles contribuent d'une part à la défense contre différents pathogènes opportunistes en augmentant, *via* la production d'IL-17, la capacité des CE à attirer les cellules Th17 et les neutrophiles. D'autre part, les cellules Th17 jouent un rôle délétère en tant que cibles de réplication virale et sources de cytokines pro-inflammatoires. La fréquence des cellules Th17 est diminuée dans les GALT mais pas dans les poumons des patients infectés par le VIH, suggérant qu'il existe des mécanismes différents par lesquels les cellules Th17 sont recrutées vers ces sites anatomiques. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle le VIH interfère avec la capacité des CE intestinales et non pas pulmonaires à produire des chimiokines (CK) responsables de l'attraction des cellules Th17 et des neutrophiles. Nous avons démontré que les CE intestinales et pulmonaires produisent des CK spécifiques pour les cellules Th17 (CCL20) et les neutrophiles (CXCL8) en réponse à des stimuli pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β et le TNF- α . Le TNF- α agit en synergie avec l'IL-17, un « signal de danger » récemment identifié, et augmente la capacité des CE intestinales mais pas pulmonaires à produire la chimiokine CCL20. Cette synergie s'explique par l'augmentation préférentielle de l'expression du récepteur à l'IL-17 à la surface des CE intestinales suite à la stimulation par le TNF- α . L'exposition au VIH n'affecte pas la production de CCL20 et de CXCL8 par les CE intestinales, mais altère la capacité des CE alvéolaires à produire ces chimiokines en accord avec la permissivité sélective de ces dernières à l'infection par le VIH. En conclusion, nos résultats démontrent que (i) le VIH n'interfère pas directement avec la capacité des CE intestinales à recruter des cellules Th17 et des neutrophils et que (ii) la production de CCL20 par ces cellules est dépendantes de la synergie entre le TNF- α et l'IL-17. Ainsi, la déplétion des cellules Th17 et la pénurie en IL-17 dans les GALT des sujets infectés pourrait causer de façon préférentielle des altérations fonctionnelles au niveau des CE intestinales, se traduisant par l'altération du recrutement des cellules Th17 en réponse au CCL20.

Abstract

The HIV-1 infection is associated with a severe loss of CD4⁺ T-cells with Th17 polarization from the gut-associated lymphoid tissues (GALT). These alterations lead to microbial translocation, which is a cause of chronic immune activation and disease progression in HIV-infected subjects. Epithelial cells (EC) play a critical role in maintaining mucosal integrity and homeostasis in the GALT by mechanisms including recruitment of innate (*e.g.*, neutrophils) and adaptive immunity cells (*e.g.*, Th17 cells). Neutrophils produce antiviral molecules (*e.g.*, α -defensins) that may limit HIV replication at mucosal sites. Th17 cells play a dual role in HIV pathogenesis. Th17 cells contribute to the defence against different opportunistic pathogens by increasing the ability of epithelial cells to attract neutrophils in an IL-17-dependent manner. On the other hand, Th17 cells play a deleterious role in HIV pathogenesis as they are sites of productive viral replication and a source of pro-inflammatory cytokines. The frequency of Th17 cells is decreased in the GALT but not in the lungs of HIV-infected individuals, suggesting distinct mechanisms of Th17 recruitment in these anatomic sites in the context of HIV pathogenesis. In this manuscript we tested the hypothesis that HIV differentially interfere with the ability of intestinal but not pulmonary EC to produce chemokines that attract Th17 cells and neutrophils. We demonstrated that both intestinal and pulmonary EC produce chemokines that specifically attract Th17 cells (CCL20) and neutrophils (CXCL8) upon stimulation with the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α . TNF- α acted in synergy with IL-17, a recently identified « *danger signal* », and increases the capacity of intestinal but not pulmonary EC to produce CCL20. This synergistic effect can be explained by the preferential upregulation of IL-17 receptor expression on intestinal EC upon TNF- α stimulation. The exposure of intestinal EC to HIV did not affect their ability to produce CCL20 and CXCL8; however, exposure to HIV altered the production of these chemokines by alveolar EC, consistent with their selective permissiveness to infection. In conclusion, our results demonstrate that (i) HIV does not interfere directly with the ability of intestinal EC to attract Th17 cells and neutrophils and that (ii) the ability of intestinal EC to recruit the Th17 cells *via* CCL20 production is selectively dependent on the synergy between TNF- α and IL-17. Thus, the depletion of Th17 cells and the shortage in IL-17 in the GALT of HIV-infected subjects may preferentially lead to functional alterations of the intestinal barrier resulting by the alteration of Th17 recruitment in response to CCL20.

Remerciements

En préambule à ce mémoire, je tiens tout d'abord à exprimer mon intime gratitude à notre Créateur, à sa force qui a su me guider et m'apporter réconfort, courage et espoir dans les moments où j'en avais le plus besoin.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à la Dre Petronela Ancuta pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et répondu à mes nombreuses questions. Je lui témoigne de ce fait ma reconnaissance pour sa disponibilité et sa patience, sa constante humilité, son écoute bienveillante et ses conseils constructifs qui m'ont été d'une précieuse aide tout au long de ma formation dans le monde de la recherche. J'ai eu le privilège de travailler auprès d'un éminent chercheur dans le domaine du VIH. Je la remercie d'avoir été plus qu'un promoteur et de m'avoir accompagnée durant cette aventure au Canada.

Mes sincères remerciements s'adressent tout autant aux membres de mon laboratoire. Je remercie la Dre Aurélie Cleret-Buhot qui m'a été d'une grande aide pour la réalisation des expériences de microscopie confocale et qui m'a conseillée pour sur l'organisation de ce rapport de Maîtrise. Je remercie également la Dre Patricia Monteiro, Annie Gosselin, et Vanessa Sue Wacleche qui ont contribué à l'élaboration de ce projet de recherche et prodigué des conseils avisés.

Je remercie la Dre Nathalie Grandvaux pour avoir partagé avec nous son expérience sur la culture des cellules épithéliales et pour nous avoir généreusement offert les cellules épithéliales A549.

Il m'est également impossible d'oublier mes parents, mon frère, les membres de ma famille ainsi que les amis qui m'ont soutenue et sans lesquels je ne serais pas ici aujourd'hui.

Merci à tous les doctorants, post-doctorants des laboratoires voisins qui ont apporté une aide précieuse sur le plan scientifique, tant que sur le plan humain.

Enfin, merci à toutes les personnes que je n'ai pas citées qui se reconnaîtront dans ces quelques lignes.

1. INTRODUCTION

1.1 Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)

1.1.1 Découverte du VIH-1

Les premiers cas de syndrome d'immunodéficience humaine acquise (SIDA) ont été rapportés au début des années 80 au sein de la population homosexuelle de Californie et de New York. On observait chez ces patients une incidence élevée de sarcomes de Kaposi et d'infections à *Pneumocystis carinii* associées à la diminution progressive des lymphocytes T CD4⁺. Des cas similaires au sein de la communauté homosexuelle ont été rapportés à travers le monde, incluant la France. Le VIH-1 a été identifié comme l'agent causant le SIDA en 1983 par une équipe de chercheurs de l'Institut Pasteur à Paris, France, incluant la Dre Françoise Barré-Sinoussi sous la direction du Pr Luc Montagnier. Le virus a été isolé à partir d'un ganglion lymphatique d'un sujet atteint de SIDA et le virus a été nommé initialement LAV (*Lymphadenopathy-Associated Virus*) (Montagnier, Chermann *et al.* 1984). Ce même groupe de recherche a démontré la possibilité de produire des quantités importantes de virus *in vitro* sur des lignées cellulaires transformées par EBV (*Epstein-Barr virus*) (Barre-Sinoussi, Chermann *et al.* 1983; Montagnier, Gruest *et al.* 1984). Ce virus présentait une activité de transcriptase inverse et il pouvait être amplifié sur des cellules T CD4⁺ en présence de la cytokine IL-2. La microscopie électronique a confirmé la présence d'un virus à enveloppe (Barre-Sinoussi, Chermann *et al.* 1983). Un virus similaire a été isolé par l'équipe du Pr Robert Gallo au *National Institutes of Health* (NIH), États-Unis, et le nom de HTLV-III (*Human T-Lymphotropic Virus*) a été proposé (Gallo, Sarin *et al.* 1983), considérant le tropisme de ce nouveau virus pour les cellules T. Toutefois, le nouveau virus nommé LAV ou HTLV-III s'est avéré distinct du HTLV-I et HTLV-II du point de vue de la structure et de la pathogénèse. Finalement, un comité international formé de chercheurs experts dans le domaine de la virologie a proposé en 1986 le nom de virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) pour le virus causant le SIDA (Coffin, Haase *et al.* 1986). Cette nomenclature est depuis utilisée et remplace les nomenclatures précédentes, LAV et HTLV-III.

Le VIH-1 est un rétrovirus, de la famille des lentivirus. Il se caractérise par une longue période d'incubation, et une évolution lente vers le stade SIDA. La pathologie du SIDA est caractérisée par une répllication virale active, une diminution du taux de lymphocytes T CD4⁺ circulants (<200 cellules/μl), ainsi qu'une susceptibilité accrue à des infections opportunistes conduisant ainsi à la mort des individus infectés. En 1984, la molécule T4 (nommée CD4 à

présent) a été identifiée comme le récepteur unique du VIH-1 (Klatzmann, Champagne *et al.* 1984).

Quelques années plus tard, un virus similaire au VIH-1 a été cloné, et a été nommé virus de l'immunodéficience humaine de type 2 (VIH-2). Les deux virus se distinguent de par leur composition génétique et leur potentiel pathogène, le VIH-2 causant une pathologie moins importante avec une progression extrêmement lente vers le SIDA (de Silva, Cotten *et al.* 2008). On observe une forte ressemblance entre le VIH-2 et le VIS (*Virus de l'immunodéficience simienne*), ce dernier infectant de façon très peu pathogène les primates comme le singe vert mangabey (Clavel, Guetard *et al.* 1986).

Les recherches sur le SIDA lors des 30 dernières années ont abouti à d'importantes découvertes qui nous ont facilité la compréhension de la pathogenèse du VIH-1 et à la mise en place des stratégies thérapeutiques antirétrovirales (Palmisano and Vella 2011). Ainsi, dans les pays développés, on assiste maintenant à une augmentation considérable de la durée de vie et à l'amélioration significative de la qualité de vie des sujets infectés par le VIH-1. Toutefois, les mécanismes par lesquels le VIH-1 cause le SIDA restent encore obscurs et les thérapies antirétrovirales actuelles ne permettent pas l'éradication des réservoirs viraux (Trono, Van Lint *et al.* 2010). De plus, l'accès aux médicaments antirétroviraux reste encore restreint dans les pays en développement, surtout en Afrique (Creese, Floyd *et al.* 2002). Un vaccin efficace contre le VIH-1 n'est pas encore mis au point, malgré un effort international considérable afin de renforcer la recherche dans ce domaine (Wayne and Berkley 2010). Les résultats récents sur un essai vaccinal en Thaïlande (Rerks-Ngarm, Pitisuttithum *et al.* 2009) et l'identification des anticorps neutralisants anti-VIH-1 contre des régions conservées du virus (Wu, Yang *et al.* 2010) encouragent la communauté scientifique à continuer la recherche sur la mise en place d'un vaccin anti-VIH.

1.1.2 La structure du VIH-1

Le VIH-1 est un rétrovirus de forme sphérique, son matériel génétique est constitué de deux brins d'ARN de diamètre de 80 à 120 nm, à polarité positive. C'est un virus produit par bourgeonnement à la surface de cellules infectées. Comme le montre la Figure 1 ci-dessous, le VIH-1 est constitué d'une enveloppe externe composée de deux types de glycoprotéines: la gp120 qui interagit avec les récepteurs et corécepteurs cellulaires, et la gp41 qui est

responsable de la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Le complexe gp41/gp120 se présente généralement sous forme trimérique. Une protéine de la matrice (MA) tapisse la surface interne de la membrane virale composée de protéine p17. La matrice est suivie d'une capsidie (CA) constituée de la protéine core p24. On trouve à l'intérieur de la capsidie deux copies d'ARN viral simple brin identiques et liées à la protéine virale p7 et aux enzymes virales telles que la transcriptase inverse, la protéase et l'intégrase (Greene and Peterlin 2002).

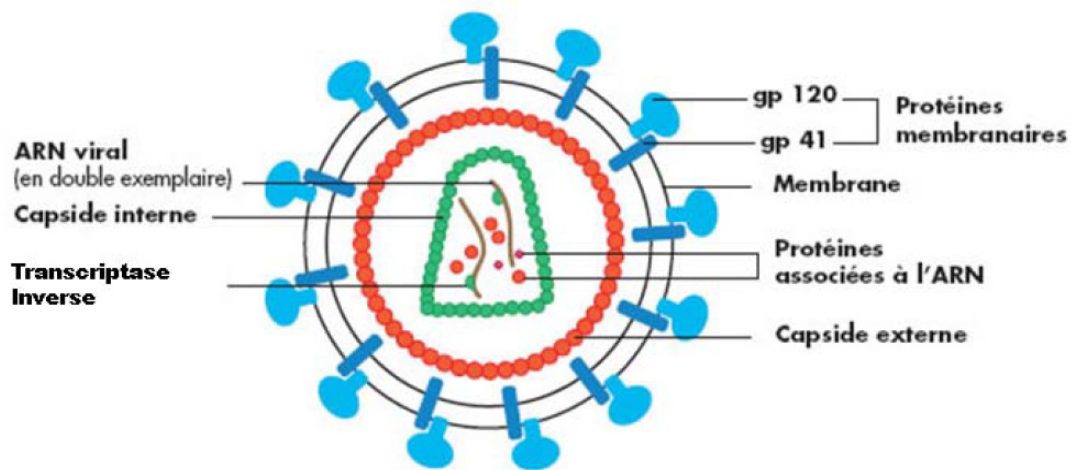


Figure 1 : Structure schématique du VIH-1, adaptée de Greene *et al.* (Greene and Peterlin 2002). Description schématique de la structure du VIH incluant les protéines d'enveloppe gp120 et gp40, la capsidie interne et externe et les protéines associées, les deux copies d'ARN viral simple brin, et les deux copies de la transcriptase inverse incorporées dans les virions.

1.1.2.1 Le génome viral du VIH-1:

Le génome du VIH-1 est constitué d'ARN. Deux copies d'ARN simple brin de 9.2 Kb sont emballées dans la particule virale ainsi que les enzymes et les protéines accessoires. Sa réplication a lieu *via* un processus de transcription inverse en ADN complémentaire grâce à une enzyme virale, la transcriptase inverse. Le génome du VIH-1 comprend neuf gènes codant pour 15 protéines virales, dont trois gènes structuraux: *gag* codant pour les antigènes de la nucléocapside, *pol* (*Polymérase*) codant pour les enzymes virales; et *env* (*Enveloppe*) codant pour les protéines de surface du virion. La polyprotéine *gag* synthétisée est clivée en protéines structurales de la matrice (p17), de la capsid (p24) et de la nucléocapside. Les enzymes virales, la protéase (PR), intégrase (IN) et la transcriptase inverse (RT), sont encapsulées dans la particule virale. La protéase clive les polyprotéines virales en protéines fonctionnelles, la transcriptase inverse assure la transcription inverse de l'ARN en ADN complémentaire, et l'intégrase permet l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN cellulaire dans le cadre du complexe de pré-intégration. La transcription du gène *env* conduit à la traduction d'un précurseur polyprotéique gp160 qui sera clivé par la suite en deux glycoprotéines membranaires, la gp120 et la gp41 (Freed 2001).

En plus des gènes codant pour des protéines structurales, le génome viral est constitué de gènes codant pour des protéines accessoires et régulatrices à différentes fonctions. La protéine *Vif* (*Viral infectivity factor*) joue un rôle dans l'infectiosité, et module l'assemblage et la maturation des particules virales. La protéine *Vpr* (*Viral protéine R*) assure le transport nucléaire du complexe de pré-intégration virale, ainsi que la transactivation des gènes cellulaires et la différenciation cellulaire (Romani and Engelbrecht 2009). Selon Schrofelbauer B *et al.*, (Schrofelbauer, Yu *et al.* 2005), *vpr* augmenterait l'infectiosité du VIH-1 dans les cellules cibles. La protéine Tat est une protéine régulatrice essentielle au virus, ayant un rôle de transactivation dans la transcription de l'ARN messager (ARNm) (Fisher, Feinberg *et al.* 1986; Berkhout, Silverman *et al.* 1989). Quant à la protéine Nef, elle est indispensable à la réplication virale (Foster and Garcia 2008), mais elle contribue de façon significative aux effets pathogéniques du VIH (Petit, Buseyne *et al.* 2001). Enfin, la protéine *Vpu* (*Viral Protein U*) est seulement associée au VIH-1 et favorise la dégradation de la molécule CD4 dans le réticulum endoplasmique et le renforcement de la libération des virions de la membrane plasmique des cellules infectées par le virus (Nomaguchi, Fujita *et al.* 2008).

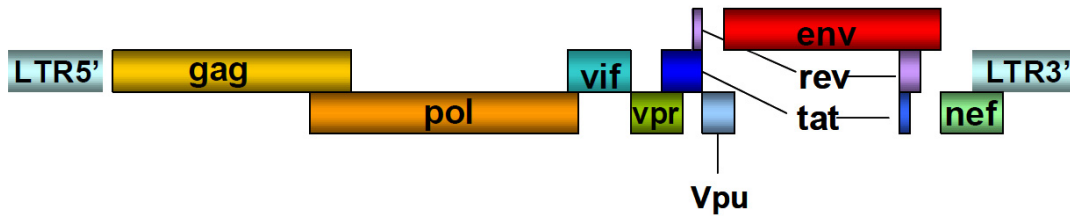


Figure 2 : Structure génomique du VIH, adaptée à partir de Greene *et al* (Greene and Peterlin 2002). Vue d'ensemble de l'organisation du génome du VIH de 9 Kb incluant trois gènes structuraux (*i.e.*, gag, pol et env), 6 gènes accessoires (*i.e.*, vif, vpr, vpu, tat, rev, et nef), et les séquences LTR (*long terminal repeat*) en 5' et 3'.

1.1.3 Cycle de réplication :

On observe deux phases majeures dans le cycle de répliquions du VIH-1, la phase précoce et la phase tardive. Pendant la phase précoce, le VIH-1 se fixe d'abord sur la cellule cible, puis le génome viral s'intègre dans le génome cellulaire. Quant à la phase tardive, elle comprend toutes les étapes de régulation de l'expression de l'ADN proviral et le processus de maturation des virions, comme représenté de façon schématique dans la Figure 3.

1.1.3.1 Phase précoce :

1.1.3.1.1 Entrée du VIH-1

Le VIH-1 cible les cellules du système immunitaire, incluant premièrement les lymphocytes T CD4⁺ mais également les macrophages (MΦ) et les cellules dendritiques (DC) (Stevenson 2003). Le virus se fixe d'abord à la surface de la cellule cible via une interaction forte et spécifique de la glycoprotéine de 120 kDa (gp120) de l'enveloppe du VIH-1 avec la molécule CD4, qui est le récepteur unique du VIH-1 (Dalglish, Beverley *et al.* 1984; Klatzmann, Champagne *et al.* 1984; Wu, Gerard *et al.* 1996). Ensuite, un changement de conformation de la gp120 permettra l'exposition d'un site spécifique à la fixation aux récepteur de chimiokines CCR5 ou CXCR4, qui sont les corécepteurs majeurs du VIH-1 (Alkhatib, Combadiere *et al.* 1996; Bleul, Farzan *et al.* 1996; Zhang, Huang *et al.* 1996). Un second changement de conformation de la gp120 s'effectue suite à l'interaction avec le corécepteur. Cela permet la libération de la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 de 41 kDa

(gp41) et l'arrimage de son peptide de fusion dans la membrane cytoplasmique (Wu, Gerard *et al.* 1996). Après pénétration dans la membrane cellulaire, les deux hélices de la gp41 se replient sur elles-mêmes, permettant la fusion des membranes cellulaires et virales (Wu, Gerard *et al.* 1996).

1.1.3.1.2 Transcription inverse et intégration

Après fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la cellule cible, la nucléocapside pénètre dans le cytoplasme, se désagrège et libère les deux brins d'ARN et les enzymes associées. L'ARN viral est par la suite rétrotranscrit en ADN double brin grâce à la transcriptase inverse (Farnet and Bushman 1996). L'étape de transcription inverse est initiée à l'aide d'un ARN de transfert (ARNt), d'origine cellulaire et servant d'amorce. La transcriptase inverse synthétise le premier brin d'ADNc à partir de l'ARN viral. Au cours de cette synthèse l'ARN ayant servi de matrice est dégradé par une activité enzymatique RNase de la transcriptase inverse. La dégradation est pratiquement totale, excepté pour deux courtes séquences riches en purine (PPT : *Polypurine tracts*). Ces séquences serviront d'amorce pour la synthèse du deuxième brin d'ADN qui est également assurée par la transcriptase inverse (Basu, Song *et al.* 2008). L'intégration de l'ADN viral linéaire (ADNv) dans le génome cellulaire est une des étapes essentielles du cycle du rétrovirus. Elle est orchestrée par l'intégrase virale qui reconnaît et agit sur les extrémités de l'ADNv catalysant deux réactions endolytiques séquentielles. Tout d'abord, l'intégrase hydrolyse le phosphodiester à une ou aux deux extrémités 3' (Li, Krishnan *et al.* 2011). Ensuite, après avoir trouvé le site cible idéal de chromatine au niveau du noyau, l'intégrase apporte un brin d'ADN de transfert en utilisant le 3' hydroxyle pour couper les liens phosphodiester au sein des brins de l'ADN cible. L'ADN intermédiaire obtenu aux extrémités 5' non liées induit alors des interruptions sur l'ADNt simple brin. Ces interruptions seront par la suite réparées grâce à la machinerie de la cellule hôte pour céder la place au provirus intégré par la séquence de duplication de l'ADNt double brin (Li, Krishnan *et al.* 2011). Dans un but thérapeutique, les scientifiques ont pensé à produire des molécules qui ont pour rôle de bloquer l'étape clé de l'intégration, en bloquant l'intégrase. Parmi ces molécules, on trouve le Raltegravir (RAL) qui bloque l'activité du brin d'ADN de transfert (Summa, Petrocchi *et al.* 2008).

1.1.3.2 Phase tardive

Les ARNm épissés ou non-épissés sont transportés hors du noyau afin d'être traduits en protéines. En premier lieu, les ARNm épissés courts sont traduits en protéines régulatrices Tat, Rev et la protéine Nef. Par la suite, les ARNm non-épissés sont traduits en précurseurs protéiques : Gag, Gag-Pol et Env (gp160), et exportés grâce à la protéine accessoire Rev. La polyprotéine gp160 est traduite d'abord, suivi de la traduction des précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pol. Une fois la traduction terminée, les protéines virales s'associent à l'ARN viral pour former ainsi des virions. Les protéines virales membranaires sont intégrées à un fragment de la membrane cellulaire, qui sera emporté au moment du bourgeonnement du virus. La maturation du virus se poursuit par le clivage des précurseurs non clivés, à l'aide de la protéase virale (Tozser 2003; Zheng, Lovsin *et al.* 2005).

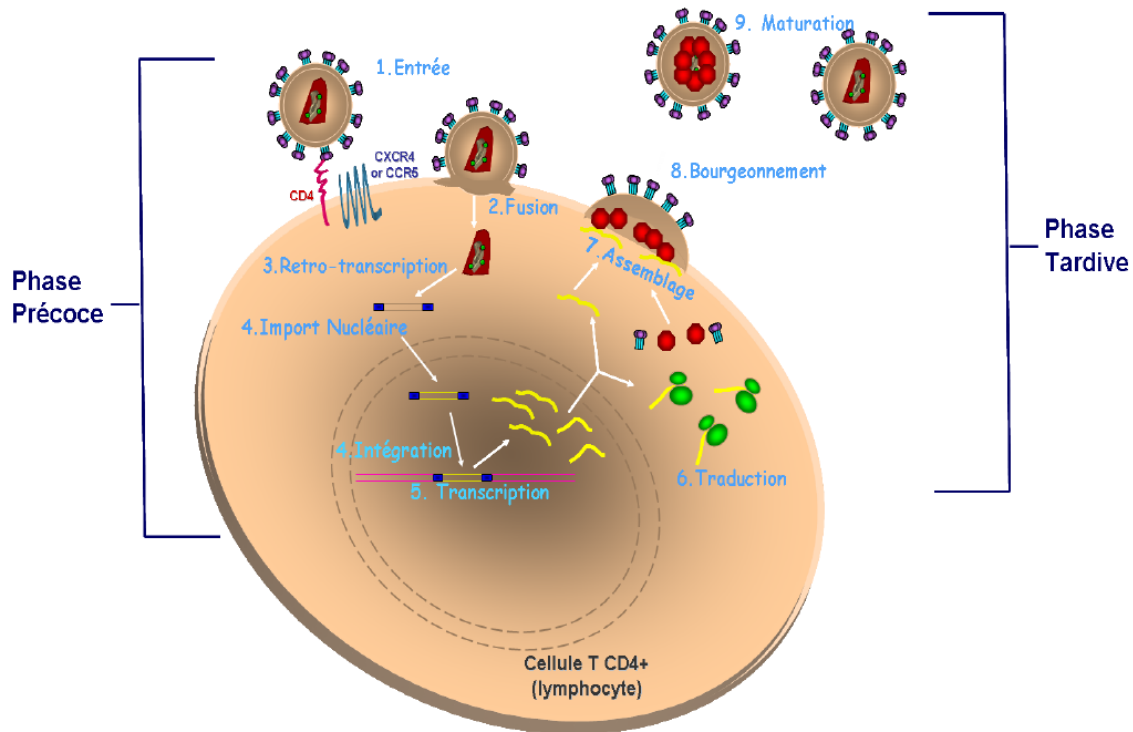


Figure 3 : Le cycle de réplication du VIH-1, adapté de Weiss RA (Weiss 2003). Description schématique des événements précoces survenant après l'infection des cellules cibles, mettant en évidence les étapes de 1) l'**entrée** via l'interaction de la glycoprotéine gp120 virale avec le CD4 et les corécepteurs (CCR5 ou CXCR4) à la surface des cellules cibles, 2) la **fusion** via la glycoprotéine gp41, 3) la **transcription inverse** de l'ARN en ADN complémentaire, 4) l'**import nucléaire** du complexe de pré-intégration et l'**intégration** de l'ADN proviral, 5) la

transcription de l'ADN proviral, 6) la **traduction** de l'ARN en protéines, et finalement les étapes de 7) l'**assemblage**, le **bourgeonnement** et la **maturation** des nouvelles particules virales.

1.1.4 La pathogenèse de l'infection à VIH-1

1.1.4.1 Phases cliniques:

L'infection à VIH-1 induit une forte déplétion de lymphocytes T CD4⁺, compromettant ainsi le fonctionnement du système immunitaire des sujets infectés en les rendant susceptibles à des infections opportunistes. Trois phases cliniques majeures peuvent être identifiées lors de l'infection à VIH-1: la phase aiguë, la phase chronique et la phase SIDA (Figure 4). La phase aiguë est symptomatique et se caractérise par la réplication virale active et la déplétion des cellules T CD4⁺, surtout au niveau des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses intestinales (Douek, Roederer *et al.* 2009). Cependant, le développement des réponses immunitaires anti-VIH à médiation cellulaire (cellules NK et cellules T CD8⁺) et humorales (lymphocytes B produisant des anticorps) permet un contrôle temporaire de la réplication virale et une restauration du taux de lymphocytes T CD4⁺ en périphérie, mais pas au niveau des muqueuses intestinales (Grossman, Meier-Schellersheim *et al.* 2006; Douek, Roederer *et al.* 2009). La phase aiguë est suivie de la phase chronique, qui est généralement asymptomatique. Toutefois, cette phase est marquée par la déplétion progressive des cellules T CD4⁺ du sang périphérique, la réplication virale persistante même à bas bruit sous trithérapie et une activation immunitaire chronique (Douek, Roederer *et al.* 2009). La hausse importante de la charge virale est généralement accompagnée de fièvre, de maux de tête, de malaises et de perte de poids. Le stade SIDA est enfin déclaré lorsque le compte des lymphocytes T CD4⁺ du sang périphérique diminue en dessous de 200 cellules/ μ l et qu'apparaissent des infections par des pathogènes opportunistes (*e.g.*, *Candida*, *Pneumocistis*, *Mycobacterium*) et des tumeurs (*e.g.*, sarcome de Kaposi) (Lane and Fauci 1985).

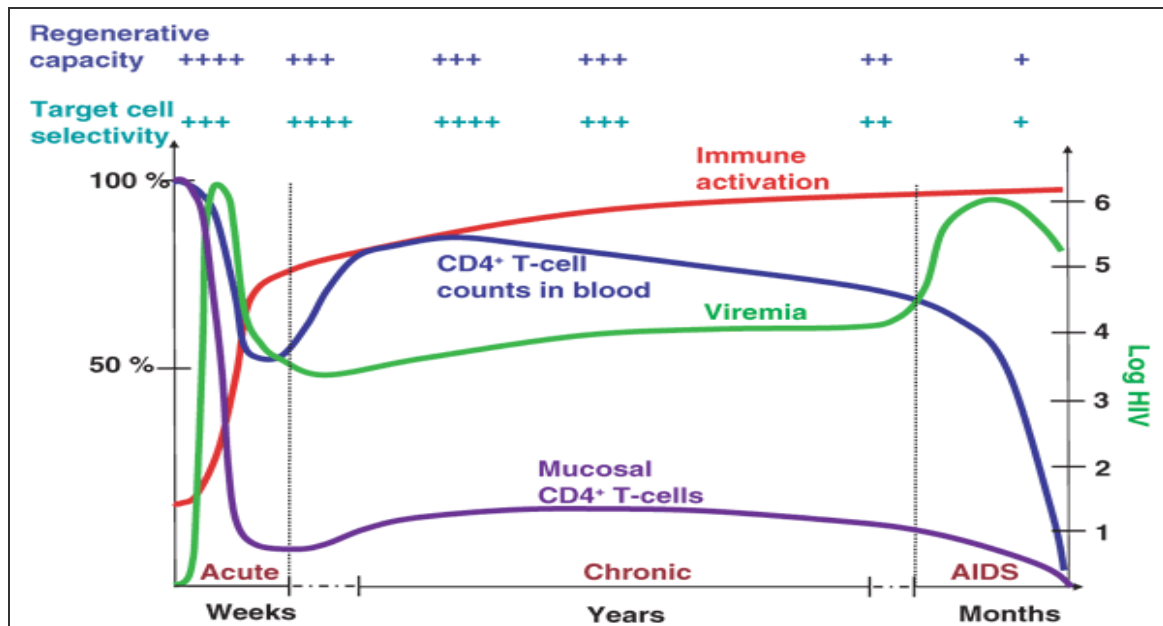


Figure 4 : Phases cliniques de l'infection à VIH-1 (Grossman, Meier-Schellersheim *et al.* 2006) (utilisation autorisée par l'éditeur de *Nature Medicine*). La figure indique les trois phases cliniques de l'infection à VIH-1 : la phase aiguë, la phase chronique et la phase SIDA. Pendant la phase aiguë, le VIH se réplique fortement, la fréquence des lymphocytes T CD4⁺ est fortement diminuée dans le sang périphérique (courbe bleue) et surtout au niveau des muqueuses (courbe violette), et l'activation immunitaire augmente progressivement. Le développement des réponses immunitaires anti-VIH permet le contrôle de la virémie à la fin de la phase aiguë et la restauration partielle du taux de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang périphérique, mais pas dans les muqueuses. Pendant la phase chronique, l'activation immunitaire augmente progressivement, en parallèle avec la réplication virale. La capacité régénérative des lymphocytes T diminue progressivement et, par conséquent, le taux de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang périphérique et dans les muqueuses continue à baisser. La phase SIDA est déclarée quand le taux de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang périphérique diminue sous le seuil de 200 cellules/ μ l. Cette phase s'associe à une incidence élevée des infections opportunistes, conduisant ainsi à la mort de l'individu.

1.1.4.1.1 Phase aiguë :

Les tissus lymphoïdes associés au tractus gastro-intestinal et/ou reproductif sont des sites majeurs de réplication du VIH-1. Les souches virales détectées lors de la phase aiguë de l'infection utilisent principalement le CCR5 comme corécepteur pour l'entrée (virus à tropisme R5) (Scarlatti, Tresoldi *et al.* 1997 ; Doms 2001). Une grande population des cellules T CD4⁺ mémoires et activées résident dans les tissus muqueux et plus de 50% de ces cellules expriment le corécepteur majeur du VIH-1, CCR5 (Veazey, Mansfield *et al.* 2000), alors que seulement 15% des cellules T CD4⁺CCR5⁺ se retrouvent dans le sang périphérique et dans les ganglions lymphatiques (Grossman, Meier-Schellersheim *et al.* 2006). Pendant la phase aiguë, le VIH induit une déplétion majeure des cellules mémoires T CD4⁺CCR5⁺ des muqueuses, et continue au cours des autres phases (Figure 4) (Grossman, Meier-Schellersheim *et al.* 2006). Le compte des lymphocytes T CD4⁺ dans le sang périphérique des sujets infectés par le VIH-1 sous-estime la proportion totale des lymphocytes T CD4⁺ réduite au niveau des muqueuses. L'élimination massive des cellules T CD4⁺CCR5⁺ des muqueuses se déroule pendant les 2-3 semaines suivant l'infection, et est associée à la mort cellulaire excessive. Celle-ci serait liée directement ou indirectement à l'effet cytopathogène du virus et à la destruction des cellules T CD4⁺ infectées, induite par les cellules cytotoxiques T CD8⁺ (Douek, Picker *et al.* 2003) et les cellules NK (Vieillard, Strominger *et al.* 2005).

La phase aiguë est caractérisée par une grande capacité de régénérer les lymphocytes T CD4⁺ en périphérie (Dion, Poulin *et al.* 2004). Les cellules T CD4⁺CCR5⁺ constituent des cibles potentielles de l'infection à VIH et cela du fait de leur état d'activation coïncidant avec une haute permissivité à l'infection virale. Ces cellules expriment les marqueurs d'activation tels que CD25, CD69 et l'HLA-DR (Chun, Engel *et al.* 1998; Pierson, McArthur *et al.* 2000; Vieillard, Strominger *et al.* 2005). L'activation des cellules T peut être due à la présence de cytokines pro-inflammatoires dans l'environnement muqueux. Les protéines virales Nef, Tat, Vpr et Rev peuvent aussi activer les cellules indépendamment du récepteur des cellules T (RCT) (Chun, Engel *et al.* 1998; Unutmaz, KewalRamani *et al.* 1999). À la fin de la phase aiguë, la réponse immunitaire adaptative contrôlée par les lymphocytes B et les lymphocytes T CD8⁺ facilite le contrôle de la réplication virale, permettant ainsi l'augmentation du taux des lymphocytes T CD4⁺ (Grossman, Meier-Schellersheim *et al.* 2006).

1.1.4.1.2 Phase chronique :

La phase chronique est essentiellement caractérisée par une diminution progressive des cellules T CD4⁺, une réplication virale active, l'activation persistante des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ et la production accrue de cytokines pro-inflammatoires (Douek, Picker *et al.* 2003; Grossman, Meier-Schellersheim *et al.* 2006). Le degré d'activation chronique permet de mieux prédire la progression de l'infection que la charge virale elle-même (Sousa, Carneiro *et al.* 2002; Douek, Roederer *et al.* 2009). Seulement une petite fraction des cellules T est infectée par le VIH *in vivo* (Blankson, Persaud *et al.* 2002; Chomont, El-Far *et al.* 2009; Gosselin, Monteiro *et al.* 2010). Par conséquent, l'infection directe par le VIH ne peut pas être la cause de la déplétion massive des cellules T CD4⁺ et des effets indirects de l'infection peuvent jouer un rôle important. Par exemple, l'activation immunitaire chronique contribue à l'épuisement du métabolisme cellulaire et au vieillissement du système immunitaire et conduit à la mort massive des cellules T (Douek, Picker *et al.* 2003; Ford, Puro *et al.* 2009). La translocation microbienne au niveau du tractus gastro-intestinal est un facteur potentiellement responsable de l'activation immunitaire chronique (Brenchley, Schacker *et al.* 2004). Plusieurs mécanismes sont impliqués dans les événements menant à la déplétion des cellules T CD4⁺. Ces mécanismes incluent (i) l'attrition du pool de cellules mémoires causé par l'activation persistante, (ii) la vaste activation des cellules T naïves entrant dans le pool des cellules T mémoires, (iii) le nombre réduit des cellules en réserve, en état d'équilibre, dû à une stimulation récurrente et (iv) le dysfonctionnement de l'approvisionnement des cellules T naïves à partir des cellules souches hématopoïétiques (Douek, Picker *et al.* 2003). La capacité du thymus à régénérer des cellules T naïves est diminuée chez les patients infectés par le VIH (Dion, Poulin *et al.* 2004 ; Sauce, Larsen *et al.* 2011). L'infection à VIH-1 induit une altération structurale majeure des ganglions lymphatiques, avec un dépôt délétère du collagène et une diminution du nombre de lymphocytes (Brenchley, Schacker *et al.* 2004; van Grevenynghe, Halwani *et al.* 2008). Le nombre relatif des cellules T CD4⁺ et T CD8⁺ au sein du système immunitaire est altéré avec la prépondérance du pool des cellules T CD8⁺ activées et la diminution du nombre de cellules T CD4⁺ (Douek, Picker *et al.* 2003).

1.1.4.1.3 Phase SIDA :

Le stade SIDA est déclaré lorsque le nombre de cellules T CD4⁺ diminue à moins de 200 cellules/ μ l de sang (Haase 1999). Cette phase est associée à une augmentation de la virémie et un déclin drastique du nombre de cellules T CD4⁺ dans le sang périphérique

(Figure 4). Les souches virales utilisant comme corécepteur la molécule CXCR4 (virus à tropisme X4) apparaissent généralement à ce stade tardif de l'infection (Douek, Picker *et al.* 2003). L'utilisation de CXCR4 comme corécepteur induit une expansion de la population des cellules cibles (étant donné que la majorité des cellules T exprime CXCR4), et donc une accélération de la progression vers le stade SIDA. La perte de l'intégrité du système immunitaire adaptatif à médiation cellulaire permet aux microorganismes à virulence limitée (ex : *Pneumocystis carinii* et *Mycobacterium avium*) de devenir des pathogènes opportunistes dangereux. Les infections opportunistes, liées à la phase SIDA, incluent (i) les infections fongiques telles que les candidoses oro-pharyngée et œsophagiennes et les infections pulmonaires par *P. carinii* ; (ii) les infections virales associées au cytomégalovirus (CMV), au virus du papillome humain (VPH) et au virus de l'herpes simplex (VHS) ; (iii) les infections bactériennes tel que *M. tuberculosis*; (iv) les infections protozoaires causant des encéphalites toxoplasmiques et (v) des néoplasies tels que le cancer cervical invasif et le sarcome de Kaposi (Chu and Selwyn 2011).

1.2 Cellules épithéliales

1.2.1 Cellules épithéliales, immunité des muqueuses et infection à VIH-1

Les muqueuses sont localisées à l'interface entre l'organisme et l'environnement externe et ainsi, représentent la première ligne de défense de l'organisme. Les tractus muqueux gastro-intestinal, urogénital et respiratoire sont tapissés d'une couche de cellules épithéliales fortement liées par des jonctions, formant ainsi une barrière mécanique imperméable. Les cellules épithéliales participent aux mécanismes de défense contre les pathogènes d'une part, en produisant des molécules antivirales et antibactériennes, et d'autre part, en stimulant le recrutement et la fonction des cellules de l'immunité innée et adaptative dans les muqueuses *via* la production de cytokines et de chimiokines (Vareille, Kieninger *et al.* 2011). Les facteurs solubles produits par les cellules épithéliales créent un environnement défavorable au développement des pathogènes y compris le VIH. Parmi les molécules assurant l'immunité au sein de l'épithélium on peut énumérer (i) l'interféron (IFN) de type I et II, (ii) les défensines- β , (iii) et le monoxyde d'azote (NO, *nitric oxide*) (Quinones-Mateu, Lederman *et al.* 2003; Kaushic, Ferreira *et al.* 2010). Aussi, les cellules épithéliales produisent une variété de chimiokines (*e.g.*, MIP3 α /CCL20, l'IL-8/CXCL8, le CCL25, le MIP1 α /CCL3, RANTES) et de cytokines (*e.g.*, IL-1 β , TNF- α) jouant un rôle majeur dans l'immunité des muqueuses. Les chimiokines produites par les cellules épithéliales assurent un rôle primordial dans le recrutement de cellules de l'immunité innée, telles que les neutrophiles, les NK (*natural killer*), les cellules dendritiques (DC), et les monocytes/macrophages. Les chimiokines recrutent aussi des cellules de l'immunité adaptative, telles que les lymphocytes Th17, les lymphocytes T régulatrices (Treg), et les DC). Les cellules épithéliales peuvent reconnaître les pathogènes grâce aux TLRs (*Toll like receptors*), exprimés à la surface cellulaire, ou bien grâce aux NLRs (*NOD like Receptors*) exprimés à la surface nucléaire. Toutefois, les cellules épithéliales qui tapissent les muqueuses exposées au VIH-1 (*i.e.*, muqueuse rectale et utérine cervicale) sont généralement incapables de prévenir l'acquisition de l'infection. Le VIH peut traverser directement la barrière épithéliale en infectant les cellules épithéliales telles que les cellules épithéliales utérines (Howell, Edkins *et al.* 1997), ou en passant à travers les brèches épithéliales (Norvell, Benrubi *et al.* 1984; Guimaraes, Vlahov *et al.* 1997), ou encore par les voies endocytaires telles que le phénomène de transcytose (Bomsel and Alfsen 2003). Les cellules épithéliales ne sont pas des cibles d'infection virale productive. La transmission virale *via* les cellules épithéliales est assurée dans certains cas malgré l'absence du récepteur CD4⁺ et des corécepteurs de

chimiokines CCR5 et CXCR4 à leur surface (Yeaman, Asin *et al.* 2004; Berlier, Bourlet *et al.* 2005). En effet, les glycosphingolipides tels que les lactocéramides sulfatés à la surface des cellules épithéliales vaginales (Furuta, Eriksson *et al.* 1994) et le galactosyl céramide (GalCer) exprimé à la surface des cellules épithéliales ectocervicales et intestinales peuvent assurer l'entrée virale dans ces cellules (Bomsel and Alfsen 2003; Yeaman, Asin *et al.* 2004). En conclusion, les différentes muqueuses recouvertes par les cellules épithéliales représentent un site stratégique de par ses propriétés immunitaires et du fait que les pathogènes doivent d'abord traverser cette barrière pour pouvoir cibler leurs hôtes. De ce fait, de futures stratégies thérapeutiques performantes devraient être mises au point afin de cibler les muqueuses intestinales et utérines de manière à limiter la réplication active du VIH.

1.2.2 Transmission du VIH-1 à travers les muqueuses

1.2.2.1 Cellules épithéliales intestinales et VIH-1:

L'épithélium intestinal est formé d'une couche imperméable d'anthérocytes polarisés en pôle apical et basal. Parmi ces cellules, on trouve les cellules caliciformes sécrétrices de mucus à propriété antimicrobienne. On retrouve aussi les cellules M, qui jouent le rôle de portes ouvertes aux agents microbiens (Kyd and Cripps 2008). Le VIH peut franchir la barrière intestinale en passant entre les cellules épithéliales, ou *via* les cellules M et les brèches de la barrière épithéliale, ou encore par transcytose dépendante des récepteurs CCR5 et GalCer. Ce phénomène assure le transport actif du virus du pôle apical vers le pôle basal à la surface sérosale, où se produit la fusion de la vésicule transcytotique, suivie de la relâche du VIH-1 du côté de la *lamina propria* où le virus peut interagir avec ses cibles (*e.g.*, cellules dendritiques, cellules T CD4⁺) afin de propager l'infection (Bomsel and Alfsen 2003). Le phénomène de transcytose est représenté de façon schématique dans la Figure 5. Suite au phénomène de transcytose, le virus se retrouve en contact avec les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT) où l'infection productive aura lieu dans les cellules cibles. Les lymphocytes de la *lamina propria* expriment fortement le récepteur CD4 et le corécepteur viral CCR5, faisant d'elles des cibles pour les souches R5 du VIH virales (Lapenta, Boirivant *et al.* 1999). En contrepartie, les macrophages de la *lamina propria* expriment le CD4 seulement, mais pas les corécepteurs et sont ainsi très peu permissifs au VIH (Meng, Sellers *et al.* 2000). Durant l'infection primaire à VIH, on observe la dysfonction de la barrière épithéliale associée avec une activation immunitaire, et la déplétion sévère des lymphocytes T CD4⁺ dans le GALT (Sankaran, George *et al.* 2008; Hofer and Speck 2009), Cela affaiblit

l'orchestration des fonctions de la barrière épithéliales et contribue à l'induction de la susceptibilité aux infections opportunistes.

Des études par Li *et al.* ont démontré que se produisait une apoptose massive des cellules épithéliales intestinales des singes infectés par le SIV et que ce processus coïncidait fortement avec la déplétion massive des lymphocytes T CD4⁺ au niveau des muqueuses intestinales (Li, Estes *et al.* 2008). De façon similaire, il a été démontré récemment que le VIH pouvait induire des altérations importantes de l'intégrité des cellules épithéliales intestinales, en partie *via* le processus d'apoptose (Epple, Allers *et al.* 2010).

Parmi les mécanismes de l'immunité adaptative, on trouve les immunoglobulines de classe G (IgG) qui peuvent assurer une protection contre l'infection à VIH. Les IgG du sang périphériques peuvent accéder au niveau de sécrétions mucosales et assurer une protection contre l'infection à VIH (Mestecky 2006). Toutefois, les réponses immunitaires les plus importantes au niveau des muqueuses comprennent la production d'IgA. De plus, Hocini *et al.* ont montré que les IgG et les IgA secrétées ont le potentiel de diminuer le phénomène de transcytose du VIH au niveau des muqueuses intestinales. Les IgA secrétées s'avèrent plus efficaces que les IgG (Hocini, Belec *et al.* 1997). Des études récentes élaborées sur un modèle d'épithélium cylindrique ont démontré que les IgA monomériques et dimériques bloquent la transcytose, et cela de manière plus importante au niveau des muqueuses rectales (Shen, Drelichman *et al.* 2010). Cependant, d'autres études ont montré que certains anticorps polyclonaux avaient la capacité de bloquer l'attachement du VIH en agglutinant les particules virales (Chomont, Hocini *et al.* 2008). En conclusion, l'épithélium intestinal représente la première ligne de défense et est suffisamment équipé pour relever de fréquents défis du non soi, tels que les micro-organismes résidents ou de transit. En conclusion, les muqueuses intestinales représentent un site actif de la réplication du VIH. La compréhension du fonctionnement de l'immunité innée et adaptative impliquées au sein des muqueuses intestinales est cruciale pour la conception de futures stratégies thérapeutiques préventives contre l'infection à VIH.

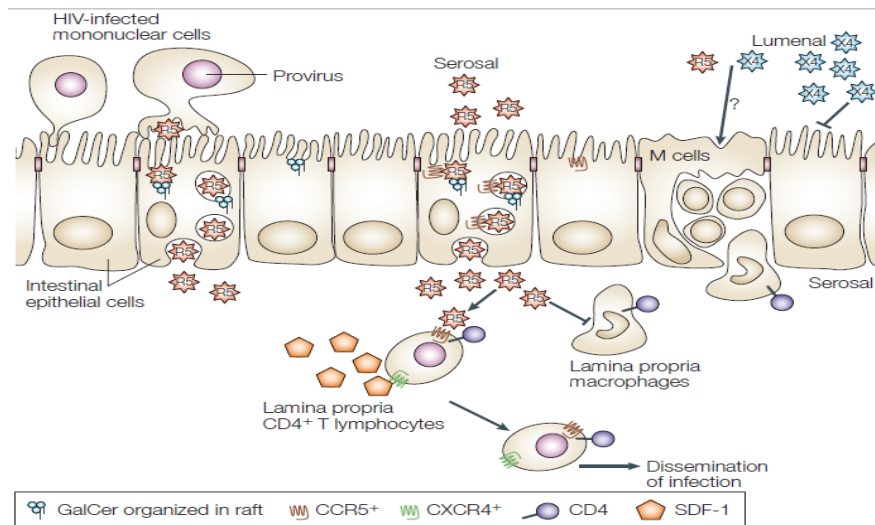


Figure 5 : Représentation schématique du phénomène de transcytose (Bomsel and Alfsen 2003) (utilisation autorisée par l'éditeur de *Nature Medicine*). Les souches de VIH-1 à tropisme R5 traversent la barrière des cellules épithéliales intestinales par le phénomène de transcytose, grâce à un mécanisme dépendant des récepteurs galactosyl céramide ou CCR5. Les cellules épithéliales n'expriment pas le CXCR4, expliquant en partie la transmission préférentielle des souches R5 à travers les couches épithéliales lors de la transmission de l'infection au niveau des muqueuses. Le VIH traverse ainsi la barrière épithéliale, jusqu'à la surface sérosale, grâce à ce phénomène de transport actif du virus du pôle apical vers le pôle basal où les vésicules transcytotiques relâchent le virus dans la *lamina propria*. À cet endroit, le VIH peut infecter les cellules cibles incluant les lymphocytes T CD4⁺, les macrophages et les cellules dendritiques présentes dans ce site anatomique, facilitant ainsi la dissémination de l'infection. En plus des cellules épithéliales, les cellules M représentent une porte ouverte pour la transmission du virus.

1.2.2.2 Cellules épithéliales pulmonaires et VIH-1 :

L'épithélium qui tapisse les voies respiratoires représente une ligne cruciale de défense de l'hôte contre divers pathogènes inhalés. Ces cellules sont fortement liées par plusieurs types de jonctions et forment une barrière physique imperméable. En plus de la protection physique que peut assurer l'épithélium respiratoire, on lui attribue une propriété dans la régulation des fonctions immunitaires au niveau pulmonaire. Les cellules épithéliales sont dotées de la capacité de reconnaissance des pathogènes *via* les récepteurs de type «*toll*» (TLRs, *toll-like receptors*) et autres senseurs viraux intracellulaires (*e.g.*, NODs, *nod-like receptors*), permettant ainsi l'initiation de l'immunité innée (Akira 2009). Les cellules épithéliales pulmonaires sont connues pour leur capacité à sécréter des chimiokines responsables du recrutement des différents types de cellules de l'immunité innée et adaptative. La lignée de cellules épithéliales alvéolaires A549 est un excellent modèle d'études, et est souvent utilisée. Les cellules A549 n'expriment pas le récepteur du VIH CD4 comme démontré par Yadav *et al.* (Yadav, Shi *et al.* 2010) et ces cellules devraient ainsi être non permissives à l'entrée du VIH dépendante de CD4. Toutefois, les cellules A549 expriment fortement CXCR4 (Murdoch, Monk *et al.* 1999) et CCR5 (Abonyo, Leiby *et al.* 2006). L'entrée du VIH peut cependant se faire *via* d'autres récepteurs (*e.g.*, Galactose céramide), dont l'expression à la surface des cellules épithéliales pulmonaires n'a pas encore été documentée. Le rôle des cellules épithéliales pulmonaires dans la pathogenèse de l'infection à VIH-1 n'est pas documenté dans la littérature. Néanmoins, l'infection à VIH est associée à une fréquence accrue des infections opportunistes pulmonaires (*e.g.*, *Mycobacterium tuberculosis*) et les macrophages alvéolaires sont connus comme cibles de réplication active du VIH (Bergamaschi and Pancino 2010). Des études par Brenchley *et al.* ont dernièrement démontré une déplétion préférentielle des lymphocytes Th17 au niveau du tractus intestinal, mais pas au niveau des poumons de patients VIH⁺ (Brenchley, Paiardini *et al.* 2008). Alors que plusieurs mécanismes peuvent être responsables de cette différence (*e.g.*, réplication virale plus intense et plus précoce dans l'intestin *versus* les poumons et/ou permissivité différentielle à l'infection des cellules Th17 intestinales *versus* pulmonaires), il est possible que la fonctionnalité des cellules épithéliales intestinales et non pas celle des cellules épithéliales pulmonaires soit altérée lors de l'infection à VIH. Cette dernière possibilité sera testée dans le présent mémoire de Maîtrise.

1.2.2.3 Cellules épithéliales utérines et VIH-1

L'épithélium recouvrant le tractus génital de la femme représente la première ligne de défense contre divers pathogènes, incluant le VIH, et représente le site majeur de la transmission du VIH chez les individus hétérosexuels. Le tractus génital féminin est organisé en un compartiment inférieur, comprenant le vagin et l'ectocervix, qui sont recouverts d'un épithélium multi-stratifié squameux. Quant au compartiment reproductif supérieur, il comprend l'endocervix, l'endomètre et les trompes de Fallope, tous recouverts d'un épithélium uni-stratifié prismatique. Grâce à la protection mécanique que confère cet épithélium, l'invasion par un bon nombre de pathogènes est contrecarrée. De plus, les cellules épithéliales créent un environnement défavorable à l'expansion des pathogènes en sécrétant des facteurs biologiques à propriétés antivirales. Cependant, l'exposition au VIH-1 d'une large surface de l'épithélium génital féminin, surtout en présence de brèches causées par l'inflammation suite à d'autres infections opportunistes (*e.g.*, VPH), favorise l'acquisition de l'infection à VIH (Galvin and Cohen 2004). Celle-ci peut s'effectuer directement par infection des cellules épithéliales, ou par voie endocyttaire (Bomsel and Alfsen 2003; Wu, Chen *et al.* 2003; Saidi, Magri *et al.* 2007). Le VIH atteint ensuite ses cellules cibles telles que les lymphocytes T et les DCs et s'y répliquera activement. Les cellules épithéliales utérines expriment les TLR1, TLR3, TLR5, TLR6 et TLR9, et ainsi elles peuvent répondre à une large variété de pathogènes. En effet, l'activation des TLRs induit la production des cytokines telles que l'IL-6, l'IL-8, le SDF-1 par les cellules épithéliales et les cellules immunitaires résidentes (Schaefer, Desouza *et al.* 2004). Les chimiokines- β telles que le CCL3/MIP-1 α , le CCL4/MIP-1 β et le CCL5/RANTES sont sécrétées par les cellules épithéliales utérines constitutivement et suite à l'infection par le VIH (Cocchi, DeVico *et al.* 1995). Ces chimiokines sont des ligands naturels du récepteur CCR5, et peuvent jouer un rôle crucial dans le blocage de l'entrée des souches virales R5 dans les cellules cibles. Les cellules épithéliales utérines répondent à plusieurs types de virus tels que le cytomégalovirus (CMV) (Kleinman, Sarov *et al.* 1984), et le virus *herpes simplex* de type 2 (HSV-2, *human simplex virus*) en activant les voies de signalisation impliquant les TLRs (MacDonald, Savoy *et al.* 2007; Li, Li *et al.* 2009). Il a été démontré que ces réponses aboutissent à la production de cytokines pro-inflammatoires (*e.g.*, IL-1 α , IL-6, TNF- α) ainsi qu'à l'induction de l'interféron β et du NO (Harwani, Lurain *et al.* 2007; Nazli, Yao *et al.* 2009). Ces études indiquent clairement que le tractus génital de la femme est capable d'induire des réponses immunitaires innées contre différents types de virus, y compris le VIH (Kaushic, Ferreira *et al.* 2010). De

plus, des études portant sur la compréhension de l'immunité innée des muqueuses génitales de la femme ont révélé qu'il existait une protection du tractus génital de la femme malgré son exposition constante au VIH. Iqbal *et al* ont alors découvert que la protection contre l'infection à VIH-1 est assurée par un facteur de l'immunité innée identifié comme le facteur elafin/trappin-2 (Iqbal, Ball *et al.* 2009). Plus tard, des recherches visant la compréhension de l'immunité adaptative des muqueuses génitales de la femme ont démontré que se produisait une plus forte production de chimiokines β à ce niveau, qui assurent une protection contre l'infection avec des souches du VIH à tropisme R5 (Lajoie, Poudrier *et al.* 2010). En revanche, ces chimiokines favorisent le recrutement des cellules cibles du VIH-1 et créent ainsi un environnement favorable à la réplication et à la dissémination virale. En conclusion, les muqueuses génitales représentent un site clé pour de futures interventions thérapeutiques visant à bloquer les phases primaires de l'infection à VIH.

1.2.3 Production de molécules antivirales

De nombreuses molécules produites naturellement par l'organisme peuvent avoir des effets antiviraux et anti-VIH en particulier. Parmi elles, les leukoprotéases, la lactoférine, les inhibiteurs de sérines protéases ou encore les défensines, comme expliqué dans la section 2.1. Les anti-leuco protéases sécrétées par les cellules épithéliales et les leucocytes infiltrant les muqueuses, et peuvent inhiber l'infection par le VIH *in vitro* (McNeely, Shugars *et al.* 1997; Wahl, McNeely *et al.* 1997). La lactoférine retrouvée dans le mucus vaginal et le lait de la mère peut inhiber les phases précoces de l'infection à VIH *in vitro* (Harmsen, Swart *et al.* 1995). Les inhibiteurs des sérines protéases comme le trappin-2/elafin ont des propriétés antivirales contre le VIH à la surface mucosale (Ghosh, Shen *et al.* 2009; Iqbal, Ball *et al.* 2009). Les cellules du tractus génital de la femme produisent l'interféron de type 1 (IFN- α , IFN- β) qui bloque la réplication du VIH, en partie en augmentant l'expression du facteur de restriction APOBEC3G (Chen, Huang *et al.* 2006). Quant à l'interféron de type II (IFN- γ), il s'avère efficace contre la réplication virale au sein des macrophages et des lymphocytes (Dhawan, Wahl *et al.* 1995). D'autres molécules antivirales produites par les cellules épithéliales sont les défensines comme décrit en détail dans les sections ci-dessous.

1.2.3.1 Les défensines

Les défensines sont des peptides cationiques riches en cystéine, non glycosylées, amphiphiliques d'environ 12 à 50 acides aminés. Les défensines ont un rôle primordial dans l'immunité innée. Elles exercent des propriétés antibactériennes, antifongiques et également antivirales. Leur structure tridimensionnelle est composée de trois feuillets β et d'une hélice α stabilisée par trois ponts disulfures intramoléculaires. Chez l'homme, on peut distinguer deux classes principales de défensines qui diffèrent du point de vue structural, les défensines- α et les défensines- β , dont les gènes représentent le résultat de la duplication d'un même gène ancestral (Liu, Zhao *et al.* 1997). On trouve chez le macaque rhésus et chez certains primates les défensines- θ (rétrocyclines) qui ont la capacité de protéger les cellules humaines de l'infection à VIH *in vivo*, en interagissant spécifiquement avec les récepteurs dépendants de l'entrée virale (Wang, Owen *et al.* 2004). Les défensines- θ auraient le même gène codant que celui des défensines- α , mais chez l'humain ce gène contient une mutation au niveau du codon stop, qui est à l'origine de l'absence de défensines dans l'organisme et a une plus forte susceptibilité à l'infection à VIH (Nguyen, Cole *et al.* 2003). Actuellement, les défensines font l'objet d'un bon nombre d'investigations prometteuses qui permettraient de comprendre pourquoi certaines personnes seraient plus résistantes à l'infection que d'autres. Ces recherches ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques pour la protection des muqueuses contre l'infection à VIH.

1.2.3.1.1 Les défensines- α

Il existe six types de défensines- α ou encore appelées *Human Neutrophil Proteins*, *HNP* : HNP1 à HNP4, HD5 (*Human defensin 5*) et HD6 (Ganz, Selsted *et al.* 1985; Wilde, Griffith *et al.* 1989). Les défensines- α sont sécrétées par les neutrophiles, qui sont recrutés en grand nombre et relativement tôt dans le site inflammatoire, les cellules NK et les cellules de Paneth. Certaines défensines- α comme HNP1-3 sont exprimées constitutivement. Les chemokines β : CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β et CCL5/RANTES produites par les cellules épithéliales (Cocchi, DeVico *et al.* 1995; Fahey, Schaefer *et al.* 2005; Kaushic, Ferreira *et al.* 2010) induisent la dégranulation des neutrophiles qui excrètent HNP1-3 (Jan, Huang *et al.* 2006). HNP1-3 sont des lectines qui s'attachent aux glycoprotéines de surface gp120 et au CD4, bloquant ainsi les étapes précoces d'infection par le VIH-1 (Wang, Owen *et al.* 2004). HNP1-3 a la capacité d'inactiver les virions VIH-1 extracellulaires, en inhibant une ou

plusieurs étapes ultérieure à la transcription inverse et à l'intégration virale (Daher, Selsted *et al.* 1986; Nakashima, Yamamoto *et al.* 1993; Chang, Vargas *et al.* 2005). Les défensines- α bloquent l'entrée du VIH, en régulant à la baisse l'expression du CD4 et en induisant une faible diminution de l'expression du CXCR4 (Furci, Sironi *et al.* 2007). Elles agissent ainsi aux étapes précoces de l'infection à VIH. Certains travaux suggèrent que les défensines- α protègent également contre l'infection *in vivo*. Ainsi, la résistance à l'infection a été démontrée chez 9 travailleuses du sexe taïwanaises et italiennes, malgré leur risque élevé d'exposition au VIH. Les chercheurs ont expliqué cela par le taux élevé de PMNs dégranulés ayant secrété leurs défensines- α , qui seraient la raison de cette résistance à l'infection (Jan, Huang *et al.* 2006). En plus de leurs effets directs sur la réplication virale, les défensines- α peuvent contribuer de façon indirecte à l'immunité antivirale. Ainsi, les défensines- α ont la capacité d'attirer les cellules T naïves et des DCs immatures *via* l'expression de la protéine $G_{i\alpha}$ couplée aux récepteurs $G_{i\alpha}$ PCRs (Yang, Chen *et al.* 2000), ainsi que les neutrophiles en augmentant l'expression de la chimiokine CXCL-8 par les cellules épithéliales et les macrophages. Les défensines- α induisent aussi la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α et l'IL1- β , qui peuvent agir sur les cellules épithéliales pour induire la production des chimiokines spécifiques pour les cellules de l'immunité innée et adaptative, stimulant ainsi les défenses antivirales au niveau des muqueuses. Zhang *et al.* ont démontré que les défensines- α avaient des propriétés antivirales contre le VIH et les ont identifié par erreur comme étant le facteur CAF (*cell anti-viral factor*) produit par les lymphocytes CD8 des patients LTNP (*long-term nonprogressors*), (Zhang, Yu *et al.* 2002). Plus tard en 2003, Mackewicz *et al.* ont démontré que les défensines- α ne relevaient pas du facteur CAF et qu'elles étaient produites par les neutrophiles et non pas par les cellules T CD8⁺ (Mackewicz, Yuan *et al.* 2003).

1.2.3.1.2 Les défensines- β

Il existe plusieurs types de défensines- β (hBD, *human beta defensin*), de hBD1 à hBD9 (Pazgier, Hoover *et al.* 2006). Elles sont sécrétées par les cellules épithéliales des muqueuses de façon constitutive, par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Duits, Ravensbergen *et al.* 2002; Dann and Eckmann 2007). De plus, il a été rapporté que les monocytes et les macrophages utérins stimulés par le LPS secrètent de l'IL-1 β , qui induit la production de hBD-2 par les cellules épithéliales utérines (Pioli, Weaver *et al.* 2006). L'exposition au VIH-1 induit également la production de hBD-2 et hBD-3 par les cellules

épithéliales orales, bloquant la réplication du VIH-1 en interagissant directement avec les virions et en modulant le CXCR4 (Quinones-Mateu, Lederman *et al.* 2003). La hBD-3 entre en compétition avec le SDF-1 pour la fixation sur le CXCR4, et induit l'internalisation du CXCR4 mais n'active pas la protéine G, ce que fait habituellement le ligand SDF-1. L'activation de la voie ERK-1/2MAPK et la mobilisation du calcium ne sont pas induites non plus (Feng, Dubyak *et al.* 2006). L'expression de hBD2 est également induite par des produits d'origine bactérienne, tels que le muramyl dipeptide (MDP) *via* le récepteur NOD2 intracellulaire. De plus, les hBD 1-3 présentent une activité chimio-attractrice des DCs immatures *via* le récepteur CCR6 (Yang, Biragyn *et al.* 2004). Les recherches portant sur la mise en place de stratégies thérapeutiques efficaces contre le VIH devraient davantage s'orienter vers l'utilisation de défensines qui s'avèrent potentiellement thérapeutiques.

1.2.3.1.3 Les défensines- θ

Les défensines- θ sont des octadécapeptides cycliques antimicrobiens qui ont la capacité de protéger les cellules humaines de l'infection à VIH. Ces dernières sont produites par des cellules de différents types, y compris les leucocytes des macaques rhésus, et de certains primates (Tang, Yuan *et al.* 1999; Tran, Tran *et al.* 2002). Les rétrocyclines *in vivo* peuvent inhiber la fusion de l'enveloppe virale du VIH-1 et cellulaire infectée en s'attachant sélectivement à la gp41 (Gallo, Wang *et al.* 2006), gp120, CD4 et au GalCer (Wang, Cole *et al.* 2003). Des expériences ont été effectuées sur des tissus cervicovaginaux et sur des cellules myéloïdes humaines transfectées par un plasmide codant pour les défensines- θ , et démontrant que ces derniers peuvent sécréter des rétrocyclines après stimulation par l'antibiotique aminoglycoside (Venkataraman, Cole *et al.* 2009). Le gène codant pour les rétrocyclines est nommé DEFT et existe toujours chez certains macaques: il proviendrait du même ancêtre que celui du gène des défensines- α qui aurait muté. En revanche, chez l'homme ce gène existe toujours, mais un codon stop prématuré empêche son expression (Nguyen, Cole *et al.* 2003). Autrement dit, les gènes des défensines- θ chez l'humain sont restés intacts et présentent 89,4% d'homologie avec les gènes des défensines- θ chez le macaque rhésus, mais la présence d'un codon stop explique l'absence d'expression chez l'humain. Ceci peut-être une raison de la plus forte susceptibilité de l'espèce humaine à l'infection par le VIH, comparée à celle des macaques rhésus (Nguyen, Cole *et al.* 2003).

1.2.4 Interaction des cellules épithéliales avec les cellules immunitaires

1.2.4.1 Neutrophiles

Les granulocytes neutrophiles ou polynucléaires neutrophiles (PMN) sont les cellules majeures de l'immunité innée grâce à leur capacité à phagocyter les cellules infectées ou à produire des molécules à potentiel antimicrobien. Pendant l'inflammation, un grand nombre de neutrophiles est recruté vers le site d'agression en réponse à un gradient chimiotactique de CXCL8/IL-8, chimiokine produite par les cellules épithéliales. Les neutrophiles, une fois recrutés, sont dégranulés en réponse à la stimulation par les chimiokines- β (CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β et CCL5/RANTES), puis ils secrètent les défensines- α HNP-3 à propriétés antifongiques, antibactériennes et antivirales (Jan, Huang *et al.* 2006). Ainsi, les neutrophiles, *via* la production de HNPs, seraient même capables de limiter la réplication du VIH dans des sites muqueux, comme suggéré par des études précédentes (Jan, Huang *et al.* 2006). Toutefois, l'infection à VIH-1 est accompagnée d'une déficience de neutrophiles, ainsi que l'altération de leur capacité de phagocytose due à l'apoptose accélérée des neutrophiles (Pitrak 1999). La dégranulation constitutive des neutrophiles chez les patients infectés par le VIH-1 a également été documentée (Meddows-Taylor, Martin *et al.* 1999). Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si l'altération des propriétés antivirales des neutrophiles peut être corrélée avec la progression de l'infection à VIH.

1.2.4.2 Cellules Th17

Les lymphocytes Th17 représentent une population de cellules T CD4⁺ récemment identifiée qui ont un rôle important dans l'immunité innée et adaptative (Kolls and Khader 2010; Reynolds, Angkasekwinai *et al.* 2010). Ces cellules sont la source principale de la cytokine pro-inflammatoire IL-17. Le récepteur de l'IL-17, IL-17R, est exprimé par les cellules épithéliales et l'engagement de cette voie peut stimuler indirectement l'infiltration des macrophages et des neutrophiles au sein des sites d'infection, *via* l'induction de la production de chimiokines spécifiques (*e.g.*, CCL20, CXCL8) (Dandekar, George *et al.* 2010). La différenciation des cellules Th17 est contrôlée par différents facteurs de transcription spécifiques, incluant ROR γ t, ROR α , STAT3 et IRF4 (Ivanov, McKenzie *et al.* 2006; Korn, Bettelli *et al.* 2009). Plusieurs études chez la souris ont montré la capacité des cytokines TGF- β et IL-6 à induire la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïves en Th17 (Veldhoen, Hocking *et al.* 2006; Stockinger, Veldhoen *et al.* 2007; Korn, Bettelli *et al.* 2009). En

contrepartie, chez l'homme, des études rapportent que les cytokines responsables de la différenciation en cellules Th17 sont la combinaison de l'IL-1 β et l'IL-23 (Wilson, Boniface *et al.* 2007), de l'IL-1 β et l'IL-6 (Acosta-Rodriguez, Napolitani *et al.* 2007), l'IL-21 ou encore l'IL-23 en présence de TGF- β (Manel, Unutmaz *et al.* 2008). La polarisation des cellules Th17 en absence de TGF- β génère la sous-population Th1/Th17 productrice d'IL-17 et d'IFN- γ (Acosta-Rodriguez, Napolitani *et al.* 2007; Wilson, Boniface *et al.* 2007). Cette sous-population exprime simultanément les facteurs de transcription ROR γ t et T-bet (Acosta-Rodriguez, Napolitani *et al.* 2007).

Une fois différenciés et recrutés dans les muqueuses, les lymphocytes Th17 agissent contre les bactéries et les champignons en sécrétant une multitude de cytokines telles que l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21, l'IL-22, IL-26, l'IL-4 et l'IFN- γ (Aujla, Chan *et al.* 2008). L'IL-17A et l'IL-22 coopèrent pour induire la production des protéines antimicrobiennes et de la chimiokine CCL20/MIP-3 α par les cellules épithéliales (Aujla, Chan *et al.* 2008; Godinez, Raffatellu *et al.* 2009). De façon importante, la chimiokine CCL20 lie CCR6, qui est un récepteur spécifiquement exprimé par les cellules Th17 (Hirota, Yoshitomi *et al.* 2007). Ce mécanisme pourrait contribuer indirectement à l'élimination des pathogènes tels que le VIH, en recrutant des cellules de l'immunité innée telles que les neutrophiles sécrétrices de défensines- α .

Les lymphocytes T CD4⁺ des muqueuses intestinales sont hautement activées, expriment le corécepteur CCR5 et sont hautement permissives à l'infection par le VIH (Brenchley *et al.* 2004 ; Mehandru *et al.* 2004;(Veazey and Lackner 2003). L'infection primaire à VIH est associée à une déplétion forte et précoce des lymphocytes T CD4⁺ à profil de polarisation Th17 au niveau du *GALT* (Brenchley, Paiardini *et al.* 2008; Macal, Sankaran *et al.* 2008; Favre, Lederer *et al.* 2009), indiquant ainsi la capacité du VIH à court-circuiter les mécanismes des défenses antimicrobiennes au niveau des muqueuses. Cela affaiblit l'orchestration des fonctions de la barrière épithéliale et semble contribuer à la susceptibilité subséquente aux infections opportunistes chez les patients infectés par le VIH (Dandekar, George *et al.* 2010). En effet, des études élégantes dans un modèle singe démontrent que l'infection à VIS induit la déplétion des cellules Th17 et ceci mène à l'augmentation de la translocation bactérienne à travers la barrière épithéliale (Raffatellu, Santos *et al.* 2008). Le mécanisme par lequel le VIS induit la déplétion des lymphocytes Th17 reste à clarifier, mais

peut inclure l'infection directe et/ou la diminution du recrutement de ces cellules dans les muqueuses, due à l'extinction de l'expression de CCL20 par les cellules épithéliales. Le fonctionnement exact des cellules Th17 au niveau du GALT durant la pathogenèse au VIH n'est pas tout à fait élucidé et reste à explorer. Cependant, notre équipe a récemment découvert que les cellules Th17, à phénotype CCR4⁺CCR6⁺, sont hautement permissives à l'infection par le VIH et a identifié le récepteur spécifique aux cellules Th17, CCR6, comme un marqueur de cellules T CD4⁺ mémoires hautement permissives à l'intégration de l'ADN viral chez les patients infectés par le VIH (Gosselin, Monteiro *et al.* 2010). De plus, notre groupe a démontré que le récepteur CCR6, mais pas l'intégrine $\alpha 4\beta 7$ est un marqueur des cellules T mémoires imprimées de façon stable avec un programme transcriptionnel favorable à la réplication du VIH (Monteiro, Gosselin *et al.* 2011). Ainsi, les lymphocytes Th17 jouent un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale et assurent une protection immunitaire de taille contre les différents agents pathogènes.

Il est important à noter qu'il existe une relation de différenciation entre les lymphocytes Th17 et les cellules Treg. Les lymphocytes Treg peuvent réduire l'activation immunitaire en limitant les réponses immunitaires adaptatives au VIH-1 (Choungnet and Shearer 2007). Elles ont été identifiées phénotypiquement dans le sang circulant et les tissus muqueux des patient infectés par le VIH-1 (Andersson, Boasso *et al.* 2005). Cependant, il n'est encore pas clair si la présence des lymphocytes Treg dans les tissus muqueux est la conséquence de l'inflammation ou si les cellules Treg promeuvent la dissémination virale en limitant les réponses adaptatives spécifiques au VIH. Toutefois, l'altération de la balance Th17/Treg au sein des muqueuses intestinales a été associée avec des signes multiples de la progression de l'infection à VIS (Favre, Lederer *et al.* 2009) et VIH (Favre, Stoddart *et al.* 2011). En conclusion, une meilleure compréhension de l'interaction des lymphocytes Th17 avec différentes cellules épithéliales et les lymphocytes Treg sera cruciale pour le développement de futures stratégies thérapeutiques visant la population Th17.

1.2.4.3 Cellules T CD8⁺

Durant le contrôle des infections virales persistantes, la présence accrue de lymphocytes T CD8⁺, nommés également cellules T cytotoxiques, est requise, afin d'assurer une efficacité maximale de la réponse immunitaire adaptative. Les cellules T CD8⁺ ont la capacité de lyser les cellules infectées et ceci *via* la production de protéines granzymes A et B

qui activent la voie de la mort cellulaire, induisant l'apoptose des cellules cibles. Cette réponse a été associée aux réponses antivirales contre le VIH-1 (Deeks and Walker 2007). Néanmoins, des controverses subsistent sur le lien existant entre les réponses T CD8⁺ et la progression de la maladie. La phase chronique de l'infection à VIH est caractérisée par la déplétion rapide des lymphocytes T CD4⁺; ce processus est souvent accompagné d'une expansion de lymphocytes cytotoxiques T CD8⁺ (Musey, Hu et al. 1997; Shacklett, Beadle *et al.* 2000), suggérant ainsi la contribution des cellules T cytotoxiques à la déplétion de cellules T CD4⁺. Les lymphocytes T CD8⁺ ont la caractéristique de cellules mémoires et expriment majoritairement le CCR5 (Shacklett, Cox *et al.* 2003), sachant que dans le GALT des individus infectés par le VIH on relève un fort taux de lymphocytes T CD4⁺CCR5⁺ (Olsson, Poles *et al.* 2000). De plus, les cellules T CD8⁺ expriment l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, permettant la rétention des cellules dans le GALT (Shacklett, Cox *et al.* 2003). Des études démontrent que les lymphocytes T CD8⁺ de la muqueuse rectale et du sang peuvent reconnaître des pools de peptides HIV (Ibarondo, Anton *et al.* 2005). De plus, pendant l'infection à VIH, malgré la sécrétion abondante de granzymes, les cellules T CD8⁺ rectales, comparées aux cellules T CD8⁺ du sang périphérique, secrètent faiblement les perforines (Shacklett, Cox *et al.* 2003; Quigley, Abel *et al.* 2006). Les lymphocytes CD8⁺ jouent un rôle important durant l'infection à VIH en induisant une réponse antivirale non cytotoxique *via* la production de CAF chez les patients LTNP, leur permettant ainsi de contrôler l'infection à VIH sans recourir à une thérapie (Levy 2003). En conclusion, les lymphocytes T cytotoxiques dans les muqueuses servent de bouclier de l'immunité adaptative contre diverses infections chroniques.

1.2.4.4 Chimiokines

Les chimiokines constituent une famille de cytokines avec des capacités de chimioattraction qui sont produites par la majorité des cellules hématopoïétiques et non-hématopoïétiques. Ce sont des molécules cationiques de petite taille moléculaire qui orchestrent les réponses immunitaires innées et adaptatives, en régulant la migration des cellules immunitaires effectrices vers les sites d'infection en périphérie et/ou vers les tissus lymphoïdes centraux. Les propriétés chimioattractantes leur permettent d'assumer aussi un rôle préminent dans l'homéostasie du système immunitaire. Les propriétés antimicrobiennes des chimiokines leurs permettent d'agir directement contre les bactéries gram positif et gram négatif (Yang, Chen *et al.* 2003; Linge, Collin *et al.* 2008; Ghosh, Shen *et al.* 2009). De plus, les chimiokines produites par les cellules épithéliales, telles que le MIP3 α /CCL20, l'IL-

8/CXCL8, le TECK/CCL25, le MIP1 α /CCL3, et RANTES/CCL5 régulent la migration des cellules du système immunitaire inné et adaptatif au niveau des muqueuses. Ci-dessous un tableau récapitulant les majeures chimiokines et les cellules qu'elles attirent (Tableau 1).

Tableau 1: Les chimiokines, leurs récepteurs et leurs cellules cibles

Famille	Chimiokines	Autres noms	Récepteurs	Cellules cibles
CXC	CXCL1	GRO α /MSA α	CXCR1, CXCR2	Neutrophils
	CXCL2	GRO β /MSA β	CXCR2	Neutrophils
	CXCL3	GRO γ /MSA γ	CXCR2	Neutrophils
	CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	Neutrophils
	CXCL12	SDF-1 α/β	CXCR4	Lymphocytes T, lymphocytes B, DC, monocytes
CC	CCL1	I-309 (TCA-3/P500)	CCR8	Monocytes
	CCL2	MCP-1 /MCAF	CCR2	Lymphocytes T, NK, DC, Monocytes, Basophiles
	CCL20	MIP3- α /ELC Exodus-3	CCR6	L DC, Th17
	CCL25	TECK	CCR9	Lymphocytes T, DC, Monocytes

Adapté du livre *Fondements de l'immunologie*, 7^e édition, par Delves, Martin, Burton et Roitt.

1.2.4.4.1 MIP-3 α /CCL20

La chimiokine CCL20 contribue au maintien de l'homéostasie des tissus lymphoïdes muqueux en attirant des lymphocytes, des cellules dendritiques immatures et les neutrophiles vers les muqueuses (Liao, Rabin *et al.* 1999; Schutyser, Struyf *et al.* 2003). Alors que certaines chimiokines peuvent se fixer à plusieurs récepteurs, le seul récepteur identifié pour la chimiokine CCL20 est le CCR6. Le CCR6, en revanche, peut fixer d'autres ligands tels que les hBDs mais avec une affinité considérablement plus faible qu'avec le CCL20 (Yang, Chertov *et al.* 1999). La chimiokine CCL20 est sécrétée par une variété de cellules épithéliales telles que les cellules épithéliales pulmonaires, intestinales et utérines. Cette

chimiokine est sécrétée de façon constitutive, mais son expression peut être fortement augmentée par des signaux pro-inflammatoires (Schutyser, Struyf *et al.* 2003), tels que le TNF- α et l'IL-1 β (Reibman, Hsu *et al.* 2003). Dans les tissus pulmonaires, plusieurs cellules produisent une large variété de chimiokines orchestrant le recrutement des cellules immunitaires vers les poumons. Par exemple, pendant une infection du poumon, les cellules épithéliales produisent plus de CCL20, induisant le recrutement des cellules CCR6⁺ vers les poumons, comme les DCs et les lymphocytes Th17 (Ito, Carson *et al.* 2011). La chimiokine CCL20 peut jouer plusieurs rôles différents après son induction par des signaux pro-inflammatoires. Cette chimiokine joue un rôle dans l'attraction des cellules T CCR6⁺, et elle exprime des fonctions antimicrobiennes par exemple en imperméabilisant les membranes bactériennes (Starner, Barker *et al.* 2003). Cette fonction antimicrobienne survient suite à la réponse aux agonistes des TLRs, par la protection de l'environnement local des microbes responsables de l'induction des pathogenèses invasives (Ito, Carson *et al.* 2011). La production de CCL20 au niveau des muqueuses intestinales s'intensifie suite au recrutement des cellules Th17 CCR6⁺ au niveau des muqueuses, qui produisent elles aussi du CCL20. Dans le cadre de l'infection à VIH, Gosh *et al.* ont démontré qu'au niveau du tractus reproductif de la femme le CCL20 est un important facteur endogène anti-HIV (Ghosh, Shen *et al.* 2009). De façon importante, il a été rapporté que pendant l'infection à SIV dans un modèle pathogène d'infection des singes macaques rhésus, le niveau d'ARNm de CCL20 diminue fortement comparé à celui des macaques non-infectés (Raffatellu, Santos *et al.* 2008). Pendant l'infection à VIH, la chimiokine CCL20 joue un rôle à double tranchant en induisant une réponse immunitaire innée, tout en contribuant à la propagation et à la dissémination du VIH *via* l'attraction des cellules cibles de l'infection, ce qui provoque l'infection systémique. Le double rôle de la chimiokine CCL20 a été mis en évidence suite à l'étude de l'effet du monolaurate de glycérol *in vivo* et *in vitro* sur des macaques par Li *et al.* (Li, Estes *et al.* 2009). Ainsi, la chimiokine CCL20 est un facteur endogène clé des muqueuses utérines et intestinales, ayant le potentiel d'inhiber le VIH-1 et de recruter les cellules du système immunitaire adaptatif à propriétés antivirales pour s'y disséminer. En l'occurrence, cibler la chimiokine CCL20 pour un but thérapeutique semble une perspective prometteuse pour le traitement des patients infectés par le VIH.

1.2.4.4.2 IL-8/CXCL8

L'interleukine 8 (CXCL8/IL-8) est une chimiokine produite par les macrophages, les fibroblastes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales. Cette chimiokine attire les neutrophiles, monocytes, mastocytes, kératinocytes, basophiles et éosinophiles *via* les récepteurs CXCR1 et le CXCR2 exprimés à la surface (Mahalingam and Karupiah 1999; Stillie, Farooq *et al.* 2009). Dans plusieurs types cellulaires, la synthèse de CXCL8 est fortement stimulée par l'IL-1 et le TNF- α , alors que les monocytes, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales produisent le CXCL8 en réponse à l'IL-17. CXCL8 est connue pour sa forte propriété chimioattractante envers les neutrophiles (Bickel 1993). Récemment, Pelletier *et al.* (Pelletier, Maggi *et al.* 2010) ont découvert que les cellules Th17 activées peuvent directement attirer les neutrophiles *via* la production de CXCL8 qui est biologiquement active. Pendant l'infection à VIH, la production de cytokines pro-inflammatoires, y compris le CXCL8 augmente afin de recruter les cellules immunitaires effectrices, et principalement les neutrophiles vers le site de l'inflammation, comme les sites muqueux (Kedzierska and Crowe 2001). En revanche, durant l'infection au SIV, l'équipe de Raffatellu *et al.* a démontré qu'il y avait une diminution du niveau d'ARNm (Raffatellu, Santos *et al.* 2008). En conclusion, la chimiokine CXCL8 est une protéine médiatrice de l'immunité innée au sein des muqueuses et a la capacité d'engendrer le recrutement de cellules de l'immunité adaptative. Cependant, des études plus approfondies sur cette molécule dans le cadre de l'infection à VIH sont à entreprendre pour assurer une meilleure compréhension de son rôle fonctionnel.

1.2.4.3. Cytokines régulatrices des fonctions cellulaires épithéliales

Les réponses inflammatoires au niveau des muqueuses sont critiques pour le maintien des mécanismes complexes assurant l'élimination de pathogènes extracellulaires, ainsi que la réparation et la régénération de tissus altérés. Cependant, l'activité inflammatoire à ce niveau peut mener à de multiples perturbations fonctionnelles et structurelles des barrières épithéliales intestinales et pulmonaires. Alors que plusieurs agents pathogènes peuvent provoquer l'inflammation au niveau des muqueuses pulmonaires et intestinales, des voies de signalisation communes contribuent au recrutement des cellules inflammatoires. Les cytokines jouent un rôle critique dans la régulation des réponses inflammatoires, et sont des facteurs importants qui influencent les réponses des cellules épithéliales face à différents pathogènes. Dans certains cas, les cytokines sont critiques à l'initiation de cascades inflammatoires, peuvent servir d'effecteurs primaires pour le recrutement cellulaire ou encore

faciliter la résorption de la barrière épithéliale et la résolution de l'inflammation (Driscoll 2000).

La cytokine TNF- α (*tumor necrosis factor*) peut causer la prolifération, la différenciation, l'inflammation ou encore la mort cellulaire. Cette cytokine a été initialement découverte dans le sérum de souris atteintes d'endotoxémie, et est reconnue pour ses activités anti-tumorales (Carswell, Old *et al.* 1975). Le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*) est l'une des cytokines éminentes agissant en tant qu'initiateur du processus inflammatoire, notamment au niveau du poumon et de l'intestin (Rich, Panuska *et al.* 1989). Le TNF- α s'attache aux récepteurs TNFR-1 (*TNF Receptor 1*) et TNFR-2 (*TNF Receptor 2*), et induit d'importants gènes pro-inflammatoires tels que le gène du CXCL-8, CCL20 et de l'IL-6 (Heness, van Thoor *et al.* 2006 ; Hartupee, Liu *et al.* 2007; Lee, Wang *et al.* 2008), ainsi que l'expression de molécules d'adhésion telles que ICAM-1, VCAM-1, E-selectin par les cellules endothéliales (Chen and Manning 1995; Collins, Read *et al.* 1995), enfin ICAM-1 et les intégrines par les leucocytes (Subauste, Choi *et al.* 2001). Le TNF- α est produit par de nombreuses cellules, parmi lesquelles on compte les macrophages activés, les lymphocytes T et les cellules épithéliales.

L'IL-1 β représente une des cytokines les plus importantes qui induit l'inflammation, et sa production exacerbée est associée à différentes pathologies, telles que les infections virales, la maladie de Crohn, la sclérose en plaques, l'arthrite, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Eder 2009). L'IL-1 β exerce une multitude d'effets biologiques, car elle induit des réponses immunitaires efficaces contre les infections microbiennes mais peut aussi avoir des effets nuisibles. Par exemple, l'IL-1 β facilite les invasions tumorales (Apte, Dotan *et al.* 2006), et promeut les dommages tissulaires durant les pathogénèses à inflammations chroniques. L'IL-1 β est produite par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques sous forme d'un précurseur inactif (pro-IL-1 β) qui doit être clivé par la cystéine protéase Caspase-1 (précédemment nommée ICE, *IL-1 β converting enzyme*) pour générer la forme active de l'IL-1 β (Fantuzzi and Dinarello 1999). La production et la sécrétion de cette cytokine est induite par une large variété de stimuli que l'on peut diviser en deux groupes: les PAMPs (*Pathogen-associated molecules pattern molecules*) qui proviennent des micro-organismes externes (LPS) et les DAMPs (*Damage-associated molecular pattern*) qui proviennent des ligands endogènes sécrétés par des cellules endommagées ou en processus de mort cellulaire (Lotze, Zeh *et al.* 2007).

Les cellules épithéliales pulmonaires et intestinales produisent les chimiokines CCL20 à des taux basaux faibles. Cette production peut être fortement induite par les cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-1 β (Reibman, Hsu *et al.* 2003), et à travers l'activation des TLRs (Fujiie, Hieshima *et al.* 2001). En conclusion, les cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β assurent un rôle de taille dans la régulation des fonctions des cellules épithéliales. En effet, leurs effets sur la production de chimiokines attractrices des cellules spécifiques de l'immunité innée et adaptative s'avèrent indispensables pour le maintien d'un système immunitaire fonctionnel et stable au niveau des muqueuses.

1.2.5 Altération fonctionnelle des cellules épithéliales et translocation microbienne lors de l'infection à VIH-1

Les muqueuses intestinales et vaginales abritent la majorité des tissus lymphoïdes du système immunitaire qui a été conçu de manière à lutter contre les pathogènes externes, tout en contrôlant l'inflammation et l'activation immunitaire survenant après l'élimination du pathogène (Dandekar, George *et al.* 2010). Dans des conditions physiologiques, les cellules Th17 contribuent au maintien de la perméabilité et de l'intégrité de la barrière épithéliale, en sécrétant l'IL-17 et l'IL-22, deux cytokines impliquées dans la production des protéines des jonctions serrées (Dandekar, George *et al.* 2010). En revanche, lors des phases précoces de l'infection à VIH on observe une déplétion importante des lymphocytes Th17 au niveau du GALT (Brenchley and Douek 2008; Macal, Sankaran *et al.* 2008). La barrière épithéliale est par la suite altérée et présente des brèches qui laissent passer les bactéries commensales intestinales ainsi que tout autre type de pathogènes (Gordon 2008; Dandekar, George *et al.* 2010). La translocation bactérienne a été associée avec une activation pathologique du système immunitaire durant la phase chronique de l'infection à VIH (Brenchley, Price *et al.* 2006). Pour expliquer les conditions responsables de l'altération de la barrière épithéliale, Estes *et al.* ont prouvé que la forte translocation microbienne chez les macaques rhésus infectés par le VIS était la conséquence des dommages de la barrière épithéliale du tractus gastro-intestinal; dans ces conditions le système immunitaire de l'hôte ne pouvait éliminer le grand nombre de bactéries transposées, aboutissant à l'activation immunitaire persistante (Estes, Harris *et al.* 2010). Par extrapolation, cette explication est valable dans le cadre de l'infection à VIH. Même si la relation directe cause/effet entre la translocation bactérienne et la progression de l'infection à VIH est encore mise en question dans le domaine, la présence

des produits bactériens dans le plasma des sujets infectés par le VIH corrèle positivement avec le taux des marqueurs d'activation monocytaire (*e.g.*, sCD14, MCP-1/CCL2, IL-6) et la gravité des atteintes neurocognitives chez les sujets au stade SIDA (Ancuta, Kamat *et al.* 2008).

En conclusion, le VIH est la source des défauts fonctionnels engendrés à la barrière épithéliale servant de bouclier contre de multiples pathogènes, y compris le VIH. Chez les individus VIH positifs, la dysfonction des cellules épithéliales est la cause de la susceptibilité aux infections opportunistes et d'une forte déplétion des cellules Th17, qui serait la cause de l'altération des réponses immunitaires subséquentes. Les cellules épithéliales jouent donc un rôle clé dans le maintien de l'immunité des muqueuses. Cependant, une meilleure compréhension du rôle exact des lymphocytes Th17, et leur interaction avec les cellules épithéliales dans le maintien de l'intégrité et des fonctions des cellules épithéliales est cruciale au développement de futures stratégies thérapeutiques efficaces, ayant pour but de renouveler les cellules épithéliales des muqueuses chez les patients infectés par le VIH.

2. Hypothèse et Objectifs

2.1 Hypothèse:

Les cellules Th17 jouent un rôle important dans le maintien de l'homéostasie mucoale en faisant le lien entre l'immunité innée et adaptative (Kolls and Khader 2010; Reynolds, Angkasekwinai *et al.* 2010). *Via* leur production d'IL-17, les cellules Th17 agissent sur les cellules épithéliales et augmentent leurs capacité à recruter des neutrophiles et des cellules Th17 au sites d'infection muqueux. La fréquence des cellules Th17 est fortement diminuée au niveau des tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT, *gut-associated lymphoid tissues*) mais non pas au niveau des poumons des sujets infectés par le VIH (Brenchley, Paiardini *et al.* 2008). Ceci s'accompagne d'une altération de la perméabilité de la barrière mucoale intestinale, conduisant ainsi à la translocation microbienne (Brenchley, Price *et al.* 2006), qui est une cause d'activation immunitaire chronique et d'évolution vers le SIDA (Brenchley, Price *et al.* 2006). Les mécanismes responsables de la déplétion des cellules Th17 du GALT chez les patients infectés par le VIH incluent la perturbation du trafic cellulaire vers l'intestin. La domiciliation des cellules Th17 dans le GALT peut être induite par des chimiokines ligands de CCR6 (MIP-3 α /CCL20 et les defensines- β) et de CCR9 (TARC/CCL25), produits par les cellules épithéliales intestinales.

Dans ce contexte, nous avons émis l'**hypothèse** selon laquelle **le VIH interfère avec la capacité des cellules épithéliales intestinales et non pas pulmonaires à produire des chimiokines responsables de l'attraction des cellules Th17.**

2.2 Objectifs :

Objectif 1 : Explorer la capacité des cellules épithéliales intestinales *versus* pulmonaires à produire des chimiokines spécifiques pour les cellules Th17 et à répondre à l'IL-17

Objectif 2 : Mesurer la permissivité des cellules épithéliales intestinales *versus* pulmonaires à l'infection par le VIH *in vitro*

Objectif 3 : Déterminer l'impact du VIH sur la production de chimiokines spécifiques pour les cellules Th17 par les cellules épithéliales intestinales *versus* pulmonaires

3. Matériel et Méthodes

3.1 Culture cellulaire

3.1.1 Cellules MAGI CD4⁺CCR5⁺LTR/ β -Gal⁺

Les cellules MAGI (*NIH AIDS Reagents Program*, Georgetown, MD, États-Unis) sont originaires des cellules HeLa, une lignée cellulaire cancéreuse provenant d'un prélèvement de métastase effectué sur une patiente, Henrietta Lacks, atteinte d'un cancer du col de l'utérus et décédée en 1951. Les cellules MAGI expriment le CXCR4 de façon constitutive et sont transfectées de façon stable pour exprimer le récepteur du VIH CD4 (associé au gène de résistance à l'antibiotique G418 (Sigma, Canada), le corécepteur du VIH CCR5 (associé au gène de résistance à l'antibiotique Puromycin (Sigma)), et le gène de b-galactosidase sous le contrôle du promoteur LTR du VIH (associé au gène de résistance à l'antibiotique Hygromycin (Sigma)). Les cellules MAGI ont été cultivées dans du milieu DMEM (GIBCO, Grand Island, NY, États-Unis) à 10% FBS (Sigma) et 1% Pénicilline et Streptomycine (GIBCO). Vingt-quatre heures après la décongélation, on ajoute les trois antibiotiques de sélection, G418 (200 μ g/ml), Puromycin (1 μ g/ml), et Hygromycin (1 μ g/ml). Les cellules ($2,5 \cdot 10^6$) sont cultivées dans des boîtes de cultures de 25 (T25) ou de 75 cm² (T75) (Nunc, USA), et arrivent à confluence au bout de 4 à 5 jours. Le milieu contenant les trois antibiotiques de sélection est alors changé tous les deux jours. Une fois à confluence, les cellules sont détachées à l'aide de la trypsine (0.25% trypsine et 0,53 mM EDTA (*Acide éthylène diamine tétracétique*) (GIBCO) sauf pour les expériences de cytométrie en flux, où on utilise à la place une solution EDTA 2 mM (Versene; Gibco) pour éviter l'altération des protéines exprimées en surface. Ces cellules MAGI ont été utilisées comme contrôle positif pour les expériences d'infection par le VIH.

3.1.2 Les cellules épithéliales d'origine intestinale HT-29

Les cellules HT-29 (ATCC, Manassas VA, États-Unis) sont des cellules épithéliales intestinales humaines originaires d'un adénocarcinome du niveau du côlon. Ces cellules ont été cultivées dans le milieu McCoy's (ATCC) à 10% FBS (Sigma), et 1% Pénicilline et Streptomycine (GIBCO) dans des boîtes de culture T75 (Nunc). Les cellules sont repiquées tous les 4 à 5 jours et détachées à l'aide de la trypsine 0.25%, 0,53 mM EDTA, sauf pour les expériences de cytométrie en flux au cours desquelles les cellules ont été détachées en utilisant le Versene.

3.1.3 Les cellules épithéliales d'origine alvéolaire A549

Les cellules A549 (ATCC) sont des cellules épithéliales alvéolaires, originaires d'un adénocarcinome pulmonaire d'un homme de 58 ans. La culture des cellules a été initiée en 1972 par Lieber M. *et al.* (Lieber, Smith *et al.* 1976). Les cellules ont été cultivées dans le milieu F-12K (GIBCO) contenant 10% FBS (Sigma) et 1% Pénicilline et Streptomycine (Gibeco, Grand Island, NY, États-Unis), dans des boîtes de culture T75 (Nunc). Les cellules ont été repiquées tous les 4 à 5 jours et détachées à l'aide de la trypsine, sauf pour les expériences de cytométrie en flux pour lesquelles le Versene a été utilisé.

3.2 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui permet d'analyser l'expression de la fluorescence sur des cellules qui défilent à grande vitesse devant un faisceau laser. Les différentes populations cellulaires sont alors classées, et les cellules peuvent être analysées et/ou triées selon l'expression de la fluorescence. Le développement de cette technique a été critique pour le domaine de l'immunologie et a suivi la découverte des anticorps monoclonaux. Les anticorps monoclonaux peuvent être dirigés contre des molécules exprimées à la surface ou à l'intérieur des cellules et peuvent être directement couplés à des fluorochromes. Les avancées actuelles en cytométrie en flux permettent l'identification de >18 fluorochromes différents sur une même cellule. Le cytomètre en flux BD LSR II permet la détection de 10 fluorochromes (Tableau 2).

Tableau 2: Caractéristiques du cytomètre en flux LSR II (Becton Dickinson)

Lasers	Détecteurs	Filtres	Parameters/Fluorochromes
	FSC		<i>Forward Scatter</i>
Bleu 488 nm	SSC	488/10	<i>Side Scatter</i>
	F	530/30	FITC, CFSE, GFP, Alexa-488
	E	575/26	PE, PI
	D	610/20	PE-TxR
	C	675/14	PE-Cy5, PerCP
	B	710/20	PerCp-Cy5.5, PR-Cy5.5
	A	780/40	PE-Cy7
Rouge 633 nm	C	660/20	APC, Cy5, Alexa-647
	B	720/30	APC-Cy5.5, Alexa-680, Alexa-700
	A	780/60	APC-Cy7
Violet 407 nm	B	440/40	Alexa-405, Pacific Blue, Cascade Blue
	A	525/50	Alexa-430, CFP, AMCyan

Forward Scatter, taille ; Side Scatter, granularité; PE, phycoérythrine ; FITC, isothiocyanate de fluorescéine

3.2.1 Analyse phénotypique par cytométrie en flux

Les cellules épithéliales intestinales (HT-29), pulmonaires alvéolaires (A549) et utérines (MAGI), ont été détachées en utilisant une solution de 2 mM EDTA (Versene) et lavées avec le tampon FACS (PBS 1X, 10 % FBS (volume /volume), 0,02% (poids/volume) azide de sodium). Les cellules ont été par la suite marquées avec des Acs spécifiques pour la détection des protéines membranaires, et selon l'objectif respectif de chaque expérience, pendant 20 minutes à 4°C et à l'abri de la lumière. Les cocktails d'Acs utilisés sont décrits dans le Tableau 3 ci-dessous. Après marquage, l'excès d'Acs a été éliminé en lavant les cellules avec le tampon FACS. Les cellules ont été par la suite fixées au tampon de fixation (tampon FACS, 2 % formaldéhyde (Sigma)). L'analyse de l'expression des différentes molécules a été effectuée à l'aide d'un cytomètre en flux LSRII à 10 couleurs (BD, Franklin Lakes, NJ, États-Unis). La fenêtre de positivité pour un Acs a été déterminée en utilisant les cellules sans marquage et/ou des cellules marquées avec un contrôle isotypique. De plus, pour les marquages multi-couleurs, les fenêtres de positivité ont été définies en fonction du seuil de fluorescence en absence d'un seul anticorps, soit FMO pour *Fluorescence minus one* (Roederer 2001).

Tableau 3: Caractérisation phénotypique des cellules épithéliales

Anticorps	Fluorochromes	Compagnie	Titre optimal
M anti-H CD4	Alexa 700	BD Biosciences	0,5 µl/10 ⁶ cellules
M anti-H CD184/CXCR4	PE	BD Pharmingen	5 µl/10 ⁶ cellules
M anti-H CD195/CCR5	FITC	BD Pharmingen	7.5 µl/0.5×10 ⁶ cellules
M anti-H CD326/EpCAM	PE	Miltenyi Biotec	5 µl/0.5×10 ⁶ cellules
M anti-H CD217/IL-17RA	PE	eBioscience	5 µl/0.5×10 ⁶ cellules

M, mouse ; H, human

3.3 PCR en temps réel quantitative SYBR Green

La quantification de l'expression des gènes CD4, CXCR4 et CCR5 par les cellules épithéliales des différentes origines a été faite par RT-PCR en temps réel. L'ARN total des différentes cellules épithéliales a été isolé à l'aide de la trousse RNeasy de Qiagen (Ambion, Inc. Austin, Texas, États-Unis). Brièvement, les cellules ont été lysées à l'aide du tampon RLT contenant du β-mercaptoéthanol. L'ARN total a été isolé en utilisant des colonnes d'affinité. La concentration de l'ARN élué de la colonne a été mesurée par un

spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, États-Unis). L'expression des différents gènes a été quantifiée par RT-PCR en temps réel (Light Cycler 1.5 (Roche)) en utilisant une trousse d'amplification RT et PCR en une seule tube contenant le fluorochrome SYBR Green (une molécule pouvant se fixer sur tous les types d'acides nucléique double brins et devenant alors un très bon fluorophore), selon les recommandations du manufacturier (*One step RT-PCR SYBR Green kit*, Qiagen). Les paires d'amorces pour CD4 et CXCR4 ont été achetées chez Qiagen. Les séquences des amorces pour le CCR5 (sens: GTCTTCATTACACCTGCAGCTA; anti-sens: GTGAAGATAAGCCTCACAGCC; (Quillent, Oberlin *et al.* 1998) et l'ARN ribosomal 28S (RRN28S; sens, 5'-CGAGATTCCCCTGTCCCTA-3' ; anti-sens, 5'-GGGGCCTCCCCTTATTCTA-3' ; (Lu, Pan *et al.* 2004) ont été décrites dans la littérature et achetées chez IDT. Pour résumer, 5 ng d'ARN total ont été rétrotranscrits dans 20 µl d'une mixture de SYBR Green contenant 5µM d'amorces, des nucléotides, la transcriptase inverse et la polymérase. Afin de déterminer la taille du produit d'amplification et pour pouvoir purifier la bande d'ADN complémentaire (ADNc), nous avons effectué une électrophorèse sur gel d'agarose. La bande d'ADNc a été coupée et extraite du gel d'agarose. L'ADNc a été utilisé pour la préparation de la courbe standard (40 fg, 4 fg, 0.4 fg, 0,04 fg, 0.004 fg et 0.0004 fg/réaction), permettant ainsi la quantification absolue de l'expression du gène ciblé. L'analyse de la courbe de fusion a été effectuée pour chaque produit d'amplification et révèle l'uniformité du profil de la dissociation thermique par produit d'amplification. L'expression relative de chaque gène a été normalisée avec les niveaux d'ARN ribosomal 28S. Chaque réaction de PCR en temps réel a été effectuée en *triplicata*.

3.4 Souches de VIH-1 utilisées et infection

Les souches NL4.3BaL GFP à tropisme CCR5 (R5) et la souche NL4.3 GFP à tropisme CXCR4 (X4) du VIH ont été produites par transfection des cellules 293T avec l'ADN plasmidique contenant le génome complet de ces virus en utilisant le réactif de transfection Fugene6 (Roche), selon les recommandations du manufacturier. Les surnageants de cultures ont été récupérés 48 heures plus tard et la concentration du stock viral a été mesurée par ELISA spécifique pour la protéine p24 du VIH-1 (Gosselin, Monteiro *et al.* 2010). L'infectiosité des stocks viraux a été testée en utilisant les cellules MAGI CD4⁺CCR5⁺LTR/β-Gal⁺ comme cellules indicatrices pour l'infection (Kimpton and Emerman 1992). Les cellules épithéliales ont été cultivées dans des plaques de 48 puits

(Costar), à raison de 50 000 cellules/puits (A549 et MAGI) et 100 000 cellules/puits (HT-29) pour 1 jour pour atteindre 80 % de confluence. Les cellules à environ 80% de confluence ont été exposées aux souches virales R5 et X4 (50 ng de protéine p24 de VIH par 0.3 ml milieu/puits) pendant 3 heures. Le volume a été par la suite complété à 1ml/puits avec du milieu de culture, et les plaques ont été incubées pendant une nuit. Le deuxième jour, les cellules ont été lavées trois fois avec 1 ml de milieu de culture, et ensuite stimulées par des combinaisons de cytokines IL-1 β , TNF- α et l'IL-17A. Deux jours après cette stimulation, les surnageants ont été récupérés, préservés à -20 °C, et la production de différentes cytokines a été quantifiée par ELISA. En parallèle, les culots cellulaires ont été préservés secs à -80 °C pour la quantification de l'ADN proviral par PCR en temps réel.

3.4.1 Détection des cytokines

Les chimiokines CCL20, IL-8, et CCL25 ont été quantifiées dans les surnageants des cellules épithéliales à l'aide de tests ELISA commerciaux (R&D Systems, Minneapolis MN, États-Unis). Pour chaque test ELISA la dilution optimale des surnageants a été déterminée lors des expériences préliminaires sur un nombre réduit d'échantillons. Les dilutions de la gamme standard ont été celles recommandées par le fabricant : CCL20 (dilutions au demi de 1 000 à 15.62 pg/ml); l'IL-8 (dilutions au demi de 2,000 à 31.25 pg/ml); CCL25 (dilutions au demi de 8,000 à 31.25 pg/ml). Par la suite, les surnageants dilués et les dilutions de la gamme standard ont été ajoutés à la plaque de 96 puits, préalablement recouverte d'Acs spécifiques aux chimiokines testées, pendant 2 heures à température ambiante. Après une série de 4 lavages consécutifs, l'Acs anti-cytokine couplé à la biotine (100 μ l/puits) a été rajouté dans chaque puits et la plaque a été incubée une heure à température ambiante. La plaque a été lavée quatre fois et la solution d'avidine-HRP (100 μ l/puits) (HRP, *horseradish peroxidase*) a été rajoutée pour un maximum de 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Puis la solution d'arrêt (50 μ l/puits) a été rajoutée. Finalement, la plaque a été soumise à une lecture de densité optique grâce au lecteur ELISA et à une absorbance de 450nm (Bio-Rad Hercules, CA, États-Unis). La densité optique des échantillons a été utilisée pour déterminer la concentration par rapport à la courbe standard.

3.4.2 PCR en temps réel pour la quantification de l'ADN proviral du VIH-1

La quantification de l'ADN total et intégré a été effectuée par PCR nichée en temps réel en utilisant la technique FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) et le LightCycler

1.5 (Roche), comme décrit précédemment par notre groupe (Gosselin, Monteiro *et al.* 2010), en utilisant les réactifs inclus dans le Tableau 4. Brièvement, cette technique utilise deux paires d'amorces spécifiques, une interne et une externe, pour la PCR nichée; deux sondes complémentaires au produit d'amplification juxtaposées, une associée à un fluorochrome donneur (Fluorescéine) et une autre associée à un fluorochrome accepteur (Light Cycler (LC) Red 640 ou le LC Red 705) sont utilisées pour la détection au Light cycler des produits d'amplification (Chomont, El-Far *et al.* 2009). Les cellules épithéliales MAGI, HT-29 et A549 exposées au VIH ont été lysées dans un tampon contenant la protéinase K (Invitrogen, Grand Island, NY, États-Unis) (45 µl de tampon/30 000 cellules. 5 µl de lysat cellulaire a été utilisé pour l'amplification PCR. L'ADN proviral a été amplifié en utilisant deux amorces Alu (Alu 1 et Alu 2) et une amorce spécifique pour la séquence LTR du VIH (Amorce LM667 associée à un fragment λT, Tableau 4). Le gène CD3 a été amplifié simultanément dans le même tube à l'aide d'amorces spécifiques (Tableau 4). Pour cela 12 cycles d'amplification ont été réalisés (1 min à 95 °C, 1 min à 55 °C, et 10 min à 72 °C), précédés d'une étape de dénaturation de 8 minutes à 95 °C et suivi d'une étape d'élongation de 15 min à 72 °C. Les produits d'amplification du VIH et du CD3 issus de la première PCR ont été par la suite ré-amplifiés séparément à l'aide du Light Cycler 1.5 (Roche Diagnostics). Pour l'ADN proviral, une amorce complémentaire à la séquence λT et autre amorce complémentaire à la région U5 du LTR du VIH (AA55M), ensemble avec deux sondes spécifiques pour le LTR du VIH sont utilisées (Brussel, JV, 2003) (Tableau 4). 50 cycles d'amplification ont été réalisés (10 secondes à 95 °C, 10 secondes à 60 °C, et 9 secondes à 72 °C), précédés d'une étape de dénaturation de 4 minutes à 95 °C. Pour l'amplification du gène CD3, deux amorces internes et deux sondes spécifiques ont été utilisées (Tableau 4). 40 cycles d'amplification ont été réalisés (8 secondes à 95 °C, 10 secondes à 60 °C, et 15 secondes à 72 °C), précédés d'une étape de dénaturation de 4 minutes à 95 °C. Les réactions PCR ont été réalisées en triplicata et en utilisant les réactifs JumpStart Taq Ready Mix (Sigma) et Taq polymérase (Invitrogen). Pour la courbe standard, des cellules ACH2 (*NIH AIDS Research and Reference Reagent Program*) portant une copie d'ADN proviral par cellule ont été utilisées. Les cellules A3.01 non-infectées ont été utilisées comme contrôle négatif. Les résultats ont été exprimés en nombre de copies d'ADN proviral/10⁶ cellules en considérant 2 copies de CD3 par cellule.

Tableau 4: PCR en temps réel pour la quantification de l'ADN proviral

Amorces et sondes	Séquences	T _m
Amorce sens HCD3-externe	5'-ACT GAC ATG GAA CAG GGG AAG-3'	60 °C
Amorce anti-sens HCD3-externe	5'-CCA GCT CTG AAG TAG GGA ACA TAT-3'	60.3 °C
Amorce sens HCD3 interne	5'-GGCTATCATCATTCTTCTTCAAGGT-3'	56.3 °C
Amorce anti-sens HCD3-interne	5'-CCTCTCTTCAGCCATTTAAGTA-3'	56.3 °C
Sonde #1 CD3 Fluorescéine (donneur)	5'GGC TGA AGG TTA GGG ATA CCA ATA TTC CTG TCT C-3'-Fluorescéine	66.9 °C
Sonde #2 CD3 LC Red 705 (accepteur)	LC Red 705 5'-CTA GTG ATG GGC TCT TCC CTT GAG CCC TTC-3'-Phosphate	68.9 °C
Amorce LM667-λT	5'-ATG CCA CGT AAG CGA AAC TCT GGC TAA CTA GGG AAC CCA CTG-3'	65.3 °C
Amorce Alu 1	5'-TCC CAG CTA CTG GGG AGG CTG AGG-3'	68.8 °C
Amorce Alu 2	5'-GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G-3'	65.3 °C
Amorce λT	5'-ATG CCA CGT AAG CGA AAC T-3'	55.4 °C
Amorce anti-sens AA55M	5'-GCT AGA GAT TTT CCA CAC TGA CTA A-3'	58.7 °C
Sonde #1 LTR VIH Fluorescéine (donneur)	5'-CAC AAC AGA CGG GCA CAC ACT ACT TGA-3'-Fluorescéine	65 °C
Sonde #2 LTR VIH LC Red 705 (accepteur)	LC Red 640 5'-CAC TCA AGG CAA GCT TTA TTG AGG C-3'-Phosphate	62 °C

LC, *light cycler*; T_m, *melting temperature* pour température de fusion; amorce LM667-λT spécifique au LTR, amorce AA55M spécifique au LTR, amorce λT spécifique pour la séquence λ située sur l'amorce LM667. Protocol adapté par Dr Nicolas Chomont (Chomont, El-Far *et al.* 2009) à partir de la technique mise au point par Brussel et al (Brussel and Sonigo *et al.* 2003).

3.5 Microscopie confocale

Les cellules épithéliales ont été cultivées sur des lames en verre à 8 puits (1 et 5.10⁵ cellules/puits; CultureSlide Biocoat, BD Bioscience) recouverts de Poly-L-Lysine (concentration 0.002%; SIGMA) pendant une nuit à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules ont été fixées avec de la PFA à 3.7% pendant 15 minutes à température ambiante. La saturation des sites non spécifiques de fixation des Acs a été réalisée par incubation des cellules fixées avec une solution de BSA à 1mg/ml, pendant une heure à température ambiante. Les Acs primaires de souris anti-protéines humaines utilisés ont été les suivants : anti-CCR5 (clone 2D7/CCR5), anti-CXCR4 (clone 12G5) et anti-CD4 (clone RPA-T4) BD Pharmingen. Après lavage en PBS, les cellules fixées ont été incubées avec les Acs primaires (dilution 1/100) pendant deux heures à température ambiante. Après lavage en PBS, un Acs secondaire de chèvre anti-IgG

de souris couplé à la cyanine-3 (Cy3) (dilution 1/250) a été rajouté et incubé avec les cellules à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. Après lavage en PBS, un marquage nucléaire a été réalisé par incubation des cellules avec une solution de 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI, une molécule fluorescente capable de se lier fortement à l'ADN; Sigma) à 0,15 µg/ml pendant 10 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Après lavage en PBS, la chambre de culture a été éjectée et une lamelle a été montée sur le dessus de la lame à l'aide d'un milieu de montage commercial (Prolong Antifade Kit; Invitrogen). Les lames ont été ensuite observées à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence (Zeiss Axio Cell Observer Z1 SD). Les images ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, États-Unis).

4. Résultats

4.1 Rôle des cellules épithéliales intestinales et pulmonaires dans le recrutement des cellules Th17 et des neutrophiles aux sites d'inflammation

L'objectif majeur de ce travail est de déterminer l'effet du VIH sur le recrutement des cellules Th17 et des neutrophiles par les cellules épithéliales intestinales *versus* pulmonaires.

4.1.1 Production de chimiokines spécifiques pour les cellules Th17 et les neutrophiles par les cellules épithéliales intestinales et pulmonaires

Les cellules épithéliales ont le potentiel de produire des chimiokines ligands de CCR6 (CCL20/MIP-3 α et défensines- β) et CCR9 (CCL25/TECK) et CXCR1/2 (CXCL8/IL-8) qui sont les ligands respectifs des cellules Th17 et des neutrophiles. Dans notre étude, nous avons d'abord mesuré la production des chimiokines CCL20 et CXCL8 par deux lignées, les cellules intestinales (lignée cellulaire HT-29) et alvéolaires (lignée cellulaire A549) en réponse aux stimulations par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α à différentes concentrations (*e.g.*, 1, 10 et 100 ng/ml). Les cellules épithéliales d'origine utérine (MAGI CD4+CCR5+LTR/ β -Gal+) ont été utilisées en parallèle comme contrôle (Kimpton and Emerman 1992). L'ajout des cytokines recombinantes nous a permis de simuler les conditions pro-inflammatoires que subissent les cellules épithéliales pendant l'homéostasie et/ou l'infection à VIH.

Dans une première étape, les cellules épithéliales ont été testées pour leur capacité à produire du CCL20. La production de CCL20 a été mesurée dans les surnageants des cultures récoltés après 18 heures de stimulation, en utilisant la technique ELISA et un kit de détection commercial (voir Matériel et Méthodes). Les résultats obtenus ont permis d'étudier la capacité des cytokines recombinantes IL-1 β et TNF- α à induire la production des chimiokines, ainsi que de déterminer la concentration optimale des cytokines recombinantes nécessaire pour induire la production de chimiokines par les cellules HT-29 et A549 (Figures 7 et 8). Les cellules intestinales HT-29 et alvéolaires A549 répondent fortement à l'IL-1 β en termes de production de CCL20 indépendamment de la dose utilisée, avec une production maximale observée en réponse à 1 ng/ml IL-1 β (Figure 6A et B, barres blanches). Au contraire, le TNF- α induit la production de CCL20 de façon dépendante de la dose, avec une production maximale observée en réponse à 100 ng/ml TNF- α (Figure 6A et B, barres grises). Les cellules utérines MAGI quant à elles produisent des quantités très faibles ou indétectables de CCL20 en réponse à la stimulation respective par le TNF- α ou l'IL-1 β (Figure 6C). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les cellules MAGI sont une lignée cellulaire

cancéreuse infectée avec le virus du papillome humain (VPH), dans la mesure où il est connu que le VPH diminue fortement la production de CCL20 dans les cellules kératinocytes (Guess and McCance 2005).

Dans une deuxième étape, la production de CXCL8 a été quantifiée dans les surnageants de culture en utilisant la même technique ELISA et un kit commercial de détection (voir Matériel et Méthodes). Nos résultats démontrent que les cellules HT-29 produisent peu de CXCL8 en réponse à l'IL-1 β , alors que la production de CXCL8 augmente de façon dépendante de la dose lorsque les cellules sont stimulées par le TNF- α , avec une production maximale observée en réponse à 100 ng/ml TNF- α (Figure 7A). Quant aux cellules A549, elles produisent de forts taux de CXCL8 en réponse à l'IL-1 β , indépendamment de la dose utilisée, alors que le TNF- α induit la production de CXCL8 de façon dépendante de la dose, avec une production maximale observée en réponse à 100 ng/ml TNF- α (Figure 7B).

En conclusion, nos résultats démontrent que les cellules intestinales HT-29 et les cellules pulmonaires A549 produisent des niveaux similaires de CCL20 dans des conditions pro-inflammatoires. Nous démontrons aussi que l'IL-1 β est un stimulus plus fort dans l'induction de CCL20 comparé au TNF- α . Nos résultats révèlent des différences quant à la production de CXCL8 par les deux types de cellules épithéliales intestinales *versus* alvéolaires. Ainsi, les cellules HT-29 produisent du CXCL8 en réponse à la stimulation par le TNF- α et très peu en réponse à la stimulation par l'IL-1 β , alors que les deux cytokines pro-inflammatoires induisent la production de CXCL8 dans les cellules A549, mais à des doses différentes. Ces résultats suggèrent que la capacité de cellules épithéliales et alvéolaire à attirer des cellules Th17 et/ou des neutrophiles aux sites d'inflammation est régulée de façon différentielle par l'IL-1 β et/ou TNF- α .

Finalement, nous avons également quantifié la production de CCL25 et de hBD2 par les cellules épithéliales intestinales HT-29 et les cellules alvéolaires A549 en utilisant un test ELISA et les mêmes conditions de stimulation. Toutefois, nos résultats démontrent des quantités extrêmement faibles (<23 pg) ou l'absence de ces cytokines dans le milieu de culture cellulaire (résultats non-publiés). Ainsi, nous n'avons plus poursuivi l'étude de ces chimiokines par la suite.

4.1.2 Effet synergique de l'IL-17 et du TNF- α dans l'induction de la production de CCL20 par les cellules épithéliales intestinales et non pas alvéolaires

La communication entre les cellules épithéliales et les cellules Th17 est essentielle pour le maintien de l'immunité des muqueuses (Shacklett 2008). La communication entre ces deux types cellulaires se fait *via* la cytokine IL-17 (McAleer and Kolls 2011). Des études précédentes ont démontré la capacité de l'IL-17 à agir en synergie avec le TNF- α pour induire l'expression de l'ARNm de CCL20 et de CXCL8 (Lee, Wang *et al.* 2008). Ainsi, l'IL-17 exerce un effet positif sur la production épithéliale des cytokines qui attirent les cellules Th17 et les neutrophiles aux sites d'inflammation (Lee, Wang *et al.* 2008). Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet synergique du TNF- α et de l'IL-17 sur la production de CCL20 et de CXCL8 par les cellules épithéliales intestinales *versus* alvéolaires et la capacité des cytokines pro-inflammatoires (*i.e.*, TNF- α et IL-1 β) à augmenter l'expression du récepteur à l'IL-17 (IL-17RA).

Nos résultats démontrent qu'il existe effectivement un effet synergique entre le TNF- α et l'IL-17 sur la production de CCL20 par les cellules épithéliales intestinales HT-29 (Figure 8A). Il est à noter que l'IL-17 à 10 ng/ml n'induit pas à elle seule la production de CCL20, et que la production de CCL20 induite par le TNF- α et de l'IL-17 à 10 ng/ml par les cellules HT-29 était supérieure à celle induite par le TNF- α à 10 ng/ml seul (Figure 8A). Contrairement aux cellules épithéliales intestinales, les cytokines recombinantes TNF- α et IL-17 n'ont pas d'effets synergiques sur la production de CCL20 par les cellules épithéliales alvéolaires A549 (Figure 8B).

Nous avons également testé l'effet synergique de IL-17 et du TNF- α sur la production de CXCL8 par les cellules épithéliales intestinales *versus* alvéolaires. Nos résultats démontrent que l'IL-17 seule n'induit pas la production de CXCL8 par les deux types de cellules épithéliales et que l'IL-17 n'agit pas en synergie avec le TNF- α pour augmenter de façon significative la production de CXCL8 dans aucun des deux types cellulaires (Figure 9A-B).

En conclusion, les résultats inclus dans la Figure 8 démontrent que l'IL-17 agit en synergie avec le TNF- α pour induire la production de CCL20 par les cellules intestinales mais

pas par les cellules alvéolaires. Finalement, les expériences représentées dans la Figure 9 ont permis de conclure que le TNF- α et l'IL-17 n'ont pas d'effet synergique significatif sur la production de CXCL8 par les cellules épithéliales intestinales et pulmonaires.

4.2 Le TNF- α et l'IL-1 β augmentent l'expression du récepteur de l'IL-17 (IL-17R) à la surface des cellules épithéliales

La capacité des cellules épithéliales à répondre à l'IL-17 dépend de l'expression du récepteur de l'IL-17, qui est induite par des cytokines pro-inflammatoires (*i.e.*, TNF- α) et non pas des cytokines Th17 (Minegishi, Saito *et al.* 2009). Pour identifier les bases moléculaires de la synergie entre l'IL-17 et le TNF- α dans l'induction de la production de CCL20 par les cellules HT-29, nous avons quantifié l'expression du récepteur à l'IL-17, l'IL17RA, par cytométrie en flux à la surface des cellules épithéliales cultivées en présence du milieu contenant ou pas des cytokines pro-inflammatoires. Pour cela, nous avons stimulé des cellules épithéliales HT-29 et A549 par les cytokines recombinantes TNF- α et l'IL-1 β (10 ng/ml). Ensuite, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-IL-17R conjugués au fluorochrome phycoérythrine (PE) et analysées par cytométrie en flux (voir Matériel et Méthodes). Nos résultats montrent que les cellules épithéliales HT-29 comparées aux cellules A549 expriment de façon constitutive de niveaux supérieurs d'IL-17R: 42,7% (MFI, *mean fluorescence intensity* 775) pour les HT-29 *versus* 28% (MFI 835) pour les A549 (Figure 10A, histogrammes de gauche et Figure 10B). Nous observons que la stimulation avec le TNF- α et l'IL-1 β augmente l'expression de l'IL-17R à la surface des cellules HT-29, et ceci de manière plus importante comparativement à l'augmentation observée à la surface des cellules A549 (Figure 10A, histogrammes du centre et de droite, et Figure 10B). Ces résultats indiquent que les cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α , augmentent l'expression de l'IL-17R préférentiellement à la surface des cellules épithéliales intestinales, et que cette augmentation pourrait rendre les cellules plus réceptives à la stimulation subséquente par l'IL-17. Ce mécanisme pourrait expliquer l'effet synergique de l'IL-17 et du TNF- α sur la production de CCL20. La capacité d'IL-17 à agir en synergie avec l'IL-1 β pour augmenter la production de CCL20 n'a pas été testée. Toutefois, compte tenu de la capacité de l'IL-1 β à augmenter l'expression de l'IL-17R à la surface des cellules HT-29, il est possible que cette synergie fonctionne également.

En conclusion, nos résultats démontrent que le TNF- α augmente l'expression de l'IL-17R à la surface des cellules épithéliales intestinales HT-29 et suggèrent que cette augmentation est à l'origine de l'effet synergique de l'IL-17 et du TNF- α sur la production de CCL20 par ces cellules.

4.3 Permissivité à l'infection par le VIH-1 des cellules épithéliales intestinales versus pulmonaires

Lors de l'infection à VIH-1, la première barrière que devra traverser le virus pour infecter l'organisme hôte est la barrière épithéliale (Kaushic, Ferreira *et al.* 2010). L'infection primaire à VIH est associée à une forte déplétion des lymphocytes Th17 CD4⁺ au niveau des organes lymphoïdes associées aux muqueuses intestinales (GALT, *gut-associated lymphoid tissues*) (Brenchley, Paiardini *et al.* 2008; Macal, Sankaran *et al.* 2008) qui est suivie par une forte translocation bactérienne (Brenchley, Price *et al.* 2006) favorisant l'évolution vers le stade SIDA (Douek, Roederer *et al.* 2009).

4.3.1 Analyse de l'expression du récepteur CD4 et des corécepteurs CCR5 et CXCR4 du VIH par les cellules épithéliales

Pour infecter les cellules cibles, le VIH utilise la molécule CD4 comme récepteur et les récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4 comme corécepteurs majeurs pour l'entrée (Dalglish, Beverley *et al.* 1984; Alkhatib, Combadiere *et al.* 1996; Zhang, Huang *et al.* 1996). Pour déterminer la permissivité relative à l'infection par le VIH des cellules épithéliales intestinales *versus* alvéolaires, l'expression d'ARN des molécules CD4, CCR5, et CXCR4 a été mesurée par RT-PCR et l'expression de ces protéines à la surface des cellules HT-29 et A549 a été déterminée par cytométrie en flux (voir Matériel et Méthodes). Les cellules épithéliales d'origine utérine (MAGI CD4+CCR5+LTR/ β -Gal+) ont été utilisées comme contrôle, en tant que cellules manipulées à être hautement permissives à l'infection par le VIH du fait de leur expression constitutive de CXCR4 et à leur expression de CD4 et CCR5 induite par transfection stable sous contrôle antibiotique (Kimpton and Emerman 1992; Deng, Liu *et al.* 1996) (voir Matériel et Méthodes).

La quantification des ARNm des gènes CD4, CXCR4 et CCR5 a confirmé la forte expression de ces transcrits par les cellules MAGI utilisées comme contrôle positif (Figure 11A-C). Nos résultats démontrent que les cellules HT-29 et A549 expriment des quantités indétectables d'ARNm pour CD4 (Figure 11A) et de très faibles niveaux d'ARNm de CCR5

(Figure 11B) et CXCR4 (Figure 11C). Nos résultats sont en accord avec des travaux publiés précédemment par Jordan *et al.* qui ont démontré que seulement la moitié de la population de cellules HT-29 expriment le récepteur CXCR4 (Jordan, Kolios *et al.* 1999), ainsi que Yadav *et al.* qui ont démontré que les cellules A549 étaient négatives pour le CD4 (Yadav, Shi *et al.* 2010).

L'analyse par cytométrie en flux permet de mesurer l'expression des molécules de surface, en caractérisant et comptant les cellules marquées qui émettent un signal de fluorescence. Cette série d'expériences nous a permis d'analyser l'expression du récepteur CD4 et les corécepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4 par les cellules épithéliales. Nos résultats ont révélé que les lignées HT-29 et A549 expriment à des niveaux très faibles voire indétectables le récepteur CD4 et le corécepteur CCR5, alors que le CXCR4 est faiblement exprimé à la surface des cellules HT-29 et non pas A549 (Figure 12, histogrammes du haut et du milieu). Comme anticipé, les cellules MAGI utilisées comme témoin positif expriment fortement les trois molécules CD4, CCR5 et CXCR4 (Figure 12, histogrammes du bas). Ainsi, ces résultats obtenus par cytométrie en flux sont en accord avec les résultats obtenus par RT-PCR en temps réel.

Finalement, nous avons aussi analysé l'expression de CD4, CCR5, et CXCR4 par microscopie confocale (voir Matériel et Méthodes). Il s'agit d'une technique alternative à la cytométrie en flux, mais de plus haute sensibilité de détection, permettant également de visualiser la localisation spatiale des molécules à la surface cellulaire. Pour cela, les cellules épithéliales ont été cultivées sur des lames en verre à plusieurs puits, ensuite marquées avec des Acs spécifiques pour les récepteurs CD4, CCR5 et CXCR4. Les cellules fixées ont été analysées pour l'expression de la fluorescence en prenant des photographies avec une magnification de 40x. Les résultats obtenus par microscopie confocale sur l'expression des récepteurs CD4 et CCR5 à la surface des cellules A549 et HT-29, ainsi que les trois récepteurs à la surface des cellules MAGI (Figure 13A, B et C), correspondent aux résultats obtenus par cytométrie en flux et RT-PCR en temps réel. Les résultats de microscopie confocale ont révélé une expression ponctuelle du récepteur CXCR4 à la surface des cellules HT-29 (Figure 13C), ce qu'on ne pouvait observer par cytométrie en flux.

En conclusion, les cellules épithéliales intestinales et alvéolaires expriment à des niveaux faibles, voire indétectables le récepteur CD4 et les corécepteurs majeurs CCR5 et

CXCR4, suggérant ainsi que ces deux types cellulaires pourraient être très peu permissifs à une infection virale productive.

4.3.2 Quantification de l'intégration du génome viral dans les cellules épithéliales

Les muqueuses intestinales et utérines représentent les sites majeurs de la réplication du VIH (Lackner and Veazey 2007; Brenchley and Douek 2008). L'infection virale productive nécessite l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte (Farnet and Bushman 1996). Nous avons démontré dans la section précédente que les cellules épithéliales HT-29 et A549 expriment à des niveaux faibles, voire indétectables CD4, CCR5, et CXCR4. Toutefois, d'autres récepteurs du VIH à la surface des cellules épithéliales ont été décrits, comme le GalCer, les glycosphingolipides de surface et les lacto-céramides sulfatés (Furuta, Eriksson *et al.* 1994; Bomsel and Alfsen 2003). Ces récepteurs peuvent rendre les cellules épithéliales permissives à l'infection. Nous avons ainsi testé la susceptibilité des cellules épithéliales intestinales HT-29 et alvéolaires A549 à l'infection par la souche virale NL4.3BaL, une souche connue pour son utilisation de CCR5 pour l'entrée dans les cellules cibles (tropisme R5). Le choix de ce type de souche virale est justifié par le fait que les souches virales à tropisme R5 sont les souches transmises de façon sélective lors de la transmission muqueuse du VIH (Grivel, Shattock *et al.* 2011). Les cellules MAGI ont été utilisées comme contrôle positif de permissivité virale. Les niveaux d'ADN viral intégré dans les cellules ont été quantifiés par PCR en temps réel en utilisant des amorces spécifiques (voir Matériel et Méthodes).

Cette série d'expériences nous a permis de détecter, comme anticipé, un taux considérable d'intégration virale dans les cellules MAGI (Figure 14). L'intégration de l'ADN viral a été indétectable dans les cellules HT-29, alors que, de façon surprenante, des niveaux modérés d'ADN viral intégré ont été détectés dans les cellules A549 (Figure 14). En conclusion, nos résultats démontrent que les cellules épithéliales alvéolaires A549, et non pas les cellules épithéliales intestinales, sont permissives à l'infection par le VIH à tropisme R5. Le mécanisme par lequel le virus entre dans les cellules A549 reste à élucider par des études futures prévues au laboratoire.

4.4 Effet du VIH-1 sur le rôle des cellules épithéliales dans l'immunité des muqueuses

4.4.1 Effet du VIH-1 sur la production de CCL20 et CXCL8 par les cellules épithéliales intestinales *versus* alvéolaires.

La déplétion des lymphocytes Th17 du GALT conduit à une forte translocation microbienne causant l'activation immunitaire chronique et l'évolution vers le stade SIDA (Brenchley, Price *et al.* 2006). La chimiokine CCL20 est la principale responsable de l'attraction des cellules Th17 dans les muqueuses. Des études précédentes ont démontré que l'infection par le VIS induit une diminution importante du niveau d'ARNm de la chimiokine CCL20 et CXCL8 dans l'intestin des macaques rhésus (Raffatellu, Santos *et al.* 2008). Ces résultats suggèrent un effet direct du VIS sur la production de CCL20 et CXCL8 par les cellules épithéliales intestinales (Raffatellu, Santos *et al.* 2008). Malgré le fait que les cellules épithéliales intestinales sont peu permissives à une infection virale productive, il est connu que les cellules épithéliales représentent la porte d'entrée du VIH et participent à la dissémination virale par le processus de transcytose des virions (Bomsel and Alfsen 2003).

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le VIH peut altérer la biologie des cellules épithéliales intestinales malgré l'absence d'infection productive. Nous avons ainsi étudié l'effet de l'exposition au VIH sur la production de CCL20 et de CXCL8 par les cellules épithéliales intestinales *versus* alvéolaires. Les cellules épithéliales intestinales HT-29 ne produisent pas le CCL20 ou le CXCL8 de façon constitutive, alors que les cellules épithéliales alvéolaires A549 produisent le CXCL8 mais pas le CCL20 en absence de toute stimulation (Figures 15A et 16A). L'exposition des cellules intestinales HT-29 à la souche virale NL4.3Bal à tropisme R5 ou à la souche NL4.3 à tropisme X4 n'altère pas la production de CCL20 et de CXCL8 en réponse à la stimulation par les différentes cytokines (Figure 15A et 16A). Quant aux cellules épithéliales alvéolaires A549, on remarque que l'exposition à la souche X4 seulement induit la production de CCL20 (Figure 15B) et augmente de façon significative la production de CXCL8 (Figure 16B). L'exposition des cellules A549 à la souche R5 diminue la production de CCL20 en réponse à la stimulation par le TNF- α ou le TNF- α avec l'IL-17, alors que l'exposition à la souche X4 diminue la production de CCL20 en réponse à la stimulation par le TNF- α et l'IL-17 (Figure 15B). Au contraire, on observe que l'exposition des cellules A549 à la souche R5 n'affecte pas la production de CXCL8 en réponse à la stimulation par les différentes cytokines, alors que l'exposition à la souche X4 diminue la production de CXCL8 en réponse à la stimulation par l'IL-1 β uniquement (Figure

16B). En conclusion, ces résultats obtenus *in vitro* sur des lignées des cellules épithéliales démontrent que l'exposition aux souches R5 et X4 du VIH n'altèrent pas la production de CCL20 et de CXCL8 par les cellules épithéliales intestinales. Toutefois, l'exposition aux VIH interfère avec la capacité des cellules épithéliales alvéolaires à produire des chimiokines spécifiques pour les cellules Th17 et les neutrophiles, en accord avec la permissivité de ces cellules à l'infection par le VIH (Figure 14).

Sur la base des résultats inclus dans ce mémoires et des données publiés par notre groupe (Gosselin, Monteiro et al. 2010) et d'autres équipes (Brenchley, Schacker *et al.* 2004; Brenchley, Paiardini *et al.* 2008; Raffatellu, Santos *et al.* 2008), nous pensons que la déplétion des lymphocytes Th17 des tissus lymphoïdes associés à l'intestin n'est pas le résultat d'un effet direct du VIH sur la production de CCL20 par les cellules épithéliales. La diminution de l'expression de CCL20 au niveau intestinal pourrait être plutôt la conséquence d'un effet indirect causé par la déplétion des cellules Th17 suite à leur permissivité accrue à l'infection par le VIH (Gosselin, Monteiro *et al.* 2010), menant ainsi à un déficit en IL-17 au niveau des muqueuses et par conséquent à l'altération de la synergie entre l'IL-17 et les cytokines pro-inflammatoires pour l'induction de CCL20 (Figure 17).

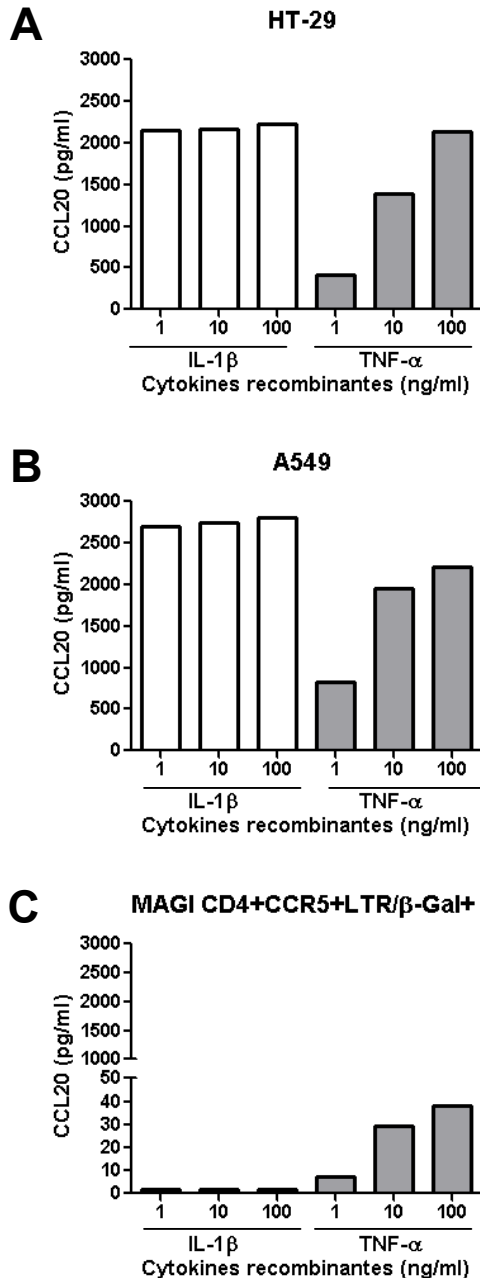


Figure 6: Production de CCL20/MIP3 α par les cellules épithéliales intestinales, alvéolaires et utérines. Les cellules épithéliales d'origine intestinale (HT-29; 0.5×10^5 cellules par puits), alvéolaire (A549; 10^5 cellules par puits) et utérine (MAGI CD4⁺CCR5⁺LTR/ β -Gal⁺; 10^5 cellules par puits) ont été cultivées dans des plaques Costar à 24 puits et stimulées par les cytokines recombinantes IL-1 β et TNF- α (1, 10 et 100 ng/ml ; pour un volume final de 1 ml/puits) pendant 18 heures. Les surnageants ont été récoltés et la production de CCL20 a été quantifiée par ELISA. Les graphiques indiquent la production de CCL20 par les cellules épithéliales (A) HT-29, (B) A549 et (C) MAGI. Les résultats inclus dans la figure sont représentatifs de quatre expériences indépendantes réalisées de façon similaire sur ces mêmes types cellulaires.

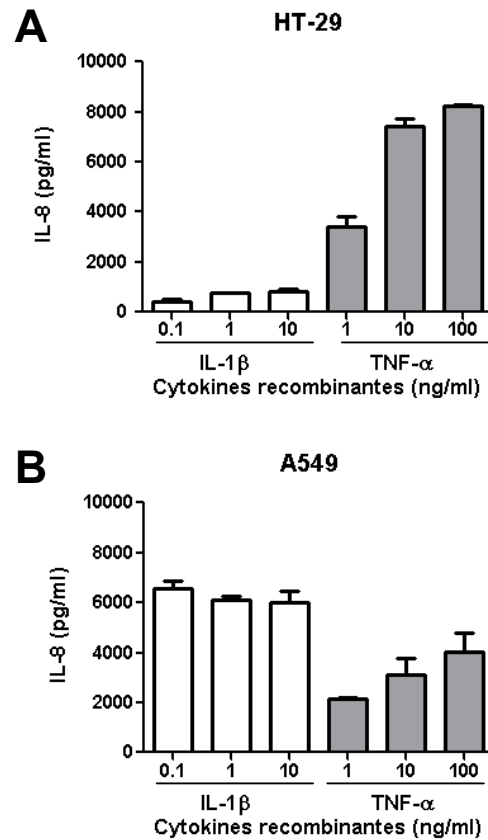


Figure 7: Production de CXCL8/IL-8 par les cellules épithéliales intestinales et alvéolaires. Les cellules épithéliales d'origine intestinale (HT-29; 0.5×10^5 cellules par puits), alvéolaire (A549; 10^5 cellules par puits) et utérine (MAGI $CD4^+CCR5^+LTR/\beta\text{-Gal}^+$; 10^5 cellules par puits) ont été cultivées dans des plaques Costar à 24 puits et stimulées par les cytokines recombinantes IL-1 β et TNF- α (1, 10 et 100 ng/ml pour un volume finale de 500 μ l/puits) pendant 18 heures. Les surnageants ont été récoltés et la production d'IL-8 a été quantifiée par ELISA. Les graphiques indiquent la production d'IL-8 par les cellules épithéliales (A) intestinales HT-29 et (B) alvéolaires A549. Les résultats inclus dans la figure sont représentatifs de trois expériences indépendantes réalisées de façon similaire sur ces mêmes types cellulaires.

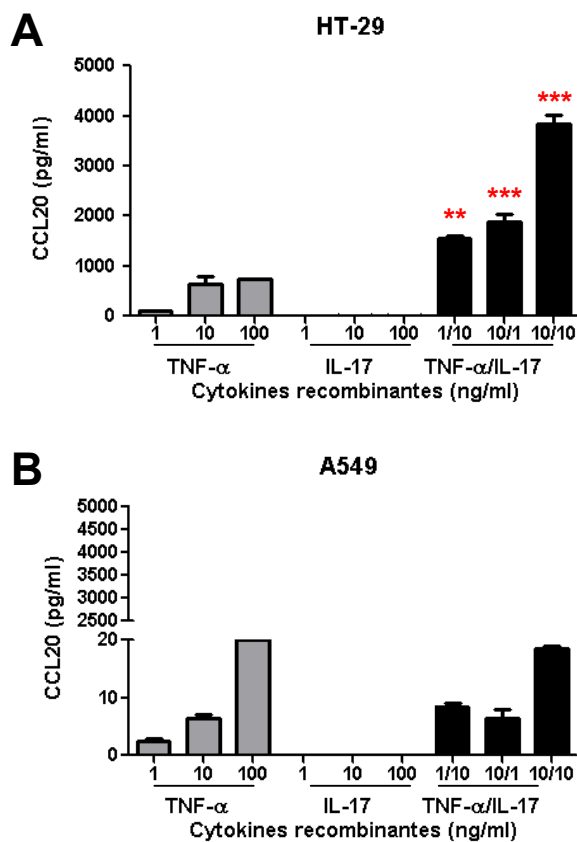


Figure 8: Effet synergique du TNF- α et de l'IL-17 dans l'induction de la production de CCL20 par les cellules épithéliales intestinales mais pas alvéolaires. Les cellules épithéliales HT-29 (0.5×10^5 cellules par puits) et A549 (10^5 cellules par puits) ont été cultivées dans des plaques Costar à 24 puits et incubées en présence de TNF- α (1, 10 et 100 ng/ml) ou d'un mélange de TNF- α (1 et 10 ng/ml) et d'IL-17 (1 et 10 ng/ml) pendant 18 heures. Les résultats indiquent la quantification de la production de CCL20 réalisée par ELISA dans les surnageants des cellules (A) HT-29 et A549. Les résultats inclus dans la figure sont représentatifs de trois expériences indépendantes réalisées de façon similaire sur ces mêmes types cellulaires.

***, $p < 0.0001$, t test de Student non-apparié, TNF- α versus TNF- α /IL-17 pour chaque concentration de TNF- α séparément

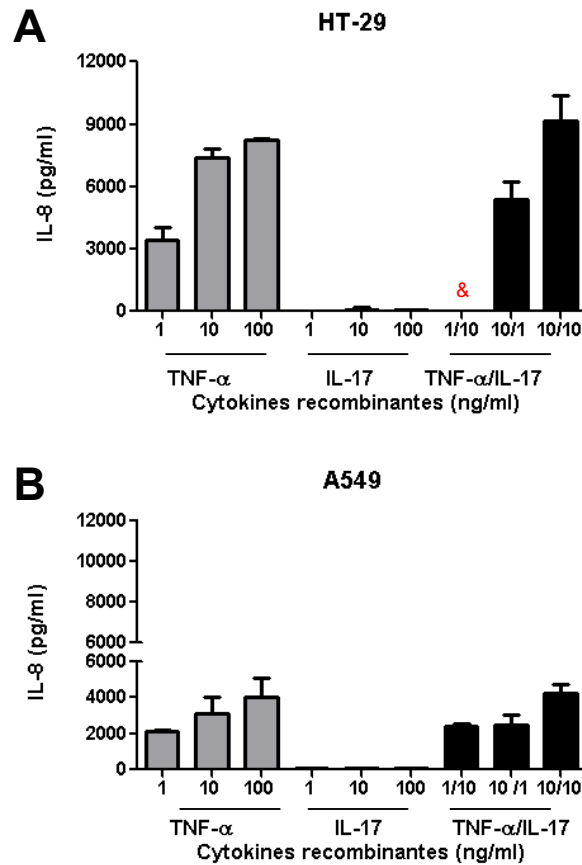


Figure 9: Absence de synergie entre le TNF- α et l'IL-17 dans l'induction de la production d'IL-8 par les cellules épithéliales. Les cellules épithéliales HT-29 (0.5×10^5 cellules par puits) et A549 (10^5 cellules par puits) ont été cultivées dans des plaques Costar à 24 puits et cultivées en présence du TNF- α (1, 10 et 100 ng/ml) ou d'un mélange de TNF- α (1 et 10 ng/ml) et d'IL-17 (1 et 10 ng/ml) pendant 18 heures. Les graphiques indiquent la quantification de la production d'IL-8 réalisée par ELISA dans les surnageants de culture des cellules épithéliales (A) HT-29 et (B) A549. Les résultats inclus dans la figure sont représentatifs de trois expériences indépendantes réalisées de façon similaire sur ces mêmes types cellulaires.

&, cette condition n'a pas été testée

$p > 0.05$, t test de Student apparié, TNF- α versus TNF- α /IL-17

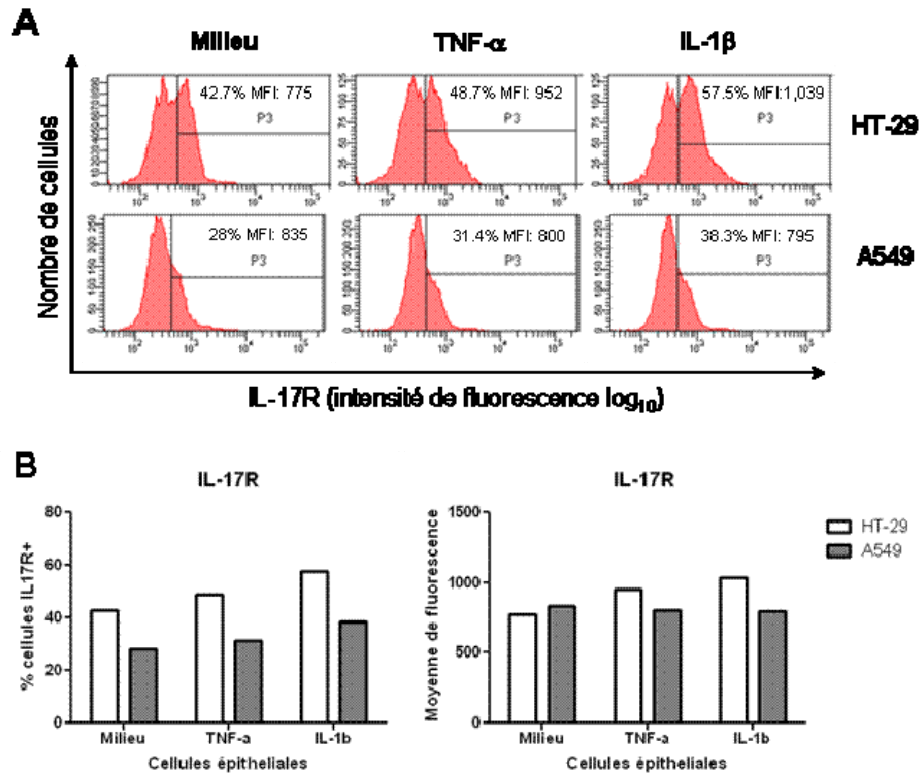


Figure 10: Augmentation de l'expression du récepteur de l'IL-17 (IL-17R) à la surface des cellules épithéliales après stimulation *via* TNF- α et IL-1 β . Les cellules épithéliales HT-29 et A549 (2.5×10^6 cellules par 5 ml) ont été cultivées dans des boîtes de culture T25 en présence du TNF- α (10 ng/ml) et d'IL-1 β (10 ng/ml) pendant 18 heures. Les cellules ont ensuite été détachées à l'aide de Versene, marquées avec des anticorps anti-IL-17R couplés à la phycoérythrine (PE), et analysées par cytométrie en flux. Les histogrammes indiquent l'expression de l'IL-17R constitutive et après activation avec TNF- α et IL-1 β à la surface des cellules HT-29 et A549. Les résultats inclus dans la figure sont représentatifs de deux expériences indépendantes réalisées de façon similaire sur ces mêmes types cellulaires.

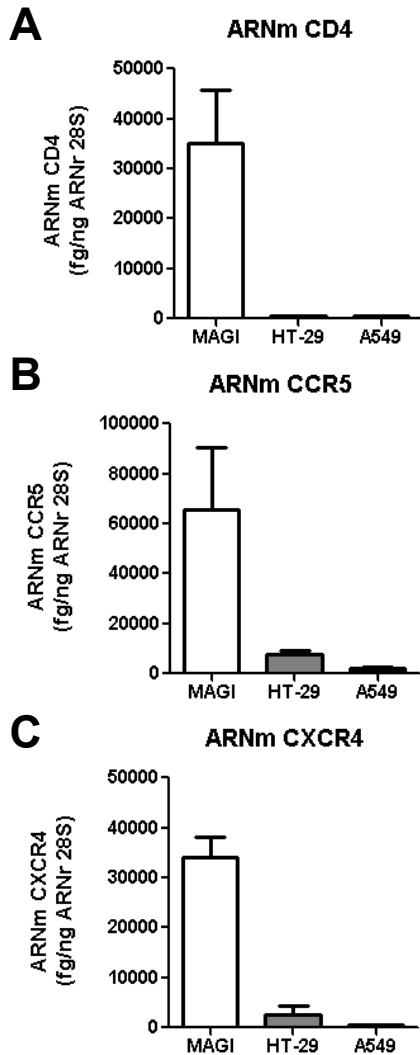


Figure 11: Expression de l'ARN messager du récepteur CD4 et des corécepteurs CCR5 et CXCR4 du VIH. L'ARN total a été isolé des cellules épithéliales HT-29, A549, et MAGI. La quantification de l'expression des gènes CD4, CCR5, et CXCR4 a été réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel en utilisant des amorces spécifiques et le LightCycler 1.5 (Roche). L'ARN ribosomal 28S (RRN28S) a été utilisé comme gène contrôle pour la quantification. Les graphiques indiquent l'expression de (A) CD4, (B) CCR5 et (C) CXCR4 par les cellules épithéliales HT-29, A549 et MAGI CD4⁺CCR5⁺LTR/ β -Gal⁺. Les résultats inclus dans la figure sont représentatifs de quatre expériences indépendantes réalisées de façon similaire sur ces mêmes types cellulaires.

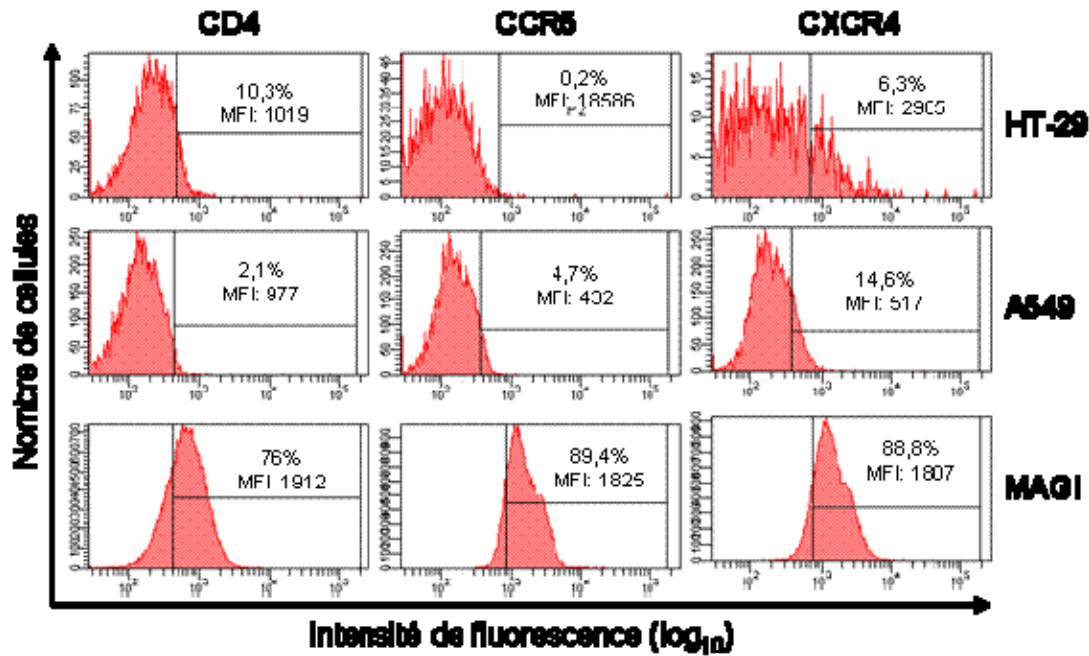


Figure 12: Analyse de l'expression du CD4, CCR5 et CXCR4 à la surface des cellules épithéliales par cytométrie en flux. L'expression du récepteur CD4 et des corécepteurs CCR5 et CXCR4 du VIH a été mesurée par cytométrie en flux à la surface des cellules HT-29, A549 et MAGI CD4⁺CCR5⁺LTR/β-Gal⁺. Des anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes ont été utilisés: CD4-Alexa700, CCR5-PE et CXCR4-PE. Des contrôles sans marquage et *fluorescence minus one* (FMO) ont été utilisés pour distinguer le signal positif du négatif. Les cellules ont été analysées en utilisant un cytomètre en flux BD LSRII et le logiciel BD Diva. Les résultats inclus dans la figure sont représentatifs de trois expériences indépendantes réalisées de façon similaire sur ces mêmes types cellulaires.

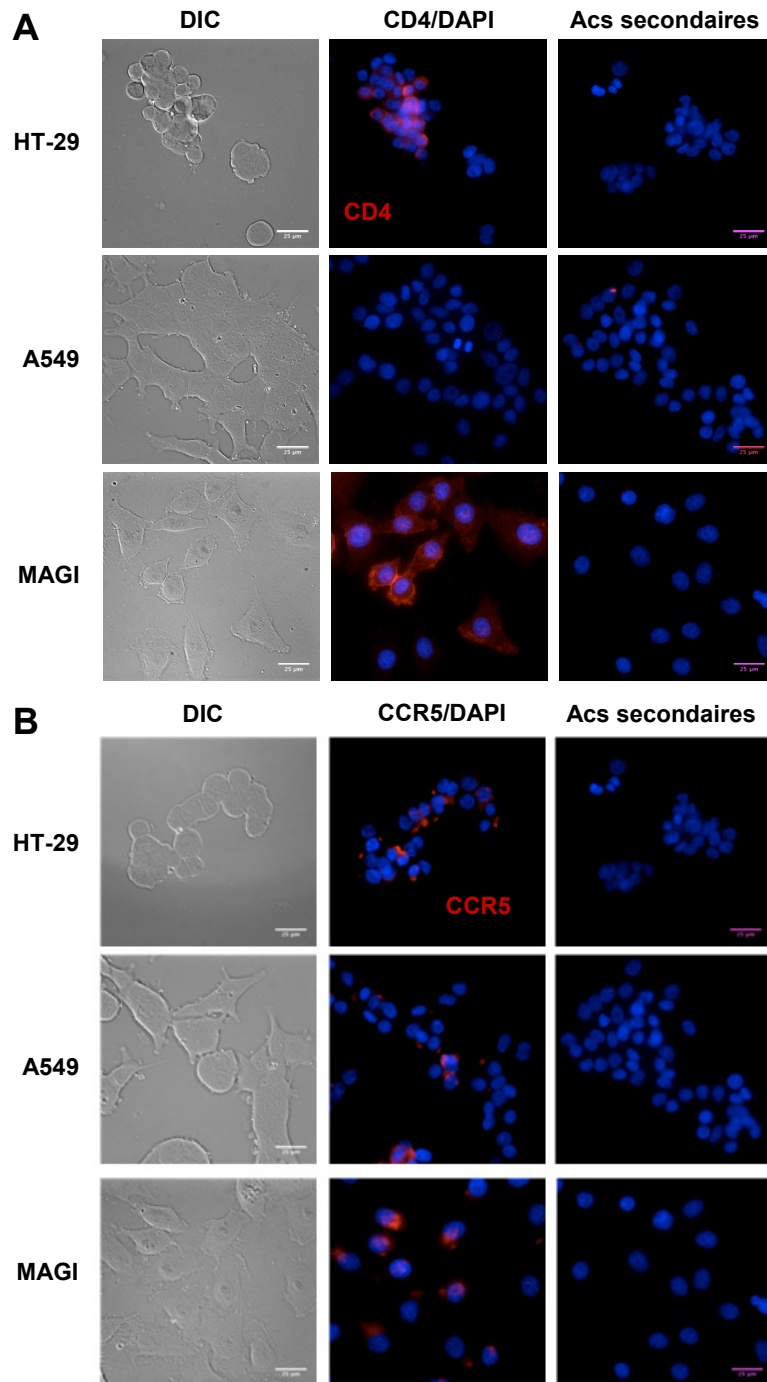


Figure 13: Analyse de l'expression du CD4, CCR5 et CXCR4 à la surface des cellules épithéliales par microscopie confocale. Voir page suivante

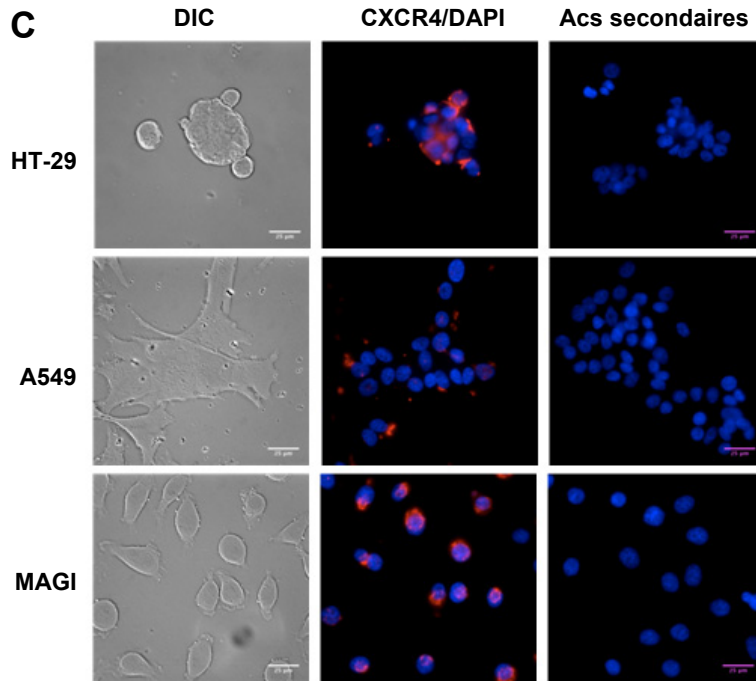


Figure 13: Analyse de l'expression du CD4, CCR5 et CXCR4 à la surface des cellules épithéliales par microscopie confocale. Les cellules épithéliales HT-29, A549, et MAGI $CD4^+CCR5^+LTR/\beta\text{-Gal}^+$ ont été cultivées sur des lames en verre à 8 puits ($1\text{-}5 \times 10^5$ cellules/puits) jusqu'à confluence. Les cellules ont été marquées en surface avec des anticorps souris anti-humain (A) CD4, (B) CCR5 et (C) CXCR4 non marqués suivis d'un marquage avec un anticorps secondaire chèvre anti-souris couplé au Cy3 (coloration rouge). Les noyaux cellulaires ont été marqués au DAPI (coloration bleue). Les images ont été acquises en utilisant un microscope confocal (Carl Zeiss Cell Observer SD). Le DIC représente le contraste interférentiel différentiel, donnant une image de la structure cellulaire en relief. Merge représente la superposition de deux photographies avec deux marquages différents. La magnification des photographies est indiquée sur les figures (40X). Les résultats inclus dans la figure sont représentatifs de deux expériences indépendantes réalisées de façon similaire sur ces mêmes types cellulaires.

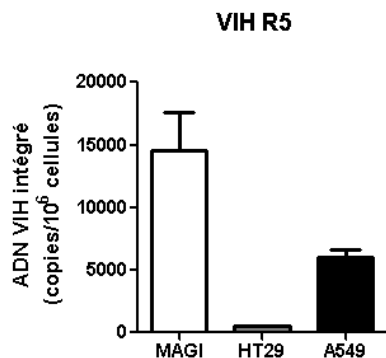


Figure 14: Quantification de l'intégration du génome proviral dans les cellules épithéliales. Les cellules HT-29, A549 et MAGI CD4⁺CCR5⁺LTR/β-Gal⁺ ont été cultivées dans des plaques de 48 puits et exposées à la souche virale NL4.3BaL à tropisme CCR5 (R5) (50 ng protéine p24 du VIH/puits) pendant 48 heures. Les cellules ont été lavées, récupérées et lysées avec un tampon de lyse contenant la protéinase K. La quantification de l'ADN proviral a été réalisée par PCR quantitative nichée en temps réel, en utilisant des amorces pour les séquences Alu et des amorces spécifiques pour les régions *ltr* and *gag* du VIH. Le CD3 a été utilisé comme gène de référence pour la quantification du nombre de cellules. La quantification a été faite en utilisant la lignée des cellules ACH2, contenant une copie d'ADN proviral par cellule. Les résultats inclus dans le graphique montrent le nombre de copies d'ADN proviral par cellule. Chaque réaction PCR a été réalisée en triplicata en utilisant le LightCycler 1.5 (Roche). Les résultats inclus dans la figure sont représentatifs de trois expériences indépendantes réalisées de façon similaire sur ces mêmes types cellulaires.

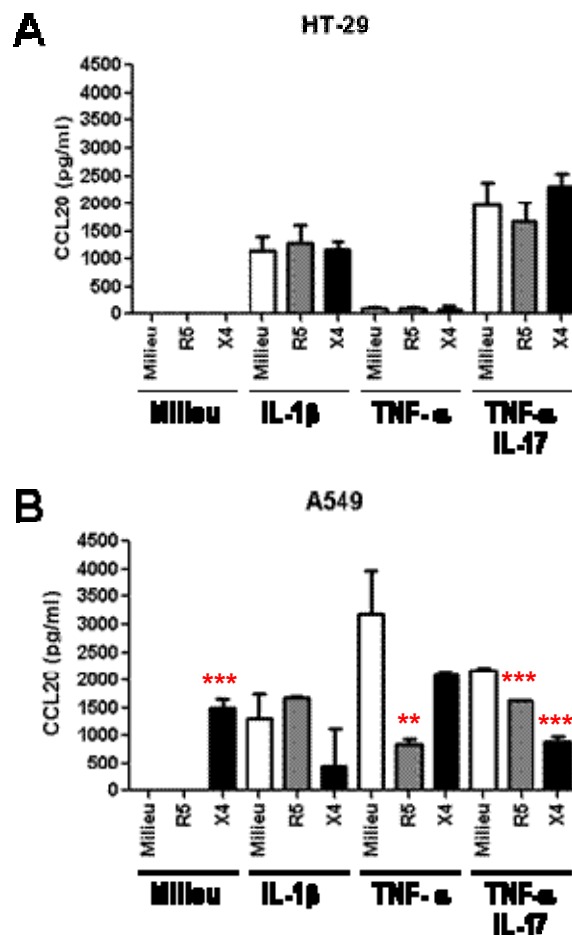


Figure 15: Effet du VIH sur la production de CCL20 par les cellules épithéliales. Les cellules épithéliales d'origine intestinale (HT-29; 0.5×10^5 cellules par puits) et alvéolaire (A549; 10^5 cellules par puits) ont été cultivées dans des plaques Costar de 24 puits et exposées à la souche virale NL4.3BaL à tropisme CCR5 (R5) et la souche virale NL4.3 à tropisme CXCR4 (X4) (50 ng protéine p24 du VIH/puits) pendant 24 heures. Les cellules sont lavées et stimulées par les cytokines recombinantes IL-1 β et TNF- α (1, 10 et 100 ng/ml) ou par un mélange de TNF- α (1 et 10 ng/ml) et d'IL-17 (1 et 10 ng/ml) pendant 24 heures. Les surnageants ont été récoltés et la production de CCL20 a été quantifiée par ELISA. Les résultats indiquent la production de CCL20 par les cellules épithéliales (A) HT-29 et (B) A549 exposées ou non aux souches R5 et X4 de VIH. Les résultats inclus dans la figure sont représentatifs de trois expériences indépendantes réalisées de façon similaire sur ces mêmes types cellulaires.

*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.0001$; t test de Student non-apparié, Milieu *versus* R5 ou X4 pour chaque stimulation cytokinique séparément

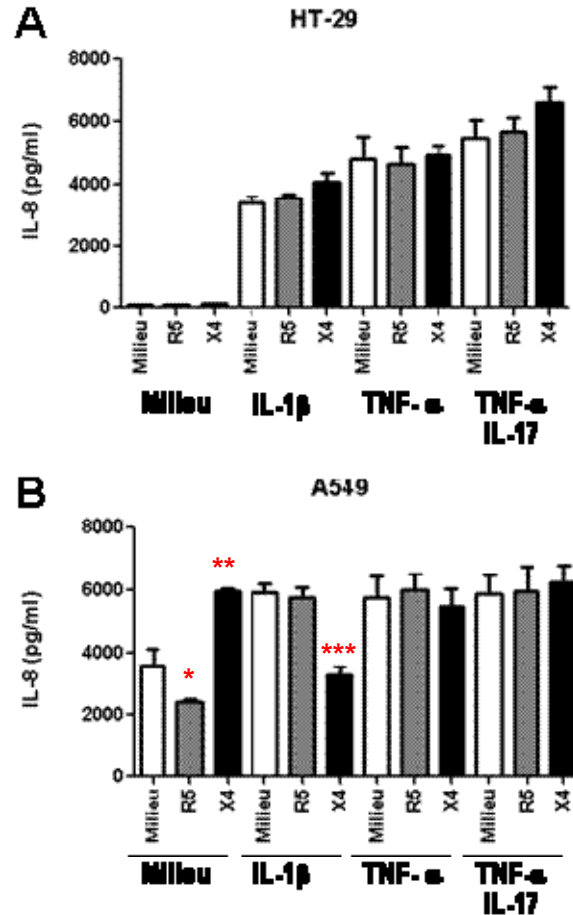


Figure 16: Effet du VIH sur la production de l'IL-8 par les cellules épithéliales. Les cellules épithéliales d'origine intestinale (HT-29; 0.5×10^5 cellules par puits) et alvéolaire (A549; 10^5 cellules par puits) ont été cultivées dans des plaques de 24 puits et exposées à la souche virale NL4.3BaL à tropisme CCR5 (R5) et la souche virale NL4.3 à tropisme CXCR4 (X4) pendant 24 heures. Les cellules sont lavées et stimulées par les cytokines recombinantes IL-1 β et TNF- α (1, 10 et 100 ng/ml) ou par un mélange de TNF- α (1 et 10 ng/ml) et d'IL-17 (1 et 10 ng/ml) pendant 24 heures. Les surnageants ont été récoltés et la production de l'IL-8 a été quantifiée par ELISA. Les résultats indiquent la production de l'IL-8 par les cellules épithéliales (A) HT-29 et (B) A549 exposées ou non aux souches R5 et X4 de VIH. Les résultats inclus dans la figure sont représentatifs de trois expériences indépendantes réalisées de façon similaire sur ces mêmes types cellulaires.

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0001$; t test de Student non-apparié, Milieu *versus* R5 ou X4 pour chaque stimulation cytokinique séparément

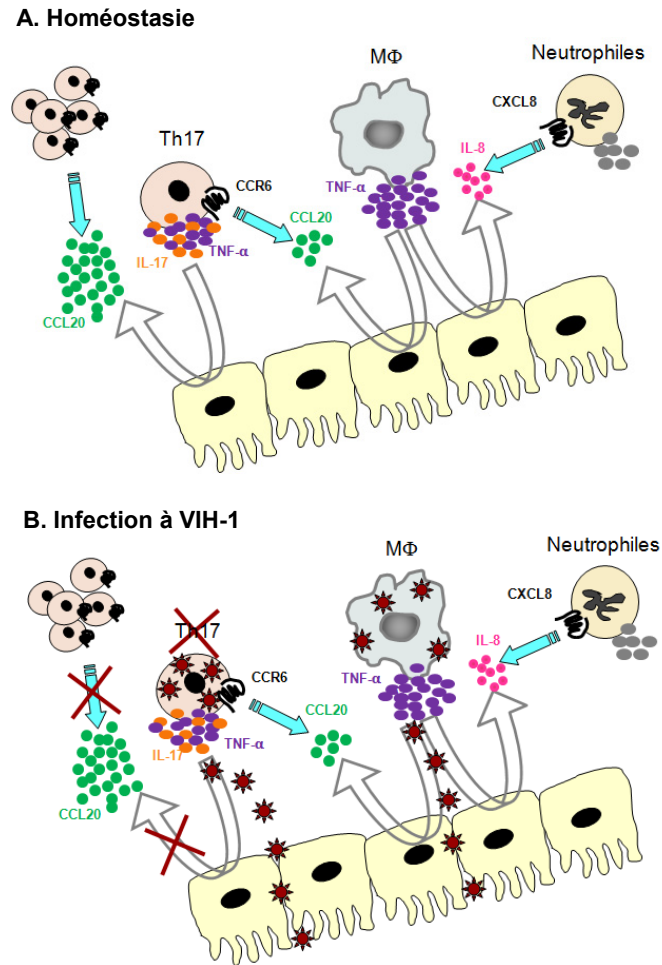


Figure 17: Modèle proposé pour expliquer les modifications induites par le VIH-1 au niveau des muqueuses : altérations de la communication entre les cellules épithéliales, les cellules Th17 et les neutrophiles. (A) Au niveau des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses intestinales, les monocytes sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α et l'IL-1 β , qui induisent à leur tour la production de CCL20 par les cellules épithéliales intestinales. La chimiokine CCL20 aide au recrutement des lymphocytes Th17 sécrétrices de TNF- α et d'IL-17. Ces dernières cytokines agissent de façon synergique pour induire une plus forte production de CCL20 par les cellules épithéliales. Cette synergie s'explique par le fait que le TNF- α augmente l'expression du récepteur à l'IL-17 à la surface des cellules épithéliales. Les cellules épithéliales et les cellules Th17 produisent la chimiokine CXCL8 attractrice des neutrophiles qui ont des propriétés antivirales en produisant les défensines- α . **(B)** Lors de l'infection à VIH, les lymphocytes Th17 sont des cibles d'infection et leur fréquence est réduite au niveau des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses intestinales. Cela conduit à un déficit en IL-17 et CCL20 et indirectement à une altération des fonctions des cellules épithéliales dans le recrutement des cellules Th17 et des neutrophiles.

5. Discussion

5.1 Sommaire des résultats

Ce projet de maîtrise se base sur l'hypothèse selon laquelle le VIH-1 interfère avec la capacité des cellules épithéliales (CE) intestinales et non pas pulmonaires à produire des chimiokines (CK) responsables de l'attraction des cellules Th17 *versus* des neutrophiles. Le mémoire est divisé en trois sections portant sur 3 objectifs majeurs: (i) Explorer la capacité des cellules épithéliales intestinales *versus* pulmonaires à produire des chimiokines spécifiques pour les cellules Th17 *versus* les neutrophiles et à communiquer avec les cellules Th17 *via* la cytokine IL-17; (ii) Mesurer la permissivité des cellules épithéliales intestinales *versus* pulmonaires à l'infection par le VIH-1 *in vitro* et (iii) Déterminer l'impact du VIH-1 sur la production de chimiokines spécifiques pour les cellules Th17 *versus* les neutrophiles par les cellules épithéliales intestinales *versus* pulmonaires. Pour ces études nous avons utilisé comme modèle d'étude deux lignées cellulaires d'origine intestinale (HT-29) et alvéolaire (A549) qui sont fortement utilisées dans la littérature et qui démontrent des propriétés similaires à celles des cellules épithéliales primaires (Lieber, Smith *et al.* 1976; Fantini, Yahi *et al.* 1992).

Dans la première partie de ce mémoire (objectif #1), nous avons démontré que les cellules épithéliales d'origine intestinale (HT-29) et les cellules épithéliales d'origine alvéolaire (A549) produisent des niveaux similaires de CCL20, une chimiokine spécifique pour les cellules Th17 (Hirota, Yoshitomi *et al.* 2007; Ito, Carson *et al.* 2011), dans des conditions pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α). Toutefois, ces cellules diffèrent dans leur capacité à produire le CXCL8, une chimiokine spécifique pour les neutrophiles (Hammond, Lapointe *et al.* 1995), en réponse à la stimulation par les cytokines pro-inflammatoires l'IL-1 β et le TNF- α . En effet, la lignée des cellules épithéliales intestinales HT-29 produit plus fortement la chimiokine CXCL8 comparativement à la lignée de cellules épithéliales alvéolaires A549. Ces résultats suggèrent que la capacité des cellules épithéliales et pulmonaires à attirer des cellules Th17 et/ou des neutrophiles aux sites d'inflammation est régulée de façon différentielle par l'IL-1 β et/ou le TNF- α . Il est intéressant de noter que nous avons également démontré la capacité de l'IL-17 à agir en synergie avec le TNF- α pour induire la production de CCL20 par les cellules épithéliales intestinales mais non pas par les cellules épithéliales alvéolaires. Cette synergie entre le TNF- α et l'IL-17 s'est montrée spécifique pour la production de CCL20 car elle n'est pas observée lorsque la production de CXCL8 a été mesurée. Nos résultats démontrent que l'expression constitutive du récepteur à

l'IL-17 (IL-17R) est supérieure à la surface des cellules HT-29 comparées aux cellules A549. De plus, la stimulation par le TNF- α et l'IL-1 β augmente l'expression de l'IL-17R de façon préférentielle à la surface des cellules épithéliales intestinales HT-29. Ceci suggère que l'expression à la hausse de l'IL-17R est au moins en partie à l'origine de l'effet synergique du TNF- α et de l'IL-17 sur la production de CCL20 par les cellules épithéliales intestinales. Ainsi, la fonction des cellules épithéliales intestinales comparée à celle des cellules épithéliales alvéolaires semble être d'avantage dépendante de la présence de l'IL-17, puisque les cellules épithéliales alvéolaires ne répondent pas à l'IL-17 malgré l'expression du récepteur à l'IL-17. Les bases moléculaires de cette différence restent inconnues. Une autre possibilité pourrait être aussi une signalisation déficiente *via* l'IL-17R dans les cellules épithéliales alvéolaires, et cette possibilité mérite d'être testée dans l'avenir. Malgré cette synergie sélective entre le TNF- α et de l'IL-17 dans les cellules épithéliales intestinales, les cellules épithéliales intestinales et alvéolaires produisent des niveaux comparables de CCL20 en réponse à la stimulation par l'IL-1 β , suggérant ainsi la capacité similaires de ces cellules épithéliales à recruter les cellules Th17 dans des conditions pro-inflammatoires spécifiques.

Dans la deuxième partie de ce mémoire (objectif #2), nous avons démontré que les cellules épithéliales intestinales et alvéolaires expriment à des niveaux faibles, voire indétectables, le récepteur CD4 et les corécepteurs majeurs CCR5 et CXCR4 du VIH, suggérant ainsi que ces deux types cellulaires sont très peu permissifs à une infection virale productive. À notre surprise, les cellules épithéliales A549 étaient permissives à l'infection par le VIH à tropisme R5, comme indiqué par la détection de l'ADN viral intégré dans ces cellules. Le mécanisme par lequel le virus s'intègre dans les cellules A549 reste encore inconnu. Il reste à déterminer également si l'infection dans les cellules épithéliales A549 est productive, c'est-à-dire si ces cellules sont capables de produire des virions infectieux.

Finalement, dans la troisième partie du mémoire (objectif #3), nous avons démontré que l'exposition des cellules épithéliales à des souches de VIH à tropisme R5 et X4 *in vitro* n'altèrent pas la capacité des cellules épithéliales intestinales et alvéolaires à produire des chimiokines spécifiques pour les cellules Th17 ou pour les neutrophiles. Ce résultat est contraire à notre hypothèse initiale basée sur les travaux réalisés dans un modèle d'infection à VIS (Raffatellu, Santos *et al.* 2008). Ces travaux démontraient la diminution de l'expression des ARNm des chimiokines CXCL8 et CCL20 dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses intestinales chez les macaques rhésus infectés par le VIS. Ces résultats

suggéreraient la possibilité d'un effet direct du VIH sur la capacité des cellules épithéliales à produire les chimiokines CXCL8 et CCL20. Nos travaux ont exclu la possibilité de l'effet direct du VIH sur la production des chimiokines CCL20 et CXCL8 par les cellules épithéliales. Nos résultats suggèrent plus tôt que le VIH a un effet indirect sur la production des chimiokines CCL20 et CXCL8 via l'infection et la déplétion subséquente des cellules Th17.

La diminution de la fréquence des cellules Th17 pourrait ainsi expliquer la diminution de l'expression des ARNm des chimiokines CXCL8 et CCL20 dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses intestinales chez les macaques rhésus infectés. Ceci pourrait affecter indirectement la capacité des cellules épithéliales à produire le CXCL8 et le CCL20.

Néanmoins, nos résultats révèlent pour la première fois des différences fonctionnelles entre les cellules épithéliales intestinales et alvéolaires (*i.e.*, synergie entre l'IL-17 et le TNF- α dans l'induction de la production de CCL20 dans les cellules épithéliales intestinales; permissivité à l'infection par le VIH des cellules épithéliales alvéolaires), différences qui pourraient expliquer au moins en partie les résultats publiés par Brenchley *et al.* mettant en évidence la déplétion préférentielle des lymphocytes Th17 au niveau des muqueuses intestinales mais pas pulmonaires (Brenchley, Paiardini *et al.* 2008). Nos résultats suggèrent que la déplétion des lymphocytes Th17 des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses intestinales n'est pas due à l'effet direct du VIH sur la production de CCL20 par les cellules épithéliales intestinales. Cette déplétion serait plutôt la conséquence d'un effet indirect causé par la déplétion des cellules Th17, qui sont hautement permissives à l'infection par le VIH (Brenchley, Paiardini *et al.* 2008). La déplétion des cellules Th17 causerait un déficit en IL-17 au niveau des muqueuses intestinales et par conséquent l'altération de la synergie entre l'IL-17 et les cytokines pro-inflammatoires pour l'augmentation de la production du CCL20. L'ensemble des résultats inclus dans ce mémoire supportent le modèle que nous proposons dans la Figure 18.

5.2 Rôle des cellules épithéliales intestinales et alvéolaires dans le recrutement des lymphocytes Th17 et des neutrophiles

5.2.1 Les cellules épithéliales intestinales et alvéolaires produisent des chimiokines spécifiques pour les cellules Th17 et les neutrophiles

Cette section a été basée sur l'hypothèse selon laquelle dans des conditions pro-inflammatoires les cellules épithéliales intestinales et alvéolaires diffèrent dans leur capacité à produire les chimiokines CCL20 et CXCL8, qui sont des ligands responsables du recrutement respectif des lymphocytes Th17 exprimant le récepteur CCR6, et des neutrophiles exprimant les récepteurs CXCR1 et CXCR2. De nombreuses études ont démontré que les lignées de cellules épithéliales intestinales humaines produisent les chimiokines de type C-X-C et C-C en réponse à la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α (Kelly, Keates *et al.* 1994; Casola, Estes *et al.* 1998). Par exemple, Kwon *et al.* ont démontré que les cellules HT-29 produisent la chimiokine CCL20 en réponse à la stimulation par le TNF- α et l'IL-1 β (Kwon, Keates *et al.* 2002). Nous nous sommes intéressés à la chimiokine CCL20 car elle s'avère avoir un rôle fondamental durant la pathogenèse de l'infection à VIH et à VIS. En effet, dans des études entreprises chez le macaque rhésus, Li *et al.* ont démontré que la chimiokine CCL20 est produite par les cellules épithéliales et recrute les cellules de l'immunité innée et adaptative (*i.e.*, cellules dendritiques) aux sites muqueux (*i.e.*, région cervicale de l'utérus) de transmission du VIS (Li, Estes *et al.* 2009). Le recrutement des cellules dendritiques devrait attirer différents types de cellules immunitaires et initier ainsi une réponse antivirale. Toutefois, le VIS exploite cette boucle de stimulation pour son propre avantage réplicatif. Une fois recrutées dans les muqueuses, les cellules dendritiques produisent à leur tour des chimiokines qui attirent des cellules T CD4⁺ (Li, Estes *et al.* 2009). La présence des cellules T CD4⁺ contribue à la dissémination du virus et à la progression de la maladie vers la phase chronique.

Nous avons également démontré que les cellules épithéliales HT-29 produisent plus fortement des CXCL8 en réponse au TNF- α qu'en réponse à l'IL-1 β , alors que les cellules A549 répondent aussi bien au TNF- α qu'à l'IL-1 β en produisant le CXCL8. Nos résultats ont permis de conclure que la capacité qu'ont les cellules épithéliales intestinales et pulmonaires d'attirer les lymphocytes Th17 et les neutrophiles est régulée différemment par l'IL-1 β et/ou le TNF- α . L'importance fonctionnelle de cette différence reste à comprendre. Il serait également important de déterminer si ces différences peuvent être observées sur des cellules épithéliales primaires ou *in vivo*.

Tout comme les résultats publiés par d'autres groupes (Liao, Rabin *et al.* 1999; Schutysse, Struyf *et al.* 2003), nos études suggèrent que la production de chimiokines par les cellules épithéliales assure le recrutement des lymphocytes Th17 jouant un rôle dans la régulation de l'homéostasie, ainsi que dans le maintien de l'intégrité et la perméabilité de la barrière épithéliale. Sachant que les muqueuses représentent le site actif de réplication du VIH, la compréhension du fonctionnement des cellules épithéliales et des chimiokines sécrétées à ce niveau est primordiale dans le but d'établir des thérapies efficaces afin d'éviter le recrutement délétère des cellules cibles de réplication virale aux sites de transmission de l'infection. Le premier exemple dans ce sens est l'utilisation du microbicide monolaurate de glycérol, une molécule qui interfère avec le recrutement des cellules *via* la chimiokine CCL20 (Li, Estes *et al.* 2009). Li *et al.* ont démontré que le monolaurate de glycérol empêche la dissémination du VIS chez les singes lors d'une infection par voie vaginale (Li, Estes *et al.* 2009). Toutefois, on ignore encore si l'administration du microbicide monolaurate de glycérol est efficace chez l'homme, et si ce traitement ne risque pas d'interférer avec les fonctions bénéfiques de CCL20 dans le maintien de l'immunité des muqueuses.

5.2.2 Étude de l'effet synergique de l'IL-17 et du TNF- α sur la production de chimiokines CCL20 et CXCL8

Les lymphocytes Th17 CCR6⁺ sont recrutés *via* la chimiokine CCL20 vers les muqueuses. Une fois recrutés, les lymphocytes Th17 sécrètent la cytokine IL-17 qui agit sur les cellules épithéliales et augmente leur capacité à produire du CCL20 et du CXCL8 (Aujla, Chan *et al.* 2008 ; Godinez, Raffatellu *et al.* 2009 ; Pelletier, Maggi *et al.* 2010). Cette boucle de communication entre les cellules Th17 et les cellules épithéliales permet de recruter davantage de cellules Th17 et des neutrophiles vers des sites d'inflammation muqueux (Dandekar, George *et al.* 2010 ; Pelletier, Maggi *et al.* 2010).

Nos résultats ont permis de mettre en évidence l'effet synergique entre le TNF- α et l'IL-17 sur la production de CCL20 par les cellules épithéliales intestinales HT-29, alors que l'IL-17 seul n'induit pas la production de CCL20. Les résultats obtenus sont en accord avec les études précédentes de Lee *et al.* qui ont démontré la capacité de l'IL-17 à agir en synergie avec le TNF- α pour induire l'expression des transcrits de CCL20 et de CXCL8 (Lee, Wang *et al.* 2008). De façon similaire, Minegishi *et al.* ont observé un effet synergique des cytokines Th17 et des cytokines pro-inflammatoires classiques, et ont identifié l'IL-17 comme un signal

de danger en faisant des études chez les sujets atteints du syndrome d'Hyper IgE (HIES, *Hyper IgE Syndrome*) (Minegishi, Saito *et al.* 2009). En effet, l'IL-17 peut induire la régulation positive des cytokines pro-inflammatoires qui semblent, avec les cytokines des Th17, avoir un effet synergique sur la production de facteurs antimicrobiens (Minegishi, Saito *et al.* 2009). Cette information s'avère d'une grande importance dans le contexte de l'infection à VIH. Le rôle de signal de danger que l'IL-17 induit dans les cellules épithéliales pourrait avoir un rôle bénéfique dans le maintien de l'immunité des muqueuses et la défense antimicrobienne. À l'opposé, l'effet de l'IL-17 sur les cellules épithéliales pourrait favoriser le recrutement des cellules cibles de l'infection par le VIH (*e.g.*, cellules Th17) et la dissémination de l'infection vers les sites distaux.

La capacité des cellules épithéliales à répondre à l'IL-17 est dépendante de l'expression du récepteur à l'IL-17 (Kuestner, Taft *et al.* 2007). Des études précédentes ont déjà démontré la capacité du TNF- α à augmenter l'expression du récepteur à l'IL-17 à la surface des cellules épithéliales en transactivant l'EGRF, *Epidermal growth factor receptor*, résultant en l'activation de la voie de signalisation ERK (Kuestner, Taft *et al.* 2007; Lee, Wang *et al.* 2008). À notre connaissance, nos résultats ont démontré pour la première fois que la stimulation par la cytokine IL-1 β des cellules épithéliales augmente l'expression du récepteur à l'IL-17. L'implication du récepteur à l'IL-17 dans différents mécanismes d'inflammation au sein des muqueuses intestinales reste à élucider. Les cellules épithéliales intestinales et pulmonaires se doivent d'être équipées d'un bon système de défense comprenant l'implication de différentes cytokines, y compris l'IL-17. Toutefois, le système immunitaire adapté au sein des muqueuses intestinales et pulmonaires présente des fonctionnalités différentes.

Nos résultats ont montré que le TNF- α et l'IL-17 n'exerçaient pas d'effet synergique sur la production de CXCL8 au niveau des cellules épithéliales intestinales HT-29, ou alvéolaires A549. Cependant, il a été publié que l'IL-17 agit en synergie avec le TNF- α pour augmenter la production de l'ARNm du CXCL8 au niveau des cellules épithéliales HT-29 (Lee, Wang *et al.* 2008). On pourrait expliquer nos résultats par le fait que nous mesurons la production de la protéine CXCL8 et non pas de l'ARNm. Cette possibilité mérite d'être exploitée d'une manière plus approfondie. En conclusion, la pénurie en IL-17 causée par la diminution de la fréquence des cellules Th17 des GALT des patients infectés par le VIH

(Brenchley, Paiardini *et al.* 2008) ne devrait pas jouer un rôle négatif sur la capacité des cellules épithéliales à attirer des neutrophiles. Toutefois, les lymphocytes Th17 représentent une source importante de CXCL8 au niveau des muqueuses, laissant croire que la déplétion des ces dernières par l'infection à VIH induirait également une pénurie de CXCL8, et par conséquent un défaut de recrutement des neutrophiles. Cette nouvelle boucle de communication entre les cellules Th17 et les neutrophiles vient d'être documentée par les travaux de Pelletier *et al.* (Pelletier, Maggi *et al.* 2010).

Nous avons par la suite découvert que le mécanisme moléculaire responsable de l'induction de la synergie entre les cytokines recombinantes TNF- α et IL-17, était dû à l'augmentation de l'expression de l'IL-17R à la surface des cellules épithéliales intestinales HT-29 suite à la stimulation par le TNF- α et l'IL-1 β . Ce phénomène rend les cellules HT-29 plus réceptives à la stimulation par l'IL-17, et par conséquent induit une plus forte production de CCL20 par ces cellules. Ce phénomène a été déjà décrit pour les cellules HT-29 *via* la transactivation du facteur EGRF et en activant la voie ERK et p38 MAPK (Lee, Wang *et al.* 2008). À notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir mis en évidence le mécanisme moléculaire responsable de la production synergique de CCL20 par les cellules épithéliales d'origines intestinales, comme étant l'induction à la hausse de l'expression du récepteur à l'IL-17. L'infection à VIH/VIS a été associée à une forte déplétion des lymphocytes Th17 (Brenchley, Paiardini *et al.* 2008), ayant comme conséquence directe la diminution de la production de la cytokine IL-17, et comme conséquence indirecte la diminution de la production de chimiokines CXCL8 par les cellules épithéliales (Raffatellu, Santos *et al.* 2008). Dans les sites muqueux, les lymphocytes Th17 assurent un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie des couches épithéliales en produisant l'IL-22 et l'IL-17, deux cytokines impliquées dans le renouvellement et le maintien de la barrière épithéliale intestinale, en soutenant la production des protéines des jonctions serrées (Dandekar, George *et al.* 2010). On sait également que les cellules épithéliales, lors de l'altération de la barrière mucoale associée à l'infection par le VIS, subissent un processus d'apoptose (Li, Estes *et al.* 2008). Lors de la phase chronique de l'infection, ce phénomène est étroitement lié à la déplétion des lymphocytes Th17 (Brenchley, Paiardini *et al.* 2008). Ces dernières avaient pour rôle physiologique de réguler le renouvellement des fonctions des cellules épithéliales intestinales, en induisant des signaux extracellulaires d'activation des protéines de signalisations ERK/MAPK, dont dépend la formation des protéines des jonctions et les claudines (Kinugasa, Sakaguchi *et al.* 2000).

5.3 Permissivité à l'infection par le VIH-1 des cellules épithéliales intestinales versus alvéolaires

Dans cette deuxième section nous avons étudié la relation relative entre l'expression du récepteur CD4 et des corécepteurs CCR5 et CXCR4 du VIH à la surface des différentes cellules épithéliales, et leur susceptibilité à l'infection par le VIH. Dans cette série d'expériences les cellules MAGI CD4⁺CCR5⁺CXCR4⁺ ont été utilisées comme témoin positif pour l'expression des récepteurs d'entrée du VIH et d'infection. Comme attendu (Kimpton and Emerman 1992), les cellules MAGI CD4⁺CCR5⁺CXCR4 sont fortement permissives à l'infection par le VIH-1 de tropisme R5. Nos résultats portant sur l'étude de l'expression des récepteurs d'entrée du VIH démontrent que les cellules épithéliales intestinales HT-29 ne sont pas permissives à l'infection à VIH de souche R5 de par la faible expression, voire l'absence d'expression du récepteur CD4, et du corécepteur CCR5. Ceci est en accord avec la littérature (Kimpton and Emerman 1992; Deng, Liu *et al.* 1996). Nos résultats montrent aussi qu'une partie des cellules épithéliales intestinales expriment le corécepteur CXCR4, et confirment ainsi les résultats de Jordan *et al.*, qui ont montré par cytométrie en flux et immunohistochimie l'expression du corécepteur CXCR4 seulement sur une fraction de la population de cellules HT-29 (Jordan, Kolios *et al.* 1999). La permissivité des cellules épithéliales HT-29 à l'infection par des souches X4 du VIH reste à déterminer. Toutefois, cet aspect n'a pas été l'objet de notre étude, compte tenu du fait que les souches virales à tropisme R5 sont préférentiellement transmises au niveau des muqueuses (Cicala, Arthos *et al.* 2011).

Il est important à noter que nos résultats ont révélé la permissivité des cellules épithéliales A549 à l'infection par une souche de VIH-1 à tropisme R5, et ceci malgré la faible expression détectable du récepteur CD4 et des corécepteurs CCR5 et CXCR4 du VIH-1. Nos résultats portant sur l'expression du récepteur CD4 correspondent aux résultats publiés par Yadav *et al.* (Yadav, Shi *et al.* 2010), qui ont révélé que les cellules A549 sont CD4⁺. A notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir démontré que les cellules épithéliales pulmonaires alvéolaires sont permissives à l'infection par le VIH. Pour expliquer ce résultat, on peut imaginer que d'autres récepteurs exprimés par les cellules A549 sont responsables de l'entrée virale, tels que le Galactosyl-Céramide (GalCer), les glycosphingolipides de surface, et les lactocéramides sulfatés qui pourraient faciliter l'entrée du VIH dans ces cellules

(Furuta, Eriksson *et al.* 1994; Bomsel and Alfsen 2003). Cependant, cette hypothèse reste à valider par de futures études dans notre laboratoire. La présence des particules virales est détectée dans les tissus pulmonaires des patients, surtout dans les macrophages alvéolaires (Worgall, Connor *et al.* 1999; Bergamaschi and Pancino 2010). Mais il reste à déterminer si les cellules épithéliales alvéolaires primaires sont elles aussi, comme la lignée A549, permissives à l'infection par le VIH *in vivo*. Si ce scénario est vrai, il reste à comprendre pourquoi les cellules Th17 ne sont pas diminuées en fréquence au niveau des tissus pulmonaires. Il est possible que les cellules Th17 recrutées dans l'intestin et celles recrutées dans les poumons ont une permissivité différente à l'infection. Notre laboratoire travaille pour caractériser l'hétérogénéité fonctionnelle des cellules Th17, avec le but final d'identifier des cellules Th17 résistantes à l'infection.

5.4 L'exposition des cellules épithéliales au VIH n'a pas d'effet direct sur la production de chimiokines CCL20 et CXCL8

L'hypothèse de cette partie repose sur le fait que le VIH interfère avec la capacité des cellules épithéliales intestinales et non pas alvéolaires à produire des chimiokines spécifiques pour les cellules Th17 et les neutrophiles. Nos résultats démontrent que l'exposition au VIH des cellules épithéliales intestinales ne diminue pas la capacité de ces cellules à produire les chimiokines CCL20 et CXCL8, alors que le VIH interfère avec la capacité des cellules épithéliales alvéolaires à produire ces chimiokines, en accord avec la permissivité préférentielle des cellules épithéliales alvéolaires à l'infection par le VIH. Ceci suggère que le VIH-1 n'altère pas directement le potentiel des cellules épithéliales intestinales à recruter des cellules Th17 et des neutrophiles vers les sites muqueux.

Dans le contexte de l'infection à VIS, Raffatellu *et al.* ont démontré la diminution des taux d'ARNm de CCL20 et de CXCL8 dans l'intestin des macaques infectés comparés aux animaux non-infectés (Raffatellu, Santos *et al.* 2008). Nous avons observé que les taux de chimiokines CCL20 et CXCL8 produites suite à l'exposition au VIH en présence des cytokines pro-inflammatoires restent similaires à ceux obtenus en l'absence de l'exposition virale. Ceci infirme l'hypothèse sur laquelle nous avons fondé ce projet de Maîtrise. On peut toutefois imaginer que la diminution de la production de ces chimiokines dans l'intestin est plutôt la conséquence indirecte de la déplétion des lymphocytes Th17, qui sont hautement permissifs à l'infection par le VIH (Gosselin, Monteiro *et al.* 2010). La déplétion des

lymphocytes Th17 des muqueuses intestinales pendant la phase chronique de l'infection à VIH induit un déficit en production d'IL-17 qui pourrait être à la base de la diminution de la production de CCL20 par les cellules épithéliales comme démontré dans la section 2.3. Le VIH pourrait ainsi altérer indirectement les fonctions des cellules épithéliales et ceci malgré les conditions inflammatoires extrêmes, entre autres la présence du TNF- α produit par les macrophages au sein des muqueuses. Toutefois, il est difficile d'extrapoler les résultats obtenus sur la production de CCL20 *in vitro* à la situation réelle *in vivo*, dans laquelle beaucoup de facteurs, connus et probablement pas encore connus à ce jour, entrent en scène.

Le recrutement dans les muqueuses d'un grand nombre de neutrophiles produisant les défensines- α (Jan, Huang *et al.* 2006) est nécessaire pour limiter l'infection à VIH (Ganz, Selsted *et al.* 1985; Furci, Sironi *et al.* 2007). Le phénomène de recrutement des neutrophiles est indirectement altéré par la déplétion des cellules Th17 qui avaient pour rôle d'induire une plus forte production des chimiokines CXCL8 par les cellules épithéliales. Nos résultats démontrent clairement que le VIH n'affecte pas la capacité des cellules épithéliales intestinales à produire la chimiokine CXCL8. De plus, nous n'avons pas observé la production de CXCL8 après exposition des cellules épithéliales intestinales au VIH seulement, en absence des cytokines pro-inflammatoires. Contrairement à nos résultats, Nazli *et al.* démontrent que l'infection par le VIH induit une forte production de CXCL8 par les cellules épithéliales intestinales (Nazli, Chan *et al.* 2010). Ces résultats divergents pourraient être expliqués par l'utilisation des différentes lignées épithéliales intestinales : HT-29 par notre groupe et T84 (une lignée de cellules épithéliales intestinales immortalisées originaires du cancer colorectal) par Nazli *et al.* Ces dernières fonctionnent davantage comme les cryptes, qui sont les glandes exocrines de l'intestin grêle qui sécrètent des enzymes antimicrobiennes pouvant neutraliser le virus (Forstner, Zhang *et al.* 1993), et sont dotées d'une forte résistance transépithéliale limitant ainsi le passage du virus par transcytose (Mason, Simpson-Small *et al.* 2003).

Dès l'entrée du VIH au niveau des muqueuses, on observe l'induction de réponses immunitaires innées, impliquant le recrutement des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques matures sécrètent des facteurs qui sont responsables du recrutement des lymphocytes T au repos, ainsi que des lymphocytes T mémoires, et présentent les antigènes viraux pour stimuler la différenciation en lymphocytes Th1 pro-inflammatoires (Abel, Roche *et al.* 2005). On sait également que les conditions qui favorisent la polarisation vers les

lymphocytes Th1 inhibent la différenciation des lymphocytes Th17 (Harrington, Hatton *et al.* 2005). La cytokine IFN- γ en particulier, produite par les cellules Th1, inhibe la différenciation des cellules murines T CD4⁺ naïves en cellules Th17 (Harrington, Hatton *et al.* 2005; Park, Li *et al.* 2005). On pense alors que pendant l'infection à VIH, caractérisée par la forte déplétion des cellules Th17, il se produit une polarisation des lymphocytes T naïves en lymphocytes Th1, au détriment des lymphocytes Th17 au niveau des muqueuses intestinales. Les taux viraux élevés sont en partie à l'origine de l'activation immunitaire au niveau des muqueuses intestinales. De plus, la progression de l'infection a été associée avec la déplétion des cellules Th17 et l'augmentation de la fréquence des cellules Treg, ainsi que la translocation microbienne (Favre, Lederer *et al.* 2009; Kanwar, Favre *et al.* 2010). De plus, la perte de la balance Th17/Treg a été associée avec une activation immunitaire soutenue, et le changement vers la voie de signalisation du stress cellulaire et la polarisation Th1 (Favre, Lederer *et al.* 2009; Lederer, Favre *et al.* 2009). La perte rapide des lymphocytes Th17 et de la balance Th17/Treg est associée avec de multiples signes de la progression de l'infection à VIH (Favre, Lederer *et al.* 2009). Les défauts de différenciation en cellules Th17 pourraient ainsi également jouer un rôle important dans les altérations fonctionnelles des cellules épithéliales intestinales observées chez les sujets infectés par le VIH-1 (Brenchley and Douek 2008; Macal, Sankaran *et al.* 2008).

L'environnement pro-inflammatoire favorisé par le VIH au niveau des cellules épithéliales engendre l'augmentation de la translocation bactérienne, alimentant ainsi l'activation immunitaire au niveau des muqueuses intestinales (Brenchley, Price *et al.* 2006; Douek, Roederer *et al.* 2009). Des données récentes démontrent clairement que la perméabilité de la muqueuse intestinale est altérée, permettant ainsi la translocation microbienne qui est une cause d'activation immunitaire chronique. Cette activation entraîne alors une plus forte répllication virale, conduisant à la destruction de davantage de tissus, et un cercle vicieux est alors établi. Dans ce contexte, les principales cellules T à propriétés antivirales, qui normalement contrôlèrent la répllication virale, sont entravées d'abord par l'activation immunitaire généralisée, et par la suite par les charges élevées d'antigènes et la stimulation chronique des cellules T. Cela conduit à des déficiences fonctionnelles des cellules T qui vont dégrader davantage la capacité de la réponse immunitaire à freiner la répllication du VIH (Douek, Roederer *et al.* 2009). La compréhension de ce concept mettant en jeu le mécanisme d'activation immunitaire dans le contexte d'une surface gastro-intestinale

peut indiquer de nouvelles interventions thérapeutiques qui viseraient à modifier les conséquences induites par l'infection à VIH.

Les bactéries commensales ou pathogéniques ayant traversé la barrière mucoale pendant la phase chronique activent le système immunitaire inné. Survient ensuite le recrutement d'un grand nombre de monocytes/macrophages et de cellules dendritiques sources de l'IL-12, et cibles virales potentielles. Sachant que l'IL-12 est un inducteur central de la réponse Th1 à médiation cellulaire, en stimulant la production de l'IFN- γ par les cellules NK et T, elle assure donc une protection contre différentes infections virales (Trinchieri 1998). Cependant, un défaut de production d'IL-12 durant la pathogenèse à VIH semble avoir un impact pathogénique considérable. En effet, la diminution en IL-12 serait un des facteurs responsables de la déficience de l'immunité innée, étant donné que le traitement des patients VIH⁺ par de l'IL-12 peut partiellement rétablir la prolifération des lymphocytes T (Clerici, Lucey *et al.* 1993). De plus, selon Mirani *et al.*, la protéine Vpr du VIH inhibe la production d'IL-12 en augmentant l'action des glucocorticoïdes endogènes, ce qui pourrait contribuer au déficit immunitaire observé chez les patients infectés par le VIH (Mirani, Elenkov *et al.* 2002). Clerici *et al.* ont rapporté que, lors de la progression vers le stade SIDA, on observe une diminution de la production de l'IL-2 et de l'IFN- γ , associée avec l'augmentation de la production l'IL-4 et de l'IL-10, laissant croire initialement que se produisait un changement de polarisation des cellules Th1 vers les cellules Th2 (Clerici and Shearer 1993). Plus tard, la découverte de la sous-population Th17 expliqua le changement du milieu de cytokines pro-inflammatoires durant l'infection à VIH, et révéla qu'il ne s'agissait pas d'un changement vers un profil de polarisation Th2, mais plutôt du développement par défaut Th1 en dépit d'un profil de polarisation Th17 (Ancuta, Monteiro *et al.* 2010). La sous-population de cellules T CD4⁺ Th17 située dans la muqueuse cervicale co-exprime de multiples marqueurs de susceptibilité au VIH; leur épuisement spectaculaire suite à l'infection à VIH suggère que ces cellules peuvent servir de cibles potentielles lors de la transmission du VIH (McKinnon, Nyanga *et al.* 2011). Ces hypothèses de changement de polarisation des cellules T CD4⁺ lors de l'infection à VIH méritent d'être revisitées dans le contexte de la nouvelle compréhension de l'hétérogénéité fonctionnelle des cellules T CD4⁺ (Zhou, Chong *et al.* 2009).

Tout comme les lymphocytes Th17, il a été rapporté par Kim *et al.* que les lymphocytes Th22 représentent une cible potentielle de l'infection à VIH de par la forte expression des récepteurs d'entrée du VIH CCR5 et $\alpha 4\beta 7$ à leur surface, et sont donc

diminuées en fréquence au niveau de l'intestin des sujets infectés par le VIH. Ces cellules jouent un rôle primordial dans la reconstruction et le maintien de l'intégrité de la barrière épithéliale, qui est assurée en partie grâce à l'effet de l'IL-22, cytokine produite à la fois par les cellules Th17 et les Th22. Pendant l'infection à VIH, la diminution de l'expression de l'IL-22 dans l'environnement muqueux pourrait induire l'altération de la barrière épithéliale et par conséquent une forte translocation bactérienne. De ce fait, l'IL-22 devrait faire l'objet de perspectives de recherche futures en vue d'établir des stratégies thérapeutiques visant à rétablir l'équilibre immunitaire au sein de l'environnement muqueux, empêchant ainsi la translocation bactérienne à travers la barrière épithéliale et l'activation immunitaire chronique.

L'ensemble des résultats inclus dans ce mémoire de Maîtrise suggère que la haute permissivité à l'infection par le VIH des lymphocytes Th17 serait indirectement à l'origine de la diminution du recrutement des lymphocytes Th17 et des neutrophiles par les cellules épithéliales intestinales (Figure 18). On pense que ce phénomène est à l'origine de l'altération de la barrière épithéliale et de la forte translocation microbienne. Toutefois, les résultats obtenus ont porté sur l'utilisation de lignées de cellules épithéliales cancéreuses et ces résultats doivent être confirmés à travers l'utilisation de cultures primaires de cellules épithéliales provenant des biopsies des sujets non infectés et des sujets infectés par le VIH à différents stades évolutifs de la pathologie. L'accès futur à ces échantillons humains très précieux nous permettra de valider le modèle que nous proposons dans ce mémoire de Maîtrise (Figure 17).

6. Bibliographie

- Abel, K., D. M. Rocke, et al. (2005). "Temporal and anatomic relationship between virus replication and cytokine gene expression after vaginal simian immunodeficiency virus infection." J Virol **79**(19): 12164-12172.
- Abonyo, B. O., K. D. Leiby, et al. (2006). "Modulation of eotaxin-3 (CCL26) in alveolar type II epithelial cells." Cytokine **36**(5-6): 237-244.
- Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, et al. (2007). "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." Nat Immunol **8**(9): 942-949.
- Akira, S. (2009). "Pathogen recognition by innate immunity and its signaling." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **85**(4): 143-156.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, et al. (1996). "CCR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." Science **272**(5270): 1955-1958.
- Ancuta, P., A. Kamat, et al. (2008). "Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients." PLoS One **3**(6): e2516.
- Ancuta, P., P. Monteiro, et al. (2010). "Th17 lineage commitment and HIV-1 pathogenesis." Curr Opin HIV AIDS **5**(2): 158-165.
- Andersson, J., A. Boasso, et al. (2005). "The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients." J Immunol **174**(6): 3143-3147.
- Apte, R. N., S. Dotan, et al. (2006). "The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions." Cancer Metastasis Rev **25**(3): 387-408.
- Aujla, S. J., Y. R. Chan, et al. (2008). "IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia." Nat Med **14**(3): 275-281.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-871.
- Basu, V. P., M. Song, et al. (2008). "Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription." Virus Res **134**(1-2): 19-38.
- Bergamaschi, A. and G. Pancino (2010). "Host hindrance to HIV-1 replication in monocytes and macrophages." Retrovirology **7**: 31.
- Berkhout, B., R. H. Silverman, et al. (1989). "Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target." Cell **59**(2): 273-282.

- Berlier, W., T. Bourlet, et al. (2005). "Selective sequestration of X4 isolates by human genital epithelial cells: Implication for virus tropism selection process during sexual transmission of HIV." J Med Virol **77**(4): 465-474.
- Bickel, M. (1993). "The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation." J Periodontol **64**(5 Suppl): 456-460.
- Blankson, J. N., D. Persaud, et al. (2002). "The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection." Annu Rev Med **53**: 557-593.
- Bleul, C. C., M. Farzan, et al. (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." Nature **382**(6594): 829-833.
- Bomsel, M. and A. Alfsen (2003). "Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(1): 57-68.
- Brenchley, J. M. and D. C. Douek (2008). "HIV infection and the gastrointestinal immune system." Mucosal Immunol **1**(1): 23-30.
- Brenchley, J. M. and D. C. Douek (2008). "The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis." Curr Opin HIV AIDS **3**(3): 356-361.
- Brenchley, J. M., M. Paiardini, et al. (2008). "Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections." Blood **112**(7): 2826-2835.
- Brenchley, J. M., D. A. Price, et al. (2006). "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection." Nat Med **12**(12): 1365-1371.
- Brenchley, J. M., T. W. Schacker, et al. (2004). "CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract." J Exp Med **200**(6): 749-759.
- Brussel, A. and P. Sonigo (2003). "Analysis of early human immunodeficiency virus type 1 DNA synthesis by use of a new sensitive assay for quantifying integrated provirus." J Virol **77**(18): 10119-10124.
- Carswell, E. A., L. J. Old, et al. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-3670.
- Casola, A., M. K. Estes, et al. (1998). "Rotavirus infection of cultured intestinal epithelial cells induces secretion of CXC and CC chemokines." Gastroenterology **114**(5): 947-955.
- Chang, T. L., J. Vargas, Jr., et al. (2005). "Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity." J Clin Invest **115**(3): 765-773.

- Chen, C. C. and A. M. Manning (1995). "Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: a dominant role for NF-kappa B." Agents Actions Suppl **47**: 135-141.
- Chen, K., J. Huang, et al. (2006). "Alpha interferon potently enhances the anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of APOBEC3G in resting primary CD4 T cells." J Virol **80**(15): 7645-7657.
- Chomont, N., M. El-Far, et al. (2009). "HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation." Nat Med **15**(8): 893-900.
- Chomont, N., H. Hocini, et al. (2008). "Neutralizing monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type 1 do not inhibit viral transcytosis through mucosal epithelial cells." Virology **370**(2): 246-254.
- Choungnet, C. A. and G. M. Shearer (2007). "Regulatory T cells (Treg) and HIV/AIDS: summary of the September 7-8, 2006 workshop." AIDS Res Hum Retroviruses **23**(7): 945-952.
- Chu, C. and P. A. Selwyn (2011). "Complications of HIV infection: a systems-based approach." Am Fam Physician **83**(4): 395-406.
- Chun, T. W., D. Engel, et al. (1998). "Induction of HIV-1 replication in latently infected CD4+ T cells using a combination of cytokines." J Exp Med **188**(1): 83-91.
- Cicala, C., J. Arthos, et al. (2011). "HIV-1 envelope, integrins and co-receptor use in mucosal transmission of HIV." J Transl Med **9 Suppl 1**: S2.
- Clavel, F., D. Guetard, et al. (1986). "Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS." Science **233**(4761): 343-346.
- Clerici, M., D. R. Lucey, et al. (1993). "Restoration of HIV-specific cell-mediated immune responses by interleukin-12 in vitro." Science **262**(5140): 1721-1724.
- Clerici, M. and G. M. Shearer (1993). "A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection." Immunol Today **14**(3): 107-111.
- Cocchi, F., A. L. DeVico, et al. (1995). "Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells." Science **270**(5243): 1811-1815.
- Coffin, J., A. Haase, et al. (1986). "Human immunodeficiency viruses." Science **232**(4751): 697.
- Collins, T., M. A. Read, et al. (1995). "Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers." FASEB J **9**(10): 899-909.

- Creese, A., K. Floyd, et al. (2002). "Cost-effectiveness of HIV/AIDS interventions in Africa: a systematic review of the evidence." Lancet **359**(9318): 1635-1643.
- Daher, K. A., M. E. Selsted, et al. (1986). "Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins." J Virol **60**(3): 1068-1074.
- Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, et al. (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." Nature **312**(5996): 763-767.
- Dandekar, S., M. D. George, et al. (2010). "Th17 cells, HIV and the gut mucosal barrier." Curr Opin HIV AIDS **5**(2): 173-178.
- Dann, S. M. and L. Eckmann (2007). "Innate immune defenses in the intestinal tract." Curr Opin Gastroenterol **23**(2): 115-120.
- de Silva, T. I., M. Cotten, et al. (2008). "HIV-2: the forgotten AIDS virus." Trends Microbiol **16**(12): 588-595.
- Deeks, S. G. and B. D. Walker (2007). "Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy." Immunity **27**(3): 406-416.
- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." Nature **381**(6584): 661-666.
- Dhawan, S., L. M. Wahl, et al. (1995). "Interferon-gamma inhibits HIV-induced invasiveness of monocytes." J Leukoc Biol **58**(6): 713-716.
- Dion, M. L., J. F. Poulin, et al. (2004). "HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation." Immunity **21**(6): 757-768.
- Doms, R. W. (2001). "Chemokine receptors and HIV entry." AIDS **15 Suppl 1**: S34-35.
- Douek, D. C., L. J. Picker, et al. (2003). "T cell dynamics in HIV-1 infection." Annu Rev Immunol **21**: 265-304.
- Douek, D. C., M. Roederer, et al. (2009). "Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS." Annu Rev Med **60**: 471-484.
- Driscoll, K. E. (2000). "TNFalpha and MIP-2: role in particle-induced inflammation and regulation by oxidative stress." Toxicol Lett **112-113**: 177-183.
- Duits, L. A., B. Ravensbergen, et al. (2002). "Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells." Immunology **106**(4): 517-525.
- Eder, C. (2009). "Mechanisms of interleukin-1beta release." Immunobiology **214**(7): 543-553.
- Epple, H. J., K. Allers, et al. (2010). "Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4+ and CD8+ T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect." Gastroenterology **139**(4): 1289-1300.

- Estes, J. D., L. D. Harris, et al. (2010). "Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections." PLoS Pathog **6**(8).
- Fahey, J. V., T. M. Schaefer, et al. (2005). "Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract." Hum Reprod **20**(6): 1439-1446.
- Fantini, J., N. Yahi, et al. (1992). "Human colon epithelial cells productively infected with human immunodeficiency virus show impaired differentiation and altered secretion." J Virol **66**(1): 580-585.
- Fantuzzi, G. and C. A. Dinarello (1999). "Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1)." J Clin Immunol **19**(1): 1-11.
- Farnet, C. M. and F. D. Bushman (1996). "HIV cDNA integration: molecular biology and inhibitor development." AIDS 10 Suppl A: S3-11.
- Favre, D., S. Lederer, et al. (2009). "Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection." PLoS Pathog **5**(2): e1000295.
- Favre, D., C. A. Stoddart, et al. (2011). "HIV disease progression correlates with the generation of dysfunctional naive CD8(low) T cells." Blood **117**(7): 2189-2199.
- Feng, Z., G. R. Dubyak, et al. (2006). "Cutting edge: human beta defensin 3--a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4." J Immunol **177**(2): 782-786.
- Fisher, A. G., M. B. Feinberg, et al. (1986). "The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication." Nature **320**(6060): 367-371.
- Ford, E. S., C. E. Puro, et al. (2009). "Immunopathogenesis of asymptomatic chronic HIV Infection: the calm before the storm." Curr Opin HIV AIDS **4**(3): 206-214.
- Forstner, G., Y. Zhang, et al. (1993). "Mucin secretion by T84 cells: stimulation by PKC, Ca²⁺, and a protein kinase activated by Ca²⁺ ionophore." Am J Physiol **264**(6 Pt 1): G1096-1102.
- Foster, J. L. and J. V. Garcia (2008). "HIV-1 Nef: at the crossroads." Retrovirology **5**: 84.
- Freed, E. O. (2001). "HIV-1 replication." Somat Cell Mol Genet **26**(1-6): 13-33.
- Fujiie, S., K. Hieshima, et al. (2001). "Proinflammatory cytokines induce liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20 in mucosal epithelial cells through NF-kappaB [correction of NK-kappaB]." Int Immunol **13**(10): 1255-1263.

- Furci, L., F. Sironi, et al. (2007). "Alpha-defensins block the early steps of HIV-1 infection: interference with the binding of gp120 to CD4." Blood **109**(7): 2928-2935.
- Furuta, Y., K. Eriksson, et al. (1994). "Infection of vaginal and colonic epithelial cells by the human immunodeficiency virus type 1 is neutralized by antibodies raised against conserved epitopes in the envelope glycoprotein gp120." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(26): 12559-12563.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, et al. (1983). "Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 865-867.
- Gallo, S. A., W. Wang, et al. (2006). "Theta-defensins prevent HIV-1 Env-mediated fusion by binding gp41 and blocking 6-helix bundle formation." J Biol Chem **281**(27): 18787-18792.
- Galvin, S. R. and M. S. Cohen (2004). "The role of sexually transmitted diseases in HIV transmission." Nat Rev Microbiol **2**(1): 33-42.
- Ganz, T., M. E. Selsted, et al. (1985). "Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils." J Clin Invest **76**(4): 1427-1435.
- Ghosh, M., Z. Shen, et al. (2009). "CCL20/MIP3alpha is a novel anti-HIV-1 molecule of the human female reproductive tract." Am J Reprod Immunol **62**(1): 60-71.
- Godinez, I., M. Raffatellu, et al. (2009). "Interleukin-23 orchestrates mucosal responses to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the intestine." Infect Immun **77**(1): 387-398.
- Gordon, M. A. (2008). "Salmonella infections in immunocompromised adults." J Infect **56**(6): 413-422.
- Gosselin, A., P. Monteiro, et al. (2010). "Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection." J Immunol **184**(3): 1604-1616.
- Greene, W. C. and B. M. Peterlin (2002). "Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy." Nat Med **8**(7): 673-680.
- Grivel, J. C., R. J. Shattock, et al. (2011). "Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper?" J Transl Med **9 Suppl 1**: S6.
- Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, et al. (2006). "Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys." Nat Med **12**(3): 289-295.
- Guess, J. C. and D. J. McCance (2005). "Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16

- E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3 α production." J Virol **79**(23): 14852-14862.
- Guimaraes, M. D., D. Vlahov, et al. (1997). "Postcoital vaginal bleeding as a risk factor for transmission of the human immunodeficiency virus in a heterosexual partner study in Brazil. Rio de Janeiro Heterosexual Study Group." Arch Intern Med **157**(12): 1362-1368.
- Haase, A. T. (1999). "Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues." Annu Rev Immunol **17**: 625-656.
- Hammond, M. E., G. R. Lapointe, et al. (1995). "IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors." J Immunol **155**(3): 1428-1433.
- Harmsen, M. C., P. J. Swart, et al. (1995). "Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro." J Infect Dis **172**(2): 380-388.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol **6**(11): 1123-1132.
- Hartupée, J., C. Liu, et al. (2007). "IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization." J Immunol **179**(6): 4135-4141.
- Harwani, S. C., N. S. Lurain, et al. (2007). "Differential inhibition of human cytomegalovirus (HCMV) by toll-like receptor ligands mediated by interferon-beta in human foreskin fibroblasts and cervical tissue." Virol J **4**: 133.
- Hennes, S., E. van Thoor, et al. (2006). "IL-17A acts via p38 MAPK to increase stability of TNF-alpha-induced IL-8 mRNA in human ASM." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **290**(6): L1283-1290.
- Hirota, K., H. Yoshitomi, et al. (2007). "Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model." J Exp Med **204**(12): 2803-2812.
- Hocini, H., L. Belec, et al. (1997). "High-level ability of secretory IgA to block HIV type 1 transcytosis: contrasting secretory IgA and IgG responses to glycoprotein 160." AIDS Res Hum Retroviruses **13**(14): 1179-1185.
- Hofer, U. and R. F. Speck (2009). "Disturbance of the gut-associated lymphoid tissue is associated with disease progression in chronic HIV infection." Semin Immunopathol **31**(2): 257-266.

- Howell, A. L., R. D. Edkins, et al. (1997). "Human immunodeficiency virus type 1 infection of cells and tissues from the upper and lower human female reproductive tract." J Virol **71**(5): 3498-3506.
- Ibarrondo, F. J., P. A. Anton, et al. (2005). "Parallel human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T-lymphocyte responses in blood and mucosa during chronic infection." J Virol **79**(7): 4289-4297.
- Iqbal, S. M., T. B. Ball, et al. (2009). "Elevated elafin/trappin-2 in the female genital tract is associated with protection against HIV acquisition." AIDS **23**(13): 1669-1677.
- Ito, T., W. F. t. Carson, et al. (2011). "CCR6 as a mediator of immunity in the lung and gut." Exp Cell Res **317**(5): 613-619.
- Ivanov, II, B. S. McKenzie, et al. (2006). "The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." Cell **126**(6): 1121-1133.
- Jan, M. S., Y. H. Huang, et al. (2006). "CC chemokines induce neutrophils to chemotaxis, degranulation, and alpha-defensin release." J Acquir Immune Defic Syndr **41**(1): 6-16.
- Jordan, N. J., G. Kolios, et al. (1999). "Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells." J Clin Invest **104**(8): 1061-1069.
- Kanwar, B., D. Favre, et al. (2010). "Th17 and regulatory T cells: implications for AIDS pathogenesis." Curr Opin HIV AIDS **5**(2): 151-157.
- Kaushic, C., V. H. Ferreira, et al. (2010). "HIV infection in the female genital tract: discrete influence of the local mucosal microenvironment." Am J Reprod Immunol **63**(6): 566-575.
- Kedzierska, K. and S. M. Crowe (2001). "Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications." Antivir Chem Chemother **12**(3): 133-150.
- Kelly, C. P., S. Keates, et al. (1994). "IL-8 secretion and neutrophil activation by HT-29 colonic epithelial cells." Am J Physiol **267**(6 Pt 1): G991-997.
- Kimpton, J. and M. Emerman (1992). "Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene." J Virol **66**(4): 2232-2239.
- Kinugasa, T., T. Sakaguchi, et al. (2000). "Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators." Gastroenterology **118**(6): 1001-1011.
- Klatzmann, D., E. Champagne, et al. (1984). "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV." Nature **312**(5996): 767-768.

- Kleinman, D., I. Sarov, et al. (1984). "Infection of endometrial cells with human cytomegalovirus." Gynecol Obstet Invest **17**(2): 89-95.
- Kolls, J. K. and S. A. Khader (2010). "The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity." Cytokine Growth Factor Rev **21**(6): 443-448.
- Korn, T., E. Bettelli, et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.
- Kuestner, R. E., D. W. Taft, et al. (2007). "Identification of the IL-17 receptor related molecule IL-17RC as the receptor for IL-17F." J Immunol **179**(8): 5462-5473.
- Kwon, J. H., S. Keates, et al. (2002). "Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease." Gut **51**(6): 818-826.
- Kyd, J. M. and A. W. Cripps (2008). "Functional differences between M cells and enterocytes in sampling luminal antigens." Vaccine **26**(49): 6221-6224.
- Lackner, A. A. and R. S. Veazey (2007). "Current concepts in AIDS pathogenesis: insights from the SIV/macaque model." Annu Rev Med **58**: 461-476.
- Lajoie, J., J. Poudrier, et al. (2010). "Chemokine expression patterns in the systemic and genital tract compartments are associated with HIV-1 infection in women from Benin." J Clin Immunol **30**(1): 90-98.
- Lane, H. C. and A. S. Fauci (1985). "Immunologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome." Annu Rev Immunol **3**: 477-500.
- Lapenta, C., M. Boirivant, et al. (1999). "Human intestinal lamina propria lymphocytes are naturally permissive to HIV-1 infection." Eur J Immunol **29**(4): 1202-1208.
- Lederer, S., D. Favre, et al. (2009). "Transcriptional profiling in pathogenic and non-pathogenic SIV infections reveals significant distinctions in kinetics and tissue compartmentalization." PLoS Pathog **5**(2): e1000296.
- Lee, J. W., P. Wang, et al. (2008). "Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells." J Immunol **181**(9): 6536-6545.
- Levy, J. A. (2003). "The search for the CD8+ cell anti-HIV factor (CAF)." Trends Immunol **24**(12): 628-632.
- Li, H., X. Li, et al. (2009). "HSV-2 induces TLRs and NF-kappaB-dependent cytokines in cervical epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **379**(3): 686-690.
- Li, Q., J. D. Estes, et al. (2008). "Simian immunodeficiency virus-induced intestinal cell apoptosis is the underlying mechanism of the regenerative enteropathy of early infection." J Infect Dis **197**(3): 420-429.

- Li, Q., J. D. Estes, et al. (2009). "Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission." Nature **458**(7241): 1034-1038.
- Li, X., L. Krishnan, et al. (2011). "Structural biology of retroviral DNA integration." Virology **411**(2): 194-205.
- Liao, F., R. L. Rabin, et al. (1999). "CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha." J Immunol **162**(1): 186-194.
- Lieber, M., B. Smith, et al. (1976). "A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells." Int J Cancer **17**(1): 62-70.
- Linge, H. M., M. Collin, et al. (2008). "The antibacterial chemokine MIG/CXCL9 is constitutively expressed in epithelial cells of the male urogenital tract and is present in seminal plasma." J Interferon Cytokine Res **28**(3): 191-196.
- Liu, L., C. Zhao, et al. (1997). "The human beta-defensin-1 and alpha-defensins are encoded by adjacent genes: two peptide families with differing disulfide topology share a common ancestry." Genomics **43**(3): 316-320.
- Lotze, M. T., H. J. Zeh, et al. (2007). "The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity." Immunol Rev **220**: 60-81.
- Lu, T., Y. Pan, et al. (2004). "Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain." Nature **429**(6994): 883-891.
- Macal, M., S. Sankaran, et al. (2008). "Effective CD4+ T-cell restoration in gut-associated lymphoid tissue of HIV-infected patients is associated with enhanced Th17 cells and polyfunctional HIV-specific T-cell responses." Mucosal Immunol **1**(6): 475-488.
- MacDonald, E. M., A. Savoy, et al. (2007). "Susceptibility of human female primary genital epithelial cells to herpes simplex virus, type-2 and the effect of TLR3 ligand and sex hormones on infection." Biol Reprod **77**(6): 1049-1059.
- Mackewicz, C. E., J. Yuan, et al. (2003). "alpha-Defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors." AIDS **17**(14): F23-32.
- Mahalingam, S. and G. Karupiah (1999). "Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases." Immunol Cell Biol **77**(6): 469-475.
- Manel, N., D. Unutmaz, et al. (2008). "The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgammat." Nat Immunol **9**(6): 641-649.

- Mason, R. W., T. Simpson-Small, et al. (2003). "Regulation of $^{86}\text{Rb}^+$ ion transport across polarized human colonocytes by bis-phenolic compounds." Clin Exp Pharmacol Physiol **30**(9): 623-626.
- McAleer, J. P. and J. K. Kolls (2011). "Mechanisms controlling Th17 cytokine expression and host defense." J Leukoc Biol **90**(2): 263-270.
- McKinnon, L. R., B. Nyanga, et al. (2011). "Characterization of a Human Cervical CD4+ T Cell Subset Coexpressing Multiple Markers of HIV Susceptibility." J Immunol.
- McNeely, T. B., D. C. Shugars, et al. (1997). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription." Blood **90**(3): 1141-1149.
- Meddows-Taylor, S., D. J. Martin, et al. (1999). "Impaired interleukin-8-induced degranulation of polymorphonuclear neutrophils from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals." Clin Diagn Lab Immunol **6**(3): 345-351.
- Meng, G., M. T. Sellers, et al. (2000). "Lamina propria lymphocytes, not macrophages, express CCR5 and CXCR4 and are the likely target cell for human immunodeficiency virus type 1 in the intestinal mucosa." J Infect Dis **182**(3): 785-791.
- Mestecky, J. (2006). "Humoral immune responses to the human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) in the genital tract compared to other mucosal sites." J Reprod Immunol **72**(1-2): 1-17.
- Minegishi, Y., M. Saito, et al. (2009). "Molecular explanation for the contradiction between systemic Th17 defect and localized bacterial infection in hyper-IgE syndrome." J Exp Med **206**(6): 1291-1301.
- Mirani, M., I. Elenkov, et al. (2002). "HIV-1 protein Vpr suppresses IL-12 production from human monocytes by enhancing glucocorticoid action: potential implications of Vpr coactivator activity for the innate and cellular immunity deficits observed in HIV-1 infection." J Immunol **169**(11): 6361-6368.
- Montagnier, L., J. C. Chermann, et al. (1984). "Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS." Princess Takamatsu Symp **15**: 319-331.
- Montagnier, L., J. Gruest, et al. (1984). "Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines." Science **225**(4657): 63-66.
- Monteiro, P., A. Gosselin, et al. (2011). "Memory CCR6+CD4+ T cells are preferential targets for productive HIV type 1 infection regardless of their expression of integrin beta7." J Immunol **186**(8): 4618-4630.

- Murdoch, C., P. N. Monk, et al. (1999). "Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on human epithelial cells." *Immunology* **98**(1): 36-41.
- Musey, L., Y. Hu, et al. (1997). "HIV-1 induces cytotoxic T lymphocytes in the cervix of infected women." *J Exp Med* **185**(2): 293-303.
- Nakashima, H., N. Yamamoto, et al. (1993). "Defensins inhibit HIV replication in vitro." *AIDS* **7**(8): 1129.
- Nazli, A., O. Chan, et al. (2010). "Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation." *PLoS Pathog* **6**(4): e1000852.
- Nazli, A., X. D. Yao, et al. (2009). "Differential induction of innate anti-viral responses by TLR ligands against Herpes simplex virus, type 2, infection in primary genital epithelium of women." *Antiviral Res* **81**(2): 103-112.
- Nguyen, T. X., A. M. Cole, et al. (2003). "Evolution of primate theta-defensins: a serpentine path to a sweet tooth." *Peptides* **24**(11): 1647-1654.
- Nomaguchi, M., M. Fujita, et al. (2008). "Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis." *Microbes Infect* **10**(9): 960-967.
- Norvell, M. K., G. I. Benrubi, et al. (1984). "Investigation of microtrauma after sexual intercourse." *J Reprod Med* **29**(4): 269-271.
- Olsson, J., M. Poles, et al. (2000). "Human immunodeficiency virus type 1 infection is associated with significant mucosal inflammation characterized by increased expression of CCR5, CXCR4, and beta-chemokines." *J Infect Dis* **182**(6): 1625-1635.
- Palmisano, L. and S. Vella (2011). "A brief history of antiretroviral therapy of HIV infection: success and challenges." *Ann Ist Super Sanita* **47**(1): 44-48.
- Park, H., Z. Li, et al. (2005). "A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17." *Nat Immunol* **6**(11): 1133-1141.
- Pazgier, M., D. M. Hoover, et al. (2006). "Human beta-defensins." *Cell Mol Life Sci* **63**(11): 1294-1313.
- Pelletier, M., L. Maggi, et al. (2010). "Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells." *Blood* **115**(2): 335-343.
- Petit, C., F. Buseyne, et al. (2001). "Nef is required for efficient HIV-1 replication in cocultures of dendritic cells and lymphocytes." *Virology* **286**(1): 225-236.
- Pierson, T., J. McArthur, et al. (2000). "Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy." *Annu Rev Immunol* **18**: 665-708.

- Pioli, P. A., L. K. Weaver, et al. (2006). "Lipopolysaccharide-induced IL-1 beta production by human uterine macrophages up-regulates uterine epithelial cell expression of human beta-defensin 2." J Immunol **176**(11): 6647-6655.
- Pitrak, D. L. (1999). "Neutrophil deficiency and dysfunction in HIV-infected patients." Am J Health Syst Pharm **56 Suppl 5**: S9-16.
- Quigley, M. F., K. Abel, et al. (2006). "Perforin expression in the gastrointestinal mucosa is limited to acute simian immunodeficiency virus infection." J Virol **80**(6): 3083-3087.
- Quillent, C., E. Oberlin, et al. (1998). "HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene." Lancet **351**(9095): 14-18.
- Quinones-Mateu, M. E., M. M. Lederman, et al. (2003). "Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication." AIDS **17**(16): F39-48.
- Raffatellu, M., R. L. Santos, et al. (2008). "Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut." Nat Med **14**(4): 421-428.
- Reibman, J., Y. Hsu, et al. (2003). "Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter." Am J Respir Cell Mol Biol **28**(6): 648-654.
- Rerks-Ngarm, S., P. Pitisuttithum, et al. (2009). "Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand." N Engl J Med **361**(23): 2209-2220.
- Reynolds, J. M., P. Angkasekwinai, et al. (2010). "IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity." Cytokine Growth Factor Rev **21**(6): 413-423.
- Rich, E. A., J. R. Panuska, et al. (1989). "Dyscoordinate expression of tumor necrosis factor-alpha by human blood monocytes and alveolar macrophages." Am Rev Respir Dis **139**(4): 1010-1016.
- Roederer, M. (2001). "Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats." Cytometry **45**(3): 194-205.
- Romani, B. and S. Engelbrecht (2009). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: functions and molecular interactions." J Gen Virol **90**(Pt 8): 1795-1805.
- Saidi, H., G. Magri, et al. (2007). "R5- and X4-HIV-1 use differentially the endometrial epithelial cells HEC-1A to ensure their own spread: implication for mechanisms of sexual transmission." Virology **358**(1): 55-68.
- Sankaran, S., M. D. George, et al. (2008). "Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an

- imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration." J Virol **82**(1): 538-545.
- Sauce, D., M. Larsen, et al. (2011). "HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis." Blood **117**(19): 5142-5151.
- Scarlatti, G., E. Tresoldi, et al. (1997). "In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression." Nat Med **3**(11): 1259-1265.
- Schaefer, T. M., K. Desouza, et al. (2004). "Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells." Immunology **112**(3): 428-436.
- Schrofelbauer, B., Q. Yu, et al. (2005). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases." J Virol **79**(17): 10978-10987.
- Schutysse, E., S. Struyf, et al. (2003). "The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6." Cytokine Growth Factor Rev **14**(5): 409-426.
- Shacklett, B. L. (2008). "Mucosal immunity to HIV: a review of recent literature." Curr Opin HIV AIDS **3**(5): 541-547.
- Shacklett, B. L., T. J. Beadle, et al. (2000). "Characterization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes expressing the mucosal lymphocyte integrin CD103 in rectal and duodenal lymphoid tissue of HIV-1-infected subjects." Virology **270**(2): 317-327.
- Shacklett, B. L., C. A. Cox, et al. (2003). "Trafficking of human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T cells to gut-associated lymphoid tissue during chronic infection." J Virol **77**(10): 5621-5631.
- Shen, R., E. R. Drelichman, et al. (2010). "GP41-specific antibody blocks cell-free HIV type 1 transcytosis through human rectal mucosa and model colonic epithelium." J Immunol **184**(7): 3648-3655.
- Sousa, A. E., J. Carneiro, et al. (2002). "CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load." J Immunol **169**(6): 3400-3406.
- Starmer, T. D., C. K. Barker, et al. (2003). "CCL20 is an inducible product of human airway epithelia with innate immune properties." Am J Respir Cell Mol Biol **29**(5): 627-633.
- Stevenson, M. (2003). "HIV-1 pathogenesis." Nat Med **9**(7): 853-860.
- Stillie, R., S. M. Farooq, et al. (2009). "The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN." J Leukoc Biol **86**(3): 529-543.

- Stockinger, B., M. Veldhoen, et al. (2007). "Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity." Semin Immunol **19**(6): 353-361.
- Subauste, M. C., D. C. Choi, et al. (2001). "Transient exposure of human bronchial epithelial cells to cytokines leads to persistent increased expression of ICAM-1." Inflammation **25**(6): 373-380.
- Summa, V., A. Petrocchi, et al. (2008). "Discovery of raltegravir, a potent, selective orally bioavailable HIV-integrase inhibitor for the treatment of HIV-AIDS infection." J Med Chem **51**(18): 5843-5855.
- Tang, Y. Q., J. Yuan, et al. (1999). "A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins." Science **286**(5439): 498-502.
- Tozser, J. (2003). "Stages of HIV replication and targets for therapeutic intervention." Curr Top Med Chem **3**(13): 1447-1457.
- Tran, D., P. A. Tran, et al. (2002). "Homodimeric theta-defensins from rhesus macaque leukocytes: isolation, synthesis, antimicrobial activities, and bacterial binding properties of the cyclic peptides." J Biol Chem **277**(5): 3079-3084.
- Trinchieri, G. (1998). "Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12." Int Rev Immunol **16**(3-4): 365-396.
- Trono, D., C. Van Lint, et al. (2010). "HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals." Science **329**(5988): 174-180.
- Unutmaz, D., V. N. KewalRamani, et al. (1999). "Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes." J Exp Med **189**(11): 1735-1746.
- van Grevenynghe, J., R. Halwani, et al. (2008). "Lymph node architecture collapse and consequent modulation of FOXO3a pathway on memory T- and B-cells during HIV infection." Semin Immunol **20**(3): 196-203.
- Vareille, M., E. Kieninger, et al. (2011). "The airway epithelium: soldier in the fight against respiratory viruses." Clin Microbiol Rev **24**(1): 210-229.
- Veazey, R. and A. Lackner (2003). "The mucosal immune system and HIV-1 infection." AIDS Rev **5**(4): 245-252.
- Veazey, R. S., K. G. Mansfield, et al. (2000). "Dynamics of CCR5 expression by CD4(+) T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection." J Virol **74**(23): 11001-11007.

- Veldhoen, M., R. J. Hocking, et al. (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." Immunity **24**(2): 179-189.
- Venkataraman, N., A. L. Cole, et al. (2009). "Reawakening retrocyclins: ancestral human defensins active against HIV-1." PLoS Biol **7**(4): e95.
- Vieillard, V., J. L. Strominger, et al. (2005). "NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(31): 10981-10986.
- Wahl, S. M., T. B. McNeely, et al. (1997). "Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in mucosal fluids inhibits HIV-I." Oral Dis **3 Suppl 1**: S64-69.
- Wang, W., A. M. Cole, et al. (2003). "Retrocyclin, an antiretroviral theta-defensin, is a lectin." J Immunol **170**(9): 4708-4716.
- Wang, W., S. M. Owen, et al. (2004). "Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1." J Immunol **173**(1): 515-520.
- Wayne, C. K. and S. F. Berkley (2010). "The renaissance in HIV vaccine development--future directions." N Engl J Med **363**(5): e7.
- Weiss, R. A. (2003). "HIV and AIDS in relation to other pandemics. Among the viruses plaguing humans, HIV is a recent acquisition. Its outstanding success as an infection poses immense scientific challenges to human health and raises the question "What comes next?"." EMBO Rep **4 Spec No**: S10-14.
- Wilde, C. G., J. E. Griffith, et al. (1989). "Purification and characterization of human neutrophil peptide 4, a novel member of the defensin family." J Biol Chem **264**(19): 11200-11203.
- Wilson, N. J., K. Boniface, et al. (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." Nat Immunol **8**(9): 950-957.
- Worgall, S., R. Connor, et al. (1999). "Expression and use of human immunodeficiency virus type 1 coreceptors by human alveolar macrophages." J Virol **73**(7): 5865-5874.
- Wu, L., N. P. Gerard, et al. (1996). "CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5." Nature **384**(6605): 179-183.
- Wu, X., Z. Y. Yang, et al. (2010). "Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1." Science **329**(5993): 856-861.
- Wu, Z., Z. Chen, et al. (2003). "Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ Cells: implications for mechanisms of sexual transmission." J Infect Dis **188**(10): 1473-1482.

- Yadav, S., Y. Shi, et al. (2010). "IL-16 effects on A549 lung epithelial cells: dependence on CD9 as an IL-16 receptor?" J Immunotoxicol **7**(3): 183-193.
- Yang, D., A. Biragyn, et al. (2004). "Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense." Annu Rev Immunol **22**: 181-215.
- Yang, D., Q. Chen, et al. (2000). "Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells." J Leukoc Biol **68**(1): 9-14.
- Yang, D., Q. Chen, et al. (2003). "Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity." J Leukoc Biol **74**(3): 448-455.
- Yang, D., O. Chertov, et al. (1999). "Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6." Science **286**(5439): 525-528.
- Yeaman, G. R., S. Asin, et al. (2004). "Chemokine receptor expression in the human ectocervix: implications for infection by the human immunodeficiency virus-type I." Immunology **113**(4): 524-533.
- Zhang, L., Y. Huang, et al. (1996). "HIV-1 subtype and second-receptor use." Nature **383**(6603): 768.
- Zhang, L., W. Yu, et al. (2002). "Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor." Science **298**(5595): 995-1000.
- Zheng, Y. H., N. Lovsin, et al. (2005). "Newly identified host factors modulate HIV replication." Immunol Lett **97**(2): 225-234.
- Zhou, L., M. M. Chong, et al. (2009). "Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation." Immunity **30**(5): 646-655.

7. Annexes

Poster présenté au

9th Joint Meeting International Society for Interferon and
Cytokine Research – International Cytokine Society
Cytokines & Interferons
From the Bench to the Bedside

October 9-12, 2011
Florence, Italy

Differential ability of intestinal and alveolar epithelial cells to respond to IL-17: Relevance for HIV-1 pathogenesis

Hanane Touil^{1,2}, Patricia Monteiro^{1,2}, Annie Gosselin², Vanessa Wacleche^{1,2}, Aurélie-Cleret Buhot^{1,2}, Nathalie Grandvaux^{2,3} and Petronela Ancuta^{1,2}

¹Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal; ²CHUM-Research Center, Saint Luc Hospital; and ³Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

ABSTRACT

Background: The alteration of the gut-associated lymphoid tissue (GALT) homeostasis in human immunodeficiency virus type 1 (HIV)-infected individuals leads to microbial translocation from the gut, which is a cause for chronic immune activation and HIV disease progression. Epithelial cells play a critical role in maintaining mucosal homeostasis by mechanisms including recruitment of innate and adaptive immunity cells. Neutrophils exhibit antiviral properties and may limit HIV replication at mucosal sites. Th17 cells contribute to the defense against pathogens by increasing the ability of epithelial cells to attract neutrophils in a IL-17-dependent manner. Th17 cells are highly permissive to HIV replication and are depleted from the GALT but not from the lungs of HIV-infected individuals. Here we investigated whether HIV differentially interfere with the ability of intestinal *versus* alveolar epithelial cells to attract Th17 cells and neutrophils.

Material and Methods: The intestinal HT-29, alveolar A549 (ATCC), uterine MAGI CD4+CCR5+ epithelial cell lines (NIH AIDS Reagent Program) were used in these studies. Recombinant human TNF- α and IL-1 β (R&D Systems) were used to stimulate epithelial cells. CCL20 and CXCL8 levels in cell supernatants were quantified by ELISA (R&D Systems). The expression of CD4, CCR5, CXCR4, and IL-17 receptor (IL-17R) was quantified by flow cytometry (BD LSRII) upon staining with fluorescence-conjugated antibodies (BD Pharmingen, eBiosciences). The expression of CD4, CCR5, and CXCR4 was also visualized by confocal microscopy (Zeiss Cell Observer). Epithelial cells were exposed to CCR5-using (R5) NL4.3BAL and CXCR4-using (X4) NL4.3 HIV strains, and HIV-DNA integration was quantified by nested real-time PCR.

Results: We demonstrated that both epithelial cell lines of intestinal (HT-29) and alveolar (A549) origin produced chemokines specific for neutrophils (CXCL8) and Th17 cells (CCL20) in response to IL-1 β and TNF- α stimulation. However, the production of these chemokines was higher in HT-29 *versus* A549 cells. Of particular importance, IL-17 acted in synergy with TNF- α to further increase levels of CCL20 production in HT-29 but not A549 cells. This phenomenon was associated with a superior upregulation of IL-17R expression on HT-29 *versus* A549 cells upon TNF- α or IL-1 β stimulation. Exposure to highly infectious doses of R5 and X4 HIV strains did not affect the ability of HT-29 and A549 cells to produce CCL20 and CXCL8 in response to IL-1 β , TNF- α , and/or IL-17.

Conclusion: Intestinal *versus* alveolar epithelial cells exhibit a higher ability to produce chemokines specific for Th17 (CCL20) and neutrophils (CXCL8) in response to TNF- α or IL-1 β . IL-17 acts in synergy with TNF- α to upregulate CCL20 production in intestinal but not alveolar cell lines. HIV does not appear to interfere with intestinal or alveolar epithelial cell ability to attract Th17 cells and neutrophils. Given the selective ability of intestinal epithelial cells to respond to IL-17, a newly described "danger signal", Th17 depletion and IL-17 deficiency during HIV infection may be a major cause for functional alterations of GALT epithelial cells. Studies are in progress to investigate whether IL-17, together with the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α , differentially regulate the ability of intestinal *versus* alveolar epithelial cells to produce antiviral molecules such as Type I Interferons and β -defensins.

RESULTS

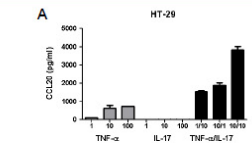


Figure 1: IL-17 acts in synergy with TNF- α to upregulate CCL20 production by intestinal but not alveolar epithelial cells. The intestinal epithelial cell line HT-29 (0.5×10^6 /well) and the alveolar epithelial cell line A549 (10^6 /well) were cultured in 48-well plates until 80% confluence. Cells were stimulated with TNF- α or IL-17 separately (1, 10 and 100 ng/ml) or with the TNF- α and IL-17 together (1 and 10 ng/ml) for 18 hours at 37°C. Levels of CCL20 production were quantified in cell supernatants from (A) HT-29 and (B) A549 cells by ELISA (R&D Systems). Shown are results from one experiment representative of results obtained with the same cell lines in three independent experiments (mean \pm SD of triplicate wells).

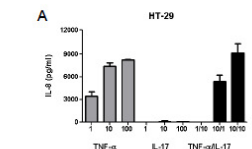


Figure 2: TNF- α but not IL-1 β upregulate CXCL8 production by intestinal and alveolar epithelial cells. The intestinal epithelial cell line HT-29 (0.5×10^6 /well) and the alveolar epithelial cell line A549 (10^6 /well) were cultured in 48-well plates until 80% confluence. Cells were stimulated with TNF- α or IL-17 separately (1, 10 and 100 ng/ml) or with the TNF- α and IL-17 together (1 and 10 ng/ml) for 18 hours at 37°C. Levels of CXCL8 production were quantified in cell supernatants from (A) HT-29 and (B) A549 cells by ELISA (R&D Systems). Shown are results from one experiment representative of results obtained with the same cell lines in three independent experiments (mean \pm SD of triplicate wells).

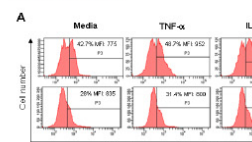


Figure 3: Intestinal *versus* alveolar epithelial cells express higher levels of the IL-17 receptor upon TNF- α or IL-1 β stimulation. The intestinal HT-29 and alveolar A549 cell lines were cultured in T25 tissue culture flasks in the presence or absence of TNF- α (10 ng/ml) or IL-1 β (10 ng/ml) for 18 hours at 37°C. Cells were then detached from the flasks using Versene and stained with PE-conjugated anti-IL-17R antibodies. The phenotype of the cells was analyzed by Flow Cytometry using a BD LSRII cytometer. (A) Shown are histograms of cell surface IL-17R expression on HT-29 and A549 cell lines under constitutive conditions (medium) or upon stimulation with pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β). The % of positive cells and the mean fluorescence intensity (MFI) values are indicated on histograms. (B) Shown are graphs summarizing the effects of TNF- α and IL-1 β on IL-17R expression by HT-29 and A549 cell lines (% of positive cells and MFI). Shown are results from one experiment representative of results obtained with the same cell lines in three independent experiments.

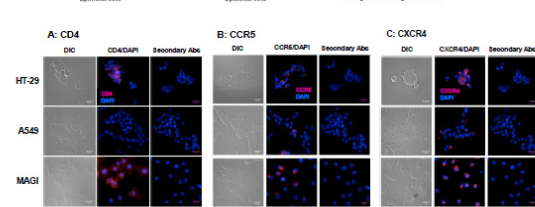


Figure 4: Intestinal *versus* alveolar epithelial cells express higher levels of the IL-17 receptor upon TNF- α or IL-1 β stimulation. The intestinal HT-29 and alveolar A549 cell lines were cultured in T25 tissue culture flasks in the presence or absence of TNF- α (10 ng/ml) or IL-1 β (10 ng/ml) for 18 hours at 37°C. Cells were then detached from the flasks using Versene and stained with PE-conjugated anti-IL-17R antibody. The phenotype of the cells was analyzed by Flow Cytometry using a BD LSRII cytometer. (A) Shown are histograms of cell surface IL-17R expression on HT-29 and A549 cell lines under constitutive conditions (medium) or upon stimulation with pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β). The % of positive cells and the mean fluorescence intensity (MFI) values are indicated on histograms. (B) Shown are graphs summarizing the effects of TNF- α and IL-1 β on IL-17R expression by HT-29 and A549 cell lines (% of positive cells and MFI). Shown are results from one experiment representative of results obtained with the same cell lines in three independent experiments. DIC, Differential Interference Contrast.

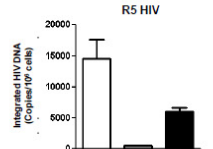


Figure 5: Quantification of integrated HIV DNA in intestinal *versus* alveolar epithelial cells. The intestinal HT-29 and alveolar A549 epithelial cells were cultured in 48-well plates and exposed to the R5 NL4.3BAL HIV strain (50 ng HIV-p24/well) for 48 hours at 37°C. Cells were harvested, the excess virus washed away, and lysed using a Promagene K buffer. Integrated HIV DNA levels were quantified by nested real-time PCR at days 3 post-infection using also HIV-LTR specific primers and HIV-specific DNA probes. CD3 was used as a reference gene for quantification (two CD3 copies per one cell). MAGI CD4+CCR5+ cells were used as positive controls for HIV permissiveness. Shown are results (HIV-DNA copy numbers per 10^6 cells) from two similar experiments. Each PCR was performed in triplicate using the Roche LightCycler 1.5 (mean \pm SD of triplicate PCR reactions).

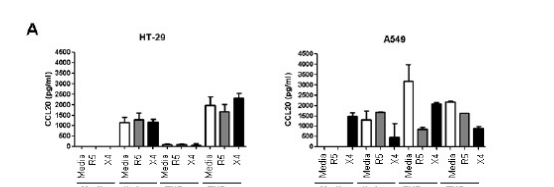


Figure 6: Exposure of epithelial cells to HIV does not affect their ability to produce CCL20 and CXCL8. Intestinal HT-29 (0.5×10^6 cells/well) and alveolar A549 (10^6 cells/well) epithelial cells were cultured in 24-well plates, then exposed to the R5 NL4.3BAL or X4 NL4.3 HIV strains (50 ng HIV-p24/well) for 24 hours at 37°C. Unbound virus was washed away by extensive washing. Cells were then treated with the following recombinant cytokines: IL-1 β or TNF- α (1, 10 and 100 ng/ml) or a mix of TNF- α (1 and 10 ng/ml) and IL-17 (1 and 10 ng/ml) for more 24 hours at 37°C. Supernatants were collected and levels of CCL20 and CXCL8 were quantified by ELISA. Shown are (A) CCL20 and (B) CXCL8 levels produced by HT-29 (left graphs) and A549 (right graphs). Shown are results from one experiment representative of results obtained with the same cell lines in three independent experiments (mean \pm SD of triplicate wells).

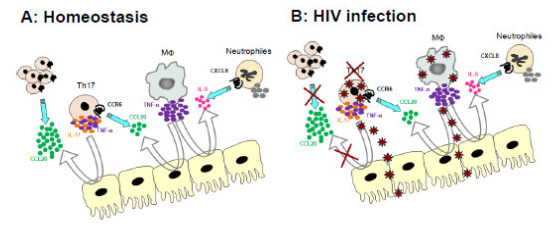


Figure 7: Proposed model for the IL-17 dependent regulation of Th17 cell trafficking into intestinal sites under constitutive conditions and during HIV infection. (A) Under constitutive conditions Th17 cells are recruited into mucosal sites where they produce IL-17. This cytokine acts on intestinal epithelial cells in synergy with other pro-inflammatory cytokines produced e.g. by macrophages (TNF- α , IL-1 β) and increases the ability of these cells to attract CCR6+ Th17 cells by upregulating the production of the CCR6 ligand CCL20. (B) During HIV infection, Th17 cells are preferential targets for infection and are therefore significantly depleted from the gut-associated lymphoid tissue (GALT). This depletion causes a paucity of IL-17 expression in the GALT that likely reduces the ability of intestinal epithelial cells to produce CCL20 and to further attract Th17 cells. In conclusion, our results suggest that IL-17 paucity in the GALT represents a new mechanism by which HIV alters epithelial intestinal cell homeostasis and causes disease progression in infected individuals.

Acknowledgements: The authors thank Laurence Lajeune (Flow Cytometry Core Facility, CHUM-Research Center, Saint-Luc Hospital, Montreal, QC, Canada) for expert technical support with polychromatic flow cytometry analysis and sorting. **Footnote:** This work was supported in part by grants to PA from the *Fondation du CHUM* and *Fonds de la Recherche en Santé Québec* (FRSQ). PA is supported by New Investigator awards from FRSQ.

were obtained from C57BL/6 infected mice with *Y. pseudotuberculosis* YPIIIpIB1 (carrying the virulence plasmid), mutants strains (YopJ-, YopM-, YopH- and YopE-), and controls mice (uninfected), and were incubated with PMA and ionomycin. The intracellular cytokines expression (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α and IFN- γ) of T lymphocytes subpopulations (CD4⁺, CD8⁺, Th17 and Treg) were determined through median intensity fluorescence (MIF) by flow cytometry on the 7th, 14th, 21th, 28th days post-infection. During *Y. pseudotuberculosis* infection, significant changes in the cytokines expression of CD4⁺ T cells were observed. The YPIIIpIB1 infection induced reduction in the IL-2, TNF- α and IFN- γ levels of CD4⁺ T cells, with the lower expression on the 14th day post-infection. The Th17 subpopulation obtained from infected mice with YPIIIpIB1 presented a decrease of 1.5-fold in the IL-17 expression of CD4⁺ T cells, on the 14th day post-infection. T lymphocytes from infected mice with deficient strains for YopJ, YopM and YopH reduced the capacity of impair the cytokines expression. The YopM- and YopH- infection led to large elevation in the pro-inflammatory cytokines expression, on the 14th and 21th days post-infection. The YPIIIpIB1 infection showed little influence on the CD8⁺ T cells and Treg. On the 21th day post-infection, the infected mice with YopM- and YopH- mutants strains displayed a significant increase in the IL-10 levels of Treg cells. Results suggest that *Y. pseudotuberculosis* can impair the immune response of T lymphocytes by interfering with cytokines expression, with influence of the Yops virulence factors.

doi:10.1016/j.cyto.2011.07.273

PS2-108

Infection with Hepatitis C down-regulates the expression of cytokine genes in peripheral blood

Milton W. Taylor¹, Christopher R. Bolen², Steven H. Kleinstein^{2,3}, Leonid Brodsky⁴,
¹ Department of Biology, Indiana University, Bloomington, IN 47401, USA,
² Interdepartmental Program in Computational Biology and Bioinformatics, Yale University, 300 George St. Suite 501, New Haven, CT 06511, USA, ³ Department of Pathology, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA, ⁴ Institute of Evolution, University of Haifa, Mount Carmel, Haifa 31905, Israel

The aim of this study was to characterize the effects of HCV infection on gene expression in the peripheral blood of infected patients. PBMC samples were collected from patients with chronic HCV infections and from healthy volunteers and incubated in culture for 24 h. RNA was isolated from these samples and analyzed using Affymetrix microarrays. Differential expression analysis using LIMMA indicated that a total of 66 genes were up-regulated in PBMC samples from HCV infected individuals with greater than 2-fold change at a false discovery rate of 5%, whereas 70 genes were down-regulated in the same samples. Interferon-related genes such as IL1RN, a series of CXCL chemokines, and the interleukins IL6 and IL8 were all found to be down-regulated in HCV infection. However other genes associated with IFN activity, such as members of the OAS and MX families, CXCL10, and CXCL11 were elevated in the HCV infected cells indicating different methods of controlling ISGs. Functional analysis using DAVID indicated that both the up- and down-regulated gene lists were significantly enriched for GO terms relating to viral infection and immune response, representing a number of genes associated with the interferon pathway. In addition, the down-regulated gene list was significantly enriched for terms related to cytokine activity, which included genes such as CXCL5 and CCL24. These differential responses may indicate differences in the T-cell and B-cell populations in the respective samples, or differential regulation of cytokine genes. We conclude that infection with HCV has a pronounced effect on gene expression in the blood of infected patients, and significantly down-regulates the expression of cytokine genes overall.

doi:10.1016/j.cyto.2011.07.274

PS2-109

Differential ability of intestinal and alveolar epithelial cells to respond to IL-17: Relevance for HIV-1 pathogenesis

Hanane Touil^{1,2}, Patricia Monteiro^{1,2}, Annie Gosselin¹, Vanessa Wacleche^{1,2}, Aurélie Cleret-Buhot^{1,2}, Nathalie Grandvaux², Petronela Ancuta¹, ¹ Université de Montréal, Department of Microbiology and Immunology, ² CHUM-Research Center, Saint Luc Hospital, Montreal, Quebec, Canada

The alteration of the gut-associated lymphoid tissue (GALT) homeostasis in human immunodeficiency virus type 1 (HIV)-infected individuals leads to microbial translocation from the gut, which is a cause for chronic immune activation. Epithelial cells play a critical role in maintaining mucosal homeostasis by mechanisms including recruitment of innate and adaptive immunity cells. Neutrophils exhibit antiviral properties and may limit HIV replication at mucosal sites. Th17 cells contribute to the defense against pathogens by increasing the ability of epithelial cells to attract neutrophils in a IL-17-dependent manner. Th17 cells are highly permissive to HIV replication and are depleted from the GALT but not from the lungs of HIV-infected individuals. Here we investigated whether HIV differentially interfere with the ability

of intestinal vs. alveolar epithelial cells to attract Th17 cells and neutrophils. We demonstrated that epithelial cell lines of intestinal (HT-29) and alveolar (A549) origin produced similarly high levels of chemokines specific for neutrophils (CXCL8) and Th17 cells (CCL20) in response to IL-1 β and TNF- α stimulation. However, TNF- α and IL-17 acted in synergy on HT-29 but not A549 cells to further increase levels of CCL20 production. This phenomenon was associated with the upregulation of IL-17 receptor expression on HT-29 but not A549 cells in response to TNF- α . Exposure to highly infectious doses of CCR5- and CXCR4-using HIV strains did not affect the ability of HT-29 and A549 cells to produce CCL20 and CXCL8. Thus, HIV does not appear to interfere directly with intestinal or alveolar epithelial cell ability to attract Th17 cells and neutrophils. Nevertheless, given the preferential ability of intestinal epithelial cells to respond to IL-17, a newly described "danger signal", Th17 depletion and IL-17 deficiency during HIV infection may be a major cause for functional alterations of GALT epithelial cells. Studies are in progress to investigate whether the Th17-produced cytokine IL-17, together with the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α , differentially regulate the ability of intestinal vs. alveolar epithelial cells to produce antiviral molecules such as Type I interferons and β -defensins

doi:10.1016/j.cyto.2011.07.275

PS2-110

Fungal PGE2 inhibits IL-17 expression during T cell differentiation

Patricia Valdez, Paul Vithayathil, Sandip Datta, National Institutes of Health

Th17 cells are important players in mucosal host defense through production of the signature cytokines IL-17 and IL-22. Prostaglandin E2 (PGE2) has been shown to enhance IL-17 production by mature Th17 cells. However, when added during Th17 differentiation, we find that PGE2 suppresses IL-17 but enhances IL-22 production. PGE2 also suppresses the transcriptional regulator IRF4, and this may mediate the differential effects of PGE2 on IL-17 and IL-22 since IRF4-deficient T cells fail to produce IL-17 after differentiation, but produce large amounts of IL-22. Many pathogenic organisms, including the fungus *Cryptococcus neoformans*, can produce PGE2. We find that *C. neoformans* can specifically inhibit induction of IRF4 and IL-17 during in vitro Th17 differentiation via production of PGE2. Host PGE2 can be suppressed in vivo during infection by the administration of Indomethacin, a COX inhibitor. Indomethacin treatment prolongs survival of mice after pulmonary infection with *C. neoformans*, and this increased survival corresponds to increased IL-17 production from CD4 T cells. These findings suggest that host- or pathogen-derived PGE2 can act directly on Th17 cells during differentiation to inhibit IL-17-dependent anti-microbial responses.

doi:10.1016/j.cyto.2011.07.276

PS2-111

Targeting the IL-10 signalling pathway as a vaccine strategy for HCMV

Mark R. Walter¹, Meghan K. Eberhardt², Naomi J. Logsdon¹, Christopher E. Allen¹, Peter A. Barry², ¹ Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA, ² Department of Microbiology, Center for Comparative Medicine, University of California Davis, Davis, CA 95616, USA

Many pathogens exploit the signaling pathways mediated by the high affinity IL-10 receptor (IL-10R1) to subvert protective immunity. Pathogens either induce host cellular IL-10 (cIL-10) or a pathogen-encoded IL-10 protein to enable immune privilege, tolerance, and/or immune suppression. HCMV encodes a viral IL-10 (cmvIL-10) that shares 27% sequence identity with cIL-10, yet cmvIL-10 exhibits almost identical functional activities as cIL-10 on lymphoid cells. Based on the in vitro properties of cmvIL-10, it is likely that cmvIL-10 modulates both innate and adaptive immune responses to facilitate dissemination of progeny virions and a long-term infected state within an immune host. To test this hypothesis, a structure-based approach was used to design antigens that effectively block IL-10R1 engagement. The resulting molecules were used to immunize rhesus macaques, uninfected with rhesus CMV (RhCMV), which expresses an ortholog of cmvIL-10, RhcmvIL-10. Immunized animals were subsequently challenged with 1,000 PRU of a strain of RhCMV (UCD59) that is noted for (i) recruitment of polymorphonuclear leukocytes to the subcutaneous site of inoculation, and (ii) sustained shedding of high titers of virus in saliva and urine. Immunized/challenged animals demonstrated prominent reductions in both local and systemic levels of challenge virus replication. Vaccinees were characterized by (i) fewer infected cells and fewer infiltrating PMN at the inoculation site, and (ii) large reductions in both the frequency and magnitude of detectable RhCMV in saliva and urine, compared to mock-immunized control monkeys. These data demonstrate that blocking the viral IL-10 signaling pathway elicits a dramatic level of protective immunity against RhCMV infection, and suggests a novel vaccine strategy against HCMV.

doi:10.1016/j.cyto.2011.07.277