

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

EXPLORATION PATHOLOGIQUE DES SOURIS TRANSGÉNIQUES
PORTEUSES DU GÈNE VPU DE VIH-1

PAR

RAUL CUAUHTÉMOC FAJARDO MUÑOZ

DÉPARTEMENT DE PATHOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

FACULTÉ DE MÉDECINE

THÈSE PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES

EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE

Philosophiæ Doctor (Ph.D.)

EN PATHOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

Mai 2011

©RAUL C. FAJARDO, 2011

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

FACULTÉ DES ÉTUDES SUPÉRIEURES

CETTE THÈSE INTITULÉE :

« EXPLORATION PATHOLOGIQUE DES SOURIS TRANSGÉNIQUES
PORTEUSES DU GÈNE VPU DE VIH-1 »

PRÉSENTÉE PAR :

RAUL CUAUHTÉMOC FAJARDO MUÑOZ

A ÉTÉ ÉVALUÉE PAR UN JURY COMPOSÉ DES PERSONNES
SUIVANTES :

Dr. Louis Gaboury	: Président- rapporteur.
Dr. Allegria Kessous	: Directrice de recherche.
Dr. Jean Michaud	: Co-directeur de recherche.
Dr. Moïse Bendayan	: Membre du jury.
Dr. Bernard Têtu	: Membre du jury externe.
Dr. Ali Ahmad	: Représentant du Doyen de La Faculté des Études Supérieures.

THÈSE ACCEPTÉE LE 17 MAI 2011

Résumé

Mots clés : Souris transgéniques, gène, Vpu, VIH-1, pathologie, lymphome, système immun, glomérulonéphrite mesangioproliférative.

L'infection par le VIH-1, chez les patients, affecte principalement le système immunitaire et conduit à une destruction graduelle des lymphocytes T CD4 et, par conséquent, entraîne un état d'immunodéficience. Cette immunodéficience permet l'établissement d'infections opportunistes qui sont responsables de manifestations cliniques associées au Sida. Ces patients peuvent aussi développer des lymphomes, lésions du système nerveux central et une atteinte rénale. L'ampleur et la sévérité des conditions associées observées chez les patients infectés par le VIH-1 ne peuvent être imputées seulement au processus infectieux et à la déplétion des cellules T CD4⁺. Ceci suggère que les produits des gènes de régulation pourraient avoir des effets cytopathogènes. Cependant, les études sur la physiopathogenèse induite par le VIH ou ses différents gènes ont été difficiles à mener en raison de l'absence d'animaux de laboratoire infectés par ce virus. Ceux-ci auraient pu aider à disséquer le rôle des différents composants du génome viral et les mécanismes pathogénétiques impliqués. Pour pallier cette contrainte, nous avons produit le premier modèle de souris transgéniques pour le gène vpu. Vpu code pour une phosphoprotéine membranaire avec plusieurs fonctions connues. Elle participe au relargage des virions à la surface cellulaire, induit la dégradation des CD4, induit la régulation négative des CMH-1, augmente la susceptibilité à la mort cellulaire des lymphocytes T infectés par le VIH et favorise la réplication virale en empêchant les mécanismes antiviraux cellulaires. Dans ce travail, nous avons caractérisé pathologiquement un modèle de souris transgéniques porteuses du gène vpu du VIH-1. Nos résultats démontrent que l'expression de vpu chez les souris transgéniques induit le développement spontané d'une hyperplasie lymphoïde pansystémique, une splénomégalie avec une hyperplasie lymphoïde folliculaire évoluant en lésions pré malignes et malignes qui présentent certaines similarités avec la maladie de Castleman et une

glomérulonéphrite mesangioproliférative qui rappelle certaines altérations de néphropathie associée au VIH chez les patients infectés.

L'ensemble des altérations démontre que les souris Tg/vpu développent une activation chronique et non spécifique du système immunitaire. Dans cette activation immunitaire, une dérégulation de l'IL-6 et une hyperplasie du réseau de cellules métalophiliques pourraient être impliquées. D'autres résultats obtenus sur les évaluations du fonctionnement du système immunitaire de la rate et du thymus mettent en évidence une susceptibilité augmentée des lymphocytes des tissus lymphoïdes aux effets apoptotiques de la dexaméthasone et des lipopolysaccharides et un retard dans le repeuplement par les cellules d'organes lymphoïdes ainsi qu'une réaction inflammatoire (Schwartzman) exacerbée et des anomalies dans la réaction d'hypersensibilité retardée expérimentale. Ce modèle transgénique reproduit plusieurs anomalies rencontrées chez les patients infectés par le VIH et ouvre de nouvelles hypothèses sur la pathogenèse de l'infection par le VIH.

Abstract

Keywords: transgenic mice, gene, Vpu, HIV-1, pathology, lymphoma, immune system, mesangioproliferative glomerulonephritis.

The HIV-1 infection results in a severe immunodepression due to an increasing depletion of the CD4+T lymphocytes and in a neurodegeneration that leads to a motor/cognitive complex dysfunction. In addition to these pathological alterations, patients with AIDS may also develop additional complications including neoplasms, nephropathy, hematological abnormalities and opportunistic infections. None of these complications can be accounted for solely by the loss of CD4+T lymphocytes and several investigators have started to suspect the regulatory and accessory genes of possibly playing a role in the AIDS pathogenesis. However, studies on the pathological effects contributed by these genes have been hampered by the lack of laboratory animals susceptible to HIV-1 infection. These could have helped to dissect out the role of the different components of the viral genome and their pathogenetic mechanisms. To overcome this obstacle, several investigators have developed transgenic mice carrying either HIV-1 individual genes or partially deleted genome.

The vpu gene, which is unique to HIV-1, encodes a membrane phosphoprotein with several known functions as determined by in vitro studies. It participates in virions release at the cell surface, induces CD4 degradation, MHC-1 downregulation, increases apoptosis susceptibility of infected T cells and promotes viral replication by inhibiting cellular antiviral mechanisms. In order to investigate the contribution of vpu to the complex pathogenesis associated with HIV-1 infection, our laboratory developed a transgenic mouse model carrying vpu under the RSV LTR promoter. Here, we described our results of the clinical and pathological investigation of this unique animal model. Our results demonstrate that the expression of vpu in the transgenic mice induces a pansystemic lymphoid hyperplasia, splenomegaly with follicular lymphoid hyperplasia that progress to premalignant and malignant lesions, with striking characteristics of Castelman like-disease, and a mesangial

hyperplasia variant of HIVAN frequently observed in adult and pediatric AIDS.

All lesions observed in this mouse model suggest that the vpu carrying mice develop a nonspecific chronic activation of the immune system with hyperplasia of perivascular metallophilic cells and deregulation of the IL-6 expression within the hyperplastic follicles.

Following treatment with dexamethazone and LPS, we observed an increased apoptosis susceptibility of the lymphocytes of the spleen and thymus with slow lymphocyte repopulation of these lymphoid organs. In addition, the transgenic mice developed an exacerbated reaction to the induced Schwartzman reaction and demonstrated a more delayed experimental DTH reaction.

Thus, this transgenic model reproduces several abnormalities present in HIV patients. It represents a very interesting and valuable model for studies on the pathology contributed by the vpu gene in the absence of the cumulative effects of the other HIV-1 genes and might help define new possible functions and mechanisms of vpu in the HIV-1 pathogenesis.

Table de matières

	Page
Identification du jury	ii
Résumé	iii
Abstract.....	v
Table de matières.....	vii
Liste de tableaux.....	xi
Liste de figures	xiii
Liste des abréviations	xv
Remerciements	xvii
Dédicace	xix
Introduction.....	1
Chapitre I. Revue de la littérature:.....	4
i Historique du Sida	4
ii Classification du VIH.....	5
iii Structure du génome viral du VIH	8
iv Cycle de réplication du VIH.....	15
v Pathologie.....	25
v.i Physiologie du déficit immunitaire lié au VIH	25
v.ii Physiologie des anomalies hématologiques	32
v.iii Modifications des cytokines au niveau clinique.....	35
v.iv Néphropathie associée au virus de l'immunodéficience humaine (HIVAN).....	37
v.v Pathologie du système nerveux central liée au VIH.....	39
v.vi Pathologies associées:	46
v.vi.i Lymphomes associés au VIH	46

v.vi.ii	Physiopathologie des lymphomes	47
v.vi.iii	Rôle du VIH et des cytokines dans les lymphomes	48
v.vi.iv	Rôle de l'EBV dans les lymphomes	49
v.vi.v	Rôle de c-myc, p53 et bcl-6 dans les lymphomes	50
v.vi.vi	Sarcome de Kaposi.....	53
v.vi.vii	Maladie de Castleman	55
v.vi.vii.i	Pathogenèse de la maladie de Castleman.....	59
vi	Effets des glucocorticoïdes et des LPS sur le fonctionnement du système immunitaire	61
vi.i	Glucocorticoïdes.....	61
vi.ii	Lipopolysaccharides.....	62
vii	Induction des réactions cutanées pour l'évaluation des fonctions du système immunitaire.....	65
vii.i	Réaction de Schwartzman	65
vii.ii	Réaction d'hypersensibilité retardée	66
viii	Modèles animaux de souris transgéniques	68
viii.i	Souris transgéniques pour étudier la pathogenèse du VIH	70
 Chapitre II. Matériel et méthodes.....		74
i	Développement et caractérisation des souris transgéniques vpu.....	74
i.i	Construction des transgènes RV et SV.....	74
i.ii	Développement des souris porteuses des transgènes RV et SV: microinjection et établissement des lignées transgéniques	77
ii	Immunodétection de la protéine Vpu dans les souris transgéniques.....	77
ii.i	Détection de la protéine Vpu par immunohistochimie.....	78
ii.ii	Détection de la protéine Vpu par immunobuvardage.....	80
iii	Étude histopathologique des souris transgéniques	82

iii.i	Nécropsie et prélèvement des tissus pour l’histopathologie et pour l’immunohistochimie	82
iii.ii	Analyse histopathologique des souris transgéniques	83
iii.iii	Analyse histopathologique en fonction de l’âge	84
iii.iv	Caractérisation des lymphoproliférations spléniques.....	84
iv	Détection d’interleukine 6 (IL-6) par immunohistochimie	85
v	Essais d’exploration <i>in vivo</i> de la fonction immunitaire	86
v.i	Effets de la DEX sur la population lymphocytaire du thymus, de la rate et du sang chez les souris Tg (RV-105 et RV-106) et Ntg	88
v.ii	Réponse à la stimulation par les Lipopolysaccharides	90
v.iii	Analyse immunohistochimique de populations leucocytaires de la rate des souris traitées aux LPS	91
vi	Induction de la réaction d’hypersensibilité retardée (DTH).....	92
Chapitre III. Résultats.....		94
i	Développement des lignées de souris porteuses du transgène Vpu: Expression du transgène et établissement de la colonie transgénique	94
ii	Immunodétection de la protéine Vpu	97
iii	Évaluation clinique, anatomopathologique et histopathologique.....	98
iii.i	Exploration histopathologiques chez des souris porteuses du vpu.....	99
iii.ii	Analyse de la lymphoprolifération folliculaire de la rate.....	111
iii.iii	Immunodétection de l’IL-6 dans la rate et dans les reins de souris Tg atteintes de lymphoprolifération splénique	128
iv	État de la fonction du système immunitaire: réactions <i>in vivo</i> à la DEX et des LPS	131
iv.i	Traitement avec la dexaméthasone.....	131
iv.i.i	Leucogrammes des sourisTg et Ntg avant tout traitement	131

iv.i.ii Effets du traitement à la DEX	136
iv.ii Traitement avec les LPS	144
v Résultats de l'induction de l'hypersensibilité de type retardée avec l'albumine bovine sérique (ABS)	184
v.i Mesures de la tuméfaction des pattes de souris Tg et Ntg	185
v.ii Histopathologie de la réaction d'hypersensibilité retardée dans les coussinets plantaires	188
v.iii. Histopathologie de la rate et du thymus dans la réaction d'hypersensibilité retardée (DTH)	189
Chapitre IV. Discussion	193
Chapitre V. Conclusions	220
Chapitre VI. Bibliographie	222

Liste des tableaux

	<u>Page</u>
I. Tests sérologiques de contrôle sanitaire chez les souris Tg et Ntg	96
II. Étude histopathologique morphométrique.....	101
III. Fréquences des altérations histopathologiques chez les souris Tg-vpu et Ntg tous âges confondus	110
IV. Fréquence et distribution des lymphoproliférations folliculaires spléniques par groupe d'âge et par lignée	113
V. Classification histopathologique, distribution et fréquence des lymphoproliférations spléniques par groupe d'âge des souris RV-105, RV-106 et Ntg.....	121
VIa. Décomptes des leucocytes sanguins chez les souris Tg RV-105 et RV-106 et Ntg non traitées	134
VIb. Valeurs de leucocytes sanguins chez les souris âgées de six mois Tg et Ntg intactes.....	135
VII. Valeurs de leucocytes sanguins après le traitement avec dexaméthasone	137
VIII. Histopathologie de la rate et du thymus après le traitement avec dexaméthasone.....	141

IX. Valeurs de leucocytes sanguins après le traitement avec LPS; cinétique dans le temps.....	154
X. Cinétique histopathologique de la rate après le traitement avec lipopolysaccharides	158
XI. Cinétique histopathologique du thymus après le traitement avec lipopolysaccharides	166
XII. Fréquence et intensité de la réaction cutanée de Schwartzman dans la cinétique avec lipopolysaccharides	181
XIII. Sévérité de la réaction cutanée d'hypersensibilité retardée induite par l'immunisation avec l'ABS	187

Liste des figures

	<u>Page</u>
Fig. 1. Structure du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1)	13-4
Fig. 2. Représentations schématiques de la construction des transgènes RV et SV	75-6
Fig. 3 Splénomégalie	102-3
Fig. 4. Altérations histopathologiques	107-8
Fig. 5. Atrophie sénile	114-5
Fig. 6. Hyperplasie lymphoïde splénique.....	118-9
Fig. 7. Hyperplasie lymphomateuse (Castleman-like)	122-3
Fig. 8. Caractéristiques histopathologiques des lymphoproliférations spléniques chez trois souris Tg	126-7
Fig. 9. Immunodétection de IL-6 chez des souris avec hyperplasie lymphoïde et lymphome splénique	129-0
Fig. 10. Effets du traitement avec la dexaméthasone dans la rate et thymus de souris Ntg et Tg.....	142-3
Fig. 11. Cinétique dans le temps de leucocytes, lymphocytes et le pourcentage lymphocytaire après le traitement avec LPS	153
Fig. 12.1. Rates de souris Ntg et Tg traitées aux LPS, vingt-sept	

heures après le traitement	159-0
Fig. 12.2. Rates de souris Ntg et Tg traitées aux LPS, quarante-huit heures après le traitement	161-2
Fig. 12.3. Rates de souris Ntg et Tg traitées aux LPS, soixante-douze heures après le traitement	163-4
Fig. 12.4. Thymus de souris Ntg et Tg traitées aux LPS, vingt-sept heures après le traitement	167-8
Fig. 12.5.1. Immunodétection de B220 dans des rates de souris Ntg et Tg intactes et traitées aux LPS, soixante-douze heures après le traitement	171-2
Fig. 12.5.2. Immunodétection de Mac-3 dans des rates de souris Ntg et Tg intactes et traitées aux LPS, soixante-douze heures après le traitement	173-4
Fig. 12.5.3. Immunodétection de CD4 dans des rates de souris Ntg et Tg intactes et traitées aux LPS, soixante-douze heures après le traitement	175-6
Fig. 12.5.4. Immunodétection de CD8 dans des rates de souris Ntg et Tg intactes et traitées aux LPS, soixante-douze heures après le traitement	177-8
Fig. 12.6. Apparence macroscopique et histopathologique de la réaction de Schwartzman de la peau de souris Tg traitée aux LPS	182-183
Fig. 13. Réaction d'hypersensibilité retardée.....	191-2

Liste des abréviations

ABS	Albumine bovine sérique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
SNC	Système nerveux central
DEX	Dexaméthasone
DTH	Delayed type hypersensitivity
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Env	Enveloppe (gène ou protéine de)
Gag	Group-specific antigen
GFAP	Glial fibrillar acid protein
Gp-120	Glycoprotein 120
HPS	Hématoxyline-Phloxine-Safran
IL	Interleukine
IP	Intrapéritonéale
INF	Interféron
LPS	Lipopolysaccharides
LTR	Long terminal repeat (répétition terminale longue)
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
Nef	Negative factor
NF-h	Neurofilaments heavy
NSE	Neuron specific enolase
Ntg	Non transgénique
PAS	Periodic acid fast Schiff
PBS	Phosphate buffer solution (Tampon phosphate salin)
PI	post inoculation
Pol	Polymerase
Tg	Transgénique
TNF	Tumor necrosis factor

Vif	Viral infectivity factor
VMP	Vert de Méthyl Pyronine (coloration)
Vpr	Viral protein R
Vpu	Viral protein U

Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement:

Les docteurs Allegria Kessous directrice de mon projet de recherche et le docteur Jean Michaud, codirecteur de mes travaux de recherche. Qui tous les deux m'ont donné l'opportunité d'approfondir dans les disciplines de l'immunopathologie et de la neuropathologie.

Le Dr Moïse Bendayen pour ses conseils et pour m'avoir permis de mettre au point mes techniques d'immunohistochimie dans son laboratoire.

Le Dr Réal Lallier, directeur du groupe de recherche et vice-doyen de la recherche, pour son engagement et son appui.

Monsieur Denis Rodrigue technicien du laboratoire d'histochimie du Département de Pathologie et Biologie cellulaire, pour sa grande disponibilité à participer dans les travaux de recherche et à partager son inestimable expérience tout avec une grande simplicité.

Madame Andrée Demontigny technicienne au laboratoire d'immunohistochimie et histochimie du Département de pathologie de L'hôpital St Justine, pour partager sa grande expérience et sa grande disponibilité.

Christian Lemaire, expert en biologie moléculaire, pour les conseils, les encouragements et pour son amitié.

Gaétan Meyer, expert en immunohistochimie, pour son engagement, conseils, pour son intérêt à collaborer et à partager son expérience dans ce domaine.

À tout le personnel du Département de Pathologie et Biologie Cellulaire:
qui a participé de proche ou de loin à ce travail de recherche, entre eux, Françoise Sakr, Annie, Claudette, Patricia Ciesla, Denis Rodrigue, Inma Selles, Amhad pour leur disponibilité et l'échange d'information technique et scientifique.

Aux membres du "Consejo de Gobierno" de la Facultad de Medicina veterinaria de l'UAEM, spécialement les docteurs Eduardo Gomez, Eduardo Gasca, Francisco Olgín et Ignacio Dominguez pour m'avoir appuyé à réaliser mes études doctorales au Québec, Canada. À l'Universidad Autónoma del Estado de México, à l'ACDI et le CONACyT, pour leur appui financier partiel.

Aux tous mes chers amis: Cornelius Bulik, Patricia Ciesla, Jean-Jaques Diagou, Olivier Giorgi, Johanne Joncas, Philippe Laboisier, Gaston Lambert, Anne Lanevsky, Amhad, Carlos Lopez, Denis Rodrigue, Inma Selles, Joanne Smith, Lucille Tremblay, Monique, Stephan et Aidé pour les encouragements et principalement pour leur amitié.

Mes remerciements vont de plus à tous les membres de ma famille, spécialement à Ruben, Flor, Araceli, Rodolfo, Ricardo, Guillermo, Danielle et surtout ma chère mère Florita, pour tous les encouragements, le soutien moral et les preuves d'amour.

Merci à tous

Dedicace

Cuando la tierra es dura y el surco se agranda, se siembra la semilla de la esperanza,
que se siembra con el alma.

Así es la vida misma que tiene la semejanza.

Así es mi tierra, tierra de libertad...

Florita Muñoz Pardo

Introduction

L'infection par le VIH-1, chez les patients, détériore principalement le système immunitaire par une destruction graduelle des lymphocytes T CD4 et, l'état d'immunodéficience qu'il entraîne (Sida) (Monroe, J. G. *et al.*, 1995). Cette immunodéficience permet l'émergence d'une grande variété d'infections opportunistes qui sont responsables de plusieurs des manifestations cliniques associées au Sida (Monroe, J. G. *et al.*, 1995). Parmi ces infections opportunistes, nous pouvons citer : les infections bactériennes (*M. avium*), parasitaires (*P. carinii*), mycosiques (*C. neoformans* et *H. capsulatum*) et virales (herpèsvirus, cytomégalovirus, les virus de l'hépatite : VHB, VHC et VHD) (Buffet, C., *et al.*, 1988; Bonancini, M. *et al.*, 1990; Radin, D. R. *et al.*, 1990; Bonancini, M., 1992; Zylberberg, H. *et al.*, 1996a; Zylberberg, H. *et al.*, 1996b). Parmi les infections virales, l'infection par le virus KSHV (herpesvirus-8) est associée au sarcome de Kaposi (Lévy, Y. *et al.*, 1996; Staskus, K.A. *et al.*, 1999). L'infection par le virus EBV est associée, dans 30 à 40 % des cas, aux lymphomes à cellules B chez les sidéens (Subar, M. *et al.*, 1988; Monroe, J. G. *et al.*, 1995). Les patients sidéens développent des lymphomes avec une fréquence de 10 à 15 % (Oksendhendler, E. *et al.*, 1996).

Après la détérioration du système immunitaire par le VIH, le système nerveux central constitue la deuxième cible (Gray, F. *et al.*, 1996). Les études neuropathologiques ont démontré que dans 80 à 100 % des cas, les patients infectés au VIH présentent des lésions du système nerveux central (Gray, F., *et al.*, 1991; Gray, F. *et al.*, 1996). Les altérations retrouvées chez les souris Tg-vpu dans le système nerveux ne sont pas significatives et sont associées au vieillissement naturel des souris. Les lésions associées à l'infection productive sont : l'encéphalomyélite, la myélite et la leucoencéphalopathie du VIH. Quant aux lésions résultantes de l'infection non productive, elles concernent : la poliomyélite diffuse, la myélopathie vacuolaire et la leucoencéphalopathie vacuolaire (Gray, F. *et al.*, 1996). Les mécanismes étiopathologiques responsables de ces lésions sont des mécanismes indirects mis en jeu par les réponses immunologiques de l'hôte, tel que la production de cytokines

(Lazarini, F. *et al.*, 1997; Seilhean, D. *et al.*, 1998) et ces lésions surviennent généralement au stade évolué du Sida ou, dans certains cas, au stade précoce (Gray, F. *et al.*, 1996). Des études épidémiologiques ont montré, chez les patients sidéens, une plus forte fréquence d'atteinte rénale liée à l'infection par le VIH-1 (HIVAN). Environ 10 % des patients adultes et jusqu'à 14 % des cas pédiatriques vont démontrer des anomalies fonctionnelles rénales allant de la protéinurie à l'insuffisance rénale terminale (Bourgoignie, J. J. *et al.*, 1989; Simon, D. B. *et al.*, 1996; Bruggeman, L. A. *et al.*, 1997). Cette incidence augmenterait à 20-30 % en tenant compte uniquement des lésions morphologiques (O'Regan, S. *et al.*, 1990; Bourgoignie, J. J., 1990; Rao, T. K., 1993; Kimmel, P. L. *et al.*, 1993; Humphreys, M. H., 1995). L'ampleur et la sévérité des conditions associées observées chez les patients infectés par le VIH-1 ne peuvent être imputées seulement au processus infectieux et à la déplétion des cellules cibles T CD4⁺. Ceci suggère que les produits des gènes de régulation pouvaient exercer des effets cytopathogènes. Cependant, les études sur la physiopathogenèse induite par le VIH ou ses différents gènes ont été difficiles à mener en raison de l'absence d'animaux de laboratoire infectables par ce virus. Ceux-ci auraient pu aider à disséquer le rôle des différents composants du génome viral et les mécanismes pathogénétiques impliqués. Pour pallier cette contrainte, nous avons produit le premier modèle de souris transgéniques pour le gène vpu. Ces souris transgéniques vpu développent, en absence de tout processus infectieux, de l'hyperplasie lymphoïde splénique évoluant en lymphome-B tardif, tout à fait similaire aux lymphoproliférations observées chez les patients sidéens et une glomérulonéphrite mésangioproliférative. Le but de ce travail de recherche est de caractériser et d'étudier la pathogenèse de lésions chez le modèle de souris transgénique RSV/vpu. Dans ce modèle, nous avons caractérisé les lésions dans tous les organes, déterminé la fréquence et l'âge auxquels elles se développent et exploré la pathogenèse des lésions. De plus, nous avons examiné la fonction du système immunitaire en évaluant la réaction tissulaire, la susceptibilité à la mort cellulaire des lymphocytes circulants, du thymus et de la rate et la réaction cutanée de Schwartzman chez des souris soumises à des injections de dexaméthasone et des

lipopolysaccharides (LPS). Finalement, nous avons évalué la fonction des leucocytes en provoquant une réaction d'hypersensibilité retardée.

Chez les souris transgéniques, les altérations anatomopathologiques, histopathologiques et sanguines démontrent que ces animaux développent une activation chronique et non spécifique du système immunitaire. Lors de cette activation immunitaire, une dérégulation de l'IL-6 et une hyperplasie du réseau de cellules métallophiliques (dendritiques/macrophagiques) pourraient être impliquées.

Les résultats de l'étude du fonctionnement du système immunitaire chez ces souris transgéniques mettent en évidence une susceptibilité augmentée des lymphocytes des tissus lymphoïdes aux effets apoptotiques de la dexaméthasone et des lipopolysaccharides, une anomalie et un retard dans le repeuplement par les cellules lymphoïdes de la rate et du thymus ainsi qu'une réaction inflammatoire (Schwartzman) exacerbée et des anomalies dans la réaction d'hypersensibilité retardée induite expérimentalement.

Ce modèle de souris transgéniques reproduit des altérations semblables à celles retrouvées chez les patients infectés par le VIH-1, ce qui rend ces modèles très prometteurs pour la recherche sur la pathogenèse de l'infection par le VIH.

I. Revue de la littérature

I.i. Historique du Sida

Le syndrome d'immunodéficience acquise (Sida) a été décelé en 1981 dans trois hôpitaux de Los Angeles aux Etats-Unis, chez cinq jeunes homosexuels (jusqu'à en bonne santé) présentant des cas rares de pneumonie causée par un protozoaire nommé *Pneumocystis carinii* (Greenspan, D. *et al.*, 1987a). Quelque temps plus tard, le Centre pour le Contrôle des Maladies des Etats-Unis rapportait une augmentation du nombre de cas de sarcomes de Kaposi chez de jeunes hommes à New York et en Californie (Greenspan, D. *et al.*, 1987a). Dans la même année (1981), vingt-six cas de sarcomes de Kaposi sont recensés, tous présents chez des jeunes homosexuels. Sept d'entre eux présentent d'autres signes d'infections graves et quatre patients sont atteints de pneumonie causée par *Pneumocystis carinii* (Peterman, T. A. *et al.*, 1985; Greenspan, D. *et al.*, 1987a). Ces pneumocystoses sont davantage observées dans des syndromes comportant des déficits immunitaires, des lymphomes, des transplantations d'organes et des traitements aux immunosuppresseurs et surviennent surtout chez les sujets homosexuels de sexe masculin indemnes de tout antécédent pathologique (Verhasselt, V., Vildé, J. L., 1991). L'identification des homosexuels comme sujets à haut risque et la preuve de propagation du Sida par un agent transmissible orientent la recherche de l'agent étiologique parmi les virus communément rencontrés chez les homosexuels (le virus de l'hépatite B, le virus Epstein-Barr et le cytomégalovirus) (Greenspan, D. *et al.*, 1987b). Les virus immunosuppresseurs, tels le virus de la leucémie féline chez les chats et le virus Visna chez le mouton, orientent les recherches vers la famille de rétrovirus comme agents possibles du Sida (Greenspan, D. *et al.*, 1987b). Différents groupes de chercheurs isolent ensuite un rétrovirus T-lymphotrope que l'on reconnaît aujourd'hui être l'agent causal du Sida (Greenspan, D. *et al.*, 1987b). À l'Institut Pasteur de Paris, le virus a été isolé à partir d'un ganglion superficiel d'un patient et est appelé "virus associé à une lymphadénopathie" (LAV) par Barré-Sinoussi, F. *et*

al. (1983) et nommé rétrovirus associé au Sida (ARV) par Lévy, F. A. *et al.* (1984). Plus tard, des variantes génétiques semblables au virus HTLV-III/LAV seront isolées chez des patients Africains et appelées HTLV-IV et LAV-2 (Clavel, F. *et al.*, 1986a; Kanki, P. J. *et al.*, 1986). Dorénavant, nous désignerons ces virus par le terme de “HIV” en accord avec les recommandations du Comité International (Coffin, J. *et al.*, 1986; Greenspan, D. *et al.*, 1987b et Giuseppe, F., 1990).

I.ii. Classification du VIH

Le virus de l’immunodéficience humaine (VIH) est un virus à ARN de la famille des Lentivirus (Hubert, P. *et al.*, 1996).

Contrairement à certains virus causant des infections aiguës sur de courtes périodes et dont les manifestations cliniques (inflammation et destruction tissulaire) disparaissent suite à l’élimination de l’agent pathogène en cause, le VIH se présente comme un virus à infection lente, caractérisée par une longue période d’incubation asymptomatique (sans destruction tissulaire) précédant les manifestations cliniques de la maladie (Sonigo, P., 1996; Barré-Sinoussi, F., 2003). De ce fait, il se classe dans la famille des lentivirus.

Deux grands groupes de virus VIH sont présentement connus. Il s’agit des virus “VIH-1” et “VIH-2”. Ce dernier, bien que moins pathogène, se distingue par sa longue période de latence et par une enveloppe dont les constituants antigéniques sont distincts de ceux du “VIH-1” (Sonigo, P., 1996 ; Van Heuverswyn, F. *et al.*, 2006), malgré un fort pourcentage d’homologie (40%) entre les deux gènes de l’enveloppe (Clavel, F. *et al.*, 1986b).

Les virus VIH-1 et VIH 2 présentent une homologie de séquences nucléotidiques d’environ 50% sur l’ensemble de leurs génomes dont la structure est très similaire. Cependant, le gène *vpx* se retrouve chez le VIH-2 alors que le gène *vpu* chez le VIH-1 (Guyader, M. *et al.*, 1987; Shim, M. F. *et al.*, 1999).

Les études de caractérisation du VIH 1 ont permis de reconnaître plusieurs groupes qui forment la famille VIH. Le groupe M (Majeur), le groupe O (Outlier) et le groupe N (non M et non O) de VIH-1 sont des groupes de caractérisation récente, principalement isolés de patients originaires du Cameroun ou du Gabon (Vanden Haesevelde, M. *et al.*, 1994; Gürtler, L. G. *et al.*, 1994 ; Simon, F. *et al.*, 1994; Korber, B. T. M. *et al.*, 1995; Loussert-Ajaka, I. *et al.*, 1995). L'homologie entre les glycoprotéines de l'enveloppe de groupes O et M est de 50%. Les anticorps anti-VIH-1 du groupe O réagissent peu ou pas avec la gp120 et faiblement avec la gp41 du groupe M (Simon, F. *et al.*, 1994). Bien que les souches liées à des groupes M et N aient été trouvées dans les chimpanzés, les données les plus récentes indiquent que le groupe O du VIH-1 pourrait provenir de gorilles (Van Heuverswyn, F. *et al.*, 2006).

Le groupe M du VIH-1 comporte plusieurs sous-types (A, B, C, D, E, F, G, H, J et K) dont certaines de leurs séquences nucléotidiques diffèrent entre elles à 30%, particulièrement au niveau de la boucle V3 du gène env (Korber, B. T. M. *et al.*, 1995; Brun-Vézinet, F. *et al.*, 1996). En plus, il y a 19 formes recombinantes du VIH-1 dénommées formes recombinantes circulantes (CRF) qui sont distribuées par régions dans le monde (Casado, G. *et al.*, 2005; Kiwelu, I. E. *et al.*, 2005; Thomson M. M. *et al.*, 2005).

Les VIH-2 se classifient également en plusieurs sous-types A, B, C, D, E et F dont les différences au niveau de la séquence nucléotidique peuvent atteindre jusqu'à 25%, particulièrement au niveau du gène gag (Gao, F. *et al.*, 1994; Schim, M. F. *et al.*, 1999). De plus, parmi les sous types reconnus, seuls les sous types A et B sont pathogènes.

Un autre critère de la classification des VIHs repose sur la capacité de leurs souches virales à utiliser soit les co-récepteurs chimiokine-CXC, soit les co-récepteurs chimiokine-CC afin d'infecter leurs cellules hôtes, ce qui les divise en 2 groupes: les virus macrophage-trophiques et les virus T-trophiques. Les souches virales macrophage-trophiques vont infecter les macrophages et les cellules T portant les récepteurs CCR5. Quant aux virus T-trophiques (sous-type B), ils vont infecter les

cellules T et T primaires porteuses du récepteur CXCR4. De plus, on a identifié d'autres souches du VIH (sous-type D), dites "bi-trophiques" qui, elles, ont la capacité d'infecter leurs cibles en se liant à la fois aux co-récepteurs CCR5, CXCR4 et aux co-récepteurs CCR3 et CCR2b (Champagne, P. *et al.*, 1998; Naderi, H. R. *et al.*, 2006). Par ailleurs, les co-récepteurs CCR3 et CCR5 exprimés par les cellules microgliales du système nerveux central constituent aussi une voie d'infection par le VIH-1 (He, J. L. *et al.*, 1996; Champagne, P. *et al.*, 1998).

Du point de vue de l'épidémiologie, le VIH-1 est mondialement répandu. Il touche les individus de 20 à 34 ans et de 15-20 ans pour les femmes. Il se transmet par voie homo- ou hétérosexuelle, par transfusion sanguine, par l'utilisation de seringues infectées ou par transmission mère-enfant dans 20 à 25% des cas n'ayant reçu aucun traitement. Sa prévalence est en augmentation à travers le monde. Le VIH-1 est le virus avec le plus haut taux de mortalité (Schim, M. F. *et al.*, 1999; Mandelbrot, L. *et al.*, 2007).

Quant au VIH-2, il est fréquent en Afrique occidentale, au Portugal et en Inde. Il touche les individus de 45 à 55 ans. Ses voies de transmission sont identiques à celles du VIH-1 avec une contamination mère-enfant de 1 à 4% de cas n'ayant reçu aucun traitement. Sa prévalence est stable à travers le monde, aussi bien dans les zones urbaines que rurales. Il cause moins de mortalité par rapport au VIH-1 (Schim, M. F. *et al.*, 1999; Van Heuverswyn, F. *et al.*, 2006). La différence épidémiologique entre les VIH-1 et le VIH-2, est due au fait que le VIH-1 est plus pathogénique (Schim, M. F. *et al.*, 1999; Mandelbrot, L. *et al.*, 2007).

En 2008, l'UNAIDS dans un rapport sur l'épidémie mondial démontre que le VIH touche des personnes de tous âges et issues des milieux les plus divers.

Dans les pays du sud de l'Afrique subsaharienne, le VIH affecte la population générale, alors que dans d'autres régions du monde, il touche principalement les hommes ayant des rapports homosexuels non protégés, les consommateurs de

drogues injectables, et les personnes qui achètent et vendent des rapports sexuels ainsi que leur(s) partenaire(s) sexuel(s). Un peu moins de 3 millions (2,7 millions) de personnes ont été nouvellement infectées par le VIH, et on a enregistré 2 millions de décès dus au sida.

I.iii. Structure du génome viral du VIH

La structure du génome du VIH est constituée de deux copies d'ARN simple brin. Grâce à l'enzyme transcriptase inverse, le génome viral fait d'ARN, est rétro-transcrit en ADN proviral double brin avant son intégration au génome cellulaire. La taille approximative de l'ADN proviral est de 9 à 10 Kilobases et celui-ci est constitué d'une région codante flanquée en ses deux extrémités 5' et 3' de séquences répétées dites "LTR" (Long Terminal Repeat). La séquence LTR en 5' exerce un rôle de promoteur, alors que le LTR en 3' intervient dans la terminaison efficace de la transcription. Chacune des séquences terminales LTR est constituée de trois unités nommées: "U-3", "R" et "U-5". La région U-3 de LTR-5' contient des zones promotrices de la rétrotranscription (ressemblant à la boîte TATA chez les eucaryotes) et la région U5 contient des sites de liaison pour des facteurs de régulation de la transcription, AP-1, NFAT, COUP, USF-1, NF-κB, Sp-1 (Jones, K. A., 1989; Rothe, M. *et al.*, 1996; Krebs, F. C. *et al.*, 2001). La séquence R du LTR 5' comporte également une zone régulatrice baptisée "TAR" (Tat Responsive Element) fixant la protéine virale (Tat) nécessaire à la transcription des ARNs messagers viraux. Le LTR 3' renferme au niveau de sa région R un site de polyadénylation et un autre site de déclenchement de la transcription. Chacun des LTRs 5' et 3', comporte des régions nécessaires à l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN cellulaire (Rothe, M. *et al.*, 1996; Krebs, F. C. *et al.*, 2001).

La région codante du génome du VIH-1 comporte d'une part les gènes gag, pol, et env qui codent pour des protéines structurales et, d'autre part, des gènes (tat, rev, nef, vif, vpr et vpu) du VIH-1 exprimant des protéines de régulation (Rothe, M. *et al.*,

1996). Le gène gag code pour les précurseurs Pr55gag et Pr160gag-pol. Ces deux précurseurs sont traduits à partir de l'ARN génomique. Le précurseur Pr160gag-pol résulte d'un changement de cadre de lecture en amont du cadre encodant la protéine p6. Le clivage de Pr55gag par la protéase virale produit la protéine de la matrice (p17) qui tapisse le côté interne de l'enveloppe, la protéine de la capsid (p24) associée à la matrice et la protéine de la nucléocapsid (p7/p6) étroitement liée à l'ARN génomique et qui serait responsable de la dimérisation du génome (Surovoy, A. *et al.*, 1992). Le clivage du précurseur Pr160gag-pol donne naissance aux protéines de la transcriptase inverse (p66/p55), la protéase virale (p10) nécessaire pour la maturation des protéines Gag et Gag-Pol et l'intégrase (p32) qui intervient lors de l'intégration du génome proviral. Quant au gène env, il code pour la glycoprotéine gp160 produite à partir d'un messenger monoépissé; ce précurseur donne par clivage protéolytique les glycoprotéines de l'enveloppe virale, gp120 et gp41, qui sont essentielles pour l'attachement du virus au récepteur CD4, permettant l'entrée du virus VIH dans la cellule cible et qui aident à diriger l'assemblage des virions à la surface cellulaire (Rothe, M. *et al.*, 1996; Wyma, D. J. *et al.*, 2000).

Le génome de VIH-1 code aussi pour six protéines de faible poids moléculaire (tat, rev, nef, vpr, vpu et vif) qui ont toutes des fonctions régulant soit l'expression de gènes viraux soit la réplication virale (Seelamgary, A. *et al.*, 2004). Le gène tat code pour une protéine transactivatrice du promoteur LTR du virus HIV-1 (Cullen, B. R., 1994; Rothe, M. *et al.*, 1996). Sa liaison à la séquence TAR déclenche la transcription des ARNs viraux.

Tat affecte également plusieurs fonctions cellulaires en induisant l'angiogénèse (Mítola, S. *et al.*, 2000 ; Benelli, R. *et al.*, 2000), la prolifération et l'apoptose des cellules (Barillari, G. et Ensoli, B., 2002; Strebel, K., 2003). De plus, Tat régule l'expression des gènes de cytokines donc régule l'activation de cellules immunitaires (Barillari, G. et Ensoli, B., 2002; Contreras, X. *et al.*, 2005). Elle peut être sécrétée par les cellules infectées par le VIH-1, et donc, agir sur les cellules voisines (Vendeville, A. *et al.*, 2004). En outre, Tat affecte la mitose et induit des altérations chromosomiques (aneuploïdies) en interagissant avec la tubuline du fuseau (Chen, D. *et al.*, 2002; Battaglia, P. A. *et al.*, 2005).

Le gène *rev* exprime une protéine dont le rôle est de contrôler l'épissage des ARNs viraux. Par sa liaison au site RRE (*rev* responsive element) *rev* inhibe l'épissage et le transport des ARNs viraux du noyau vers le cytoplasme (Cullen, B. R., 1994; Rothe, M. *et al.*, 1996).

La protéine Nef (*negative expression factor*), encodée par le gène *nef* est une protéine multi-fonctionnelle non essentielle pour la réplication: elle stimule le transport endosomique des CD4 et leur dégradation par les lysosomes et serait impliquée également, avec la protéine β -COP, dans le transport des vésicules ou des endosomes cellulaires (Lodge, R. E. *et al.*, 1996). Selon plusieurs travaux, Nef serait une protéine utile à l'infection productive (Littman, D. R., 1994; Miller, M. D. *et al.*, 1994; Rothe, M. *et al.*, 1996). Cette protéine intervient également dans la régulation négative de l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe 1 (CMH-1) (Schwartz, O. *et al.*, 1996; Collins, K. L. *et al.*, 1998; Strebel, K., Bour, S., 1999). En se liant à la tyrosine 320 des HLA-A et HLA-B, Nef induit la régulation négative des HLA (Le Gall, S. *et al.*, 1998; Greenberg, M. E. *et al.*, 1998; Strebel, K., Bour, S., 1999). La mutation fonctionnelle d'une cystéine réprime la régulation négative habituellement exercée par la protéine Nef sur les HLA (Le Gall, S. *et al.*, 1998; Strebel, K., Bour, S., 1999). Également, l'effet de la protéine Nef sur les CMH-1 consisterait à protéger les cellules infectées par le VIH contre la lyse cellulaire engagée par les lymphocytes T cytotoxiques (Le Gall, S. *et al.*, 1997; Collins, K. L. *et al.*, 1998; Strebel, K., Bour, S., 1999). En outre, Nef a été associée aux dommages des podocytes glomérulaires et au développement de la glomérulosclérose chez des souris transgéniques (Zuo, Y. *et al.*, 2006).

Les gènes *vif*, *vpr* et *vpu* sont aussi non essentiels pour la réplication virale (Subbramiam, R. A., Cohen, E. A., 1994; Rothe, M. *et al.*, 1996) mais les protéines codées par ces gènes favorisent la réplication virale en empêchant les mécanismes initiaux antiviraux intracellulaires en dégradant les protéines IRF-3 et l'APOBEC3G dans le protéasome par la voie de l'ubiquitine tel que rapporté pour Vif et Vpr (Culling, B. R., 2006; Okumura, A. *et al.*, 2008). La protéine Vif (*virus infectivity factor*) interviendrait dans l'augmentation du pouvoir infectieux du virus, dans l'assemblage de la capsid et également dans la synthèse de l'ADN proviral; la

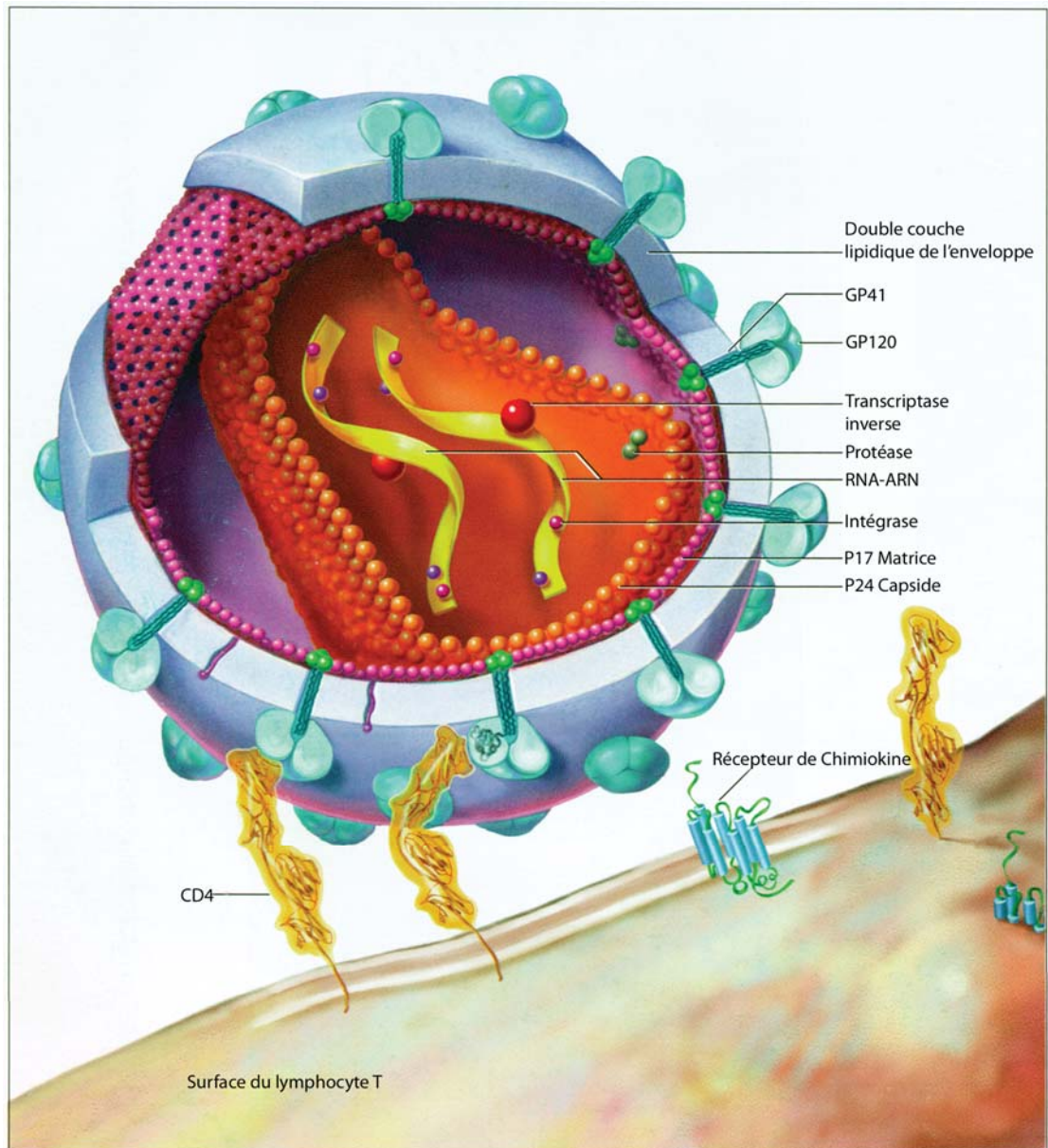
protéine Vpr (viral protein R) serait impliquée aussi bien dans la réplication du VIH dans les monocytes-macrophages que dans le transport de l'ADN proviral vers le noyau, en association avec la protéine de la matrice (p17). Vpr a aussi été associée aux dommages des podocytes glomérulaires et au développement de la glomérulosclérose (Zuo, Y. *et al.*, 2006).

Quant à la protéine Vpu (Viral protein U), c'est une protéine phosphorylée à localisation variable dépendamment du sous-type de VIH-1; cette localisation est cytoplasmique pour le sous-type C et dans le complexe de Golgi pour le sous-type B (Pancyniak, E. *et al.*, 2005). Elle est exprimée par le VIH-1 et par plusieurs virus de l'immunodéficience simienne (SIV), y compris SIVcpz, SIVgsn, SIVmus, et SIVmon, mais pas exprimée par le VIH-2 ou d'autres SIVs (Dazza, M. C. *et al.*, 2005); elle exercerait un rôle dans le relargage des virions de la cellule hôte infectée et interviendrait également dans la dégradation des récepteurs CD4 dans le réticulum endoplasmique (Subbramamian, R. A., Cohen, E. A., 1994; Rothe, M. *et al.*, 1996). Vpu interfère dans les premières étapes de la biogenèse des CMH classe 1 en diminuant leur expression à la surface des cellules infectées par le VIH-1 (Kerkau, Th. *et al.*, 1997). Vpu aussi induit l'apoptose cellulaire par activation des caspases, en inhibant l'expression des gènes antiapoptotiques dépendants du NFκ-B (Akari, H. *et al.*, 2001) et favorise la réplication virale en empêchant les mécanismes antiviraux cellulaires; la tetherin est une protéine cellulaire antivirale induite par l'IFN qui bloque la libération des rétrovirus naissants et des particules d'autres virus de cellules infectées. La protéine Vpu agit comme un antagoniste des variantes de la tetherin trouvées chez l'homme et chez des chimpanzés (Neil, S. J. *et al.*, 2007; Neil, S. J. *et al.*, 2008; Van Damme, N. *et al.*, 2008; McNatt, M. W. *et al.*, 2009).

L'organisation génomique du VIH-2 est très semblable à celle du VIH-1, la différence majeure étant que VIH-2 n'a pas le gène vpu; à sa place il a le gène vpx. Le gène gag du VIH-2 code pour le précurseur p56-gag, dont le clivage protéolytique produit les protéines de la capsid (p26), de la matrice (p16) et de la nucléocapsid (p12) (Brun-Vézinet, F. *et al.*, 1996).

Le gène pol du VIH-2 code pour la transcriptase inverse (p66/p53) et l'intégrase (p36) (Brun-Vézinet, F. *et al.*, 1996). Enfin, le gène env du VIH-1 code pour la glycoprotéine gp160, précurseur de gp120 et gp41 alors que le gène env du VIH-2 code pour la gp300, précurseur de gp140, gp125, gp80 et gp36. La glycoprotéine gp300 du VIH-2 est un dimère du précurseur (gp140). La gp140 est le précurseur de la gp125 de l'enveloppe externe et gp80 qui est un dimère de la gp36 transmembranaire (Brun-Vézinet, F. *et al.*, 1996). Les protéines de l'enveloppe des VIH-1 et VIH-2 sont antigéniquement différentes (Sonigo, P., 1996). Les autres cadres de lecture présents dans le génome du VIH 2 sont tat, rev, nef, vpr, vpx et vif.

Fig. 1. Structure du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1). Virion en face d'un lymphocyte T. Le VIH-1 est constitué de deux brins d'ARN (génomme viral) auxquels sont associées la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase. Tous sont contenus à l'intérieur de la capsid virale (p24), qui est enveloppée par la protéine de la matrice (p17). L'enveloppe, formée d'une double couche lipidique contenant les protéines membranaires la gp41 et la gp120 recouvre le tout. Le CD4 et les récepteurs de chimiokines sur la surface de la cellule T fonctionnent comme récepteurs pour le VIH-1 (Science. 272:1841-2012, 1996).



I.iv. Cycle de réplication du VIH

Le cycle réplicatif se résume à six principales étapes: 1). La reconnaissance d'un récepteur spécifique suivie de l'entrée virale dans la cellule cible avec libération de la capsid; 2). La rétrotranscription de l'ARN viral en ADN proviral; 3). Le transfert et l'intégration de l'ADN proviral dans le génome cellulaire; 4). La transcription des ARNs et la synthèse des protéines virales; 5). L'encapsidation et la dimérisation de l'ARN viral puis, 6). Le bourgeonnement et la maturation des particules virales (Rothe, M. *et al.*, 1996; Bélec, L. *et al.*, 2007).

1).- **La reconnaissance d'un récepteur spécifique et d'un corécepteur soit CXCR4 ou CCR5, suivie de l'entrée virale dans la cellule cible avec libération de la capsid**

La pénétration du virus dans la cellule hôte implique une reconnaissance de haute affinité entre la glycoprotéine gp120 et le récepteur cellulaire CD4 (Sonigo, P., 1996; Philpott, S. M., 2003; Bélec, L. *et al.*, 2007). Cette interaction déclenche un changement conformationnel de la glycoprotéine gp120, exposant la région V3 qui est alors clivée (Sonigo, P., 1996; Bélec, L. *et al.*, 2007). Ce clivage de la région V3 influe sur le changement conformationnel en cours et la gp41 est amenée à exposer ses régions hydrophobes (Sonigo, P., 1996). Des études montrent que c'est l'interaction entre la gp120-CD4 et un corécepteur (récepteur de chimiokine CXCR4 ou CCR5) qui seraient responsables de la libération du domaine de fusion de la gp41 (Wu, L. J., *et al.*, 1996; Trkola, A. *et al.*, 1996; Lodge, R. E. *et al.*, 1998; Philpott, S. M., 2003). Les récepteurs des chimiokines étant des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G, la transmission d'un signal résultant du complexe "gp120-CD4-corécepteur" active la phospho-inositol-3-kinase et la protéine kinase C. Entre autres phénomènes, ce signal provoque la polymérisation de l'actine, une réorganisation du cytosquelette, une forte adhérence cellulaire et, finalement, la fusion du VIH avec la membrane de la cellule hôte et l'entrée de la capsid dans la cellule (Lodge, R. E. *et al.*, 1998).

Les CD4, CXCR4 et CCR5 ne constituent pas les seuls éléments facilitant l'entrée du virus dans la cellule hôte; les récepteurs des fragments constants des immunoglobulines (RFc-Ig) et les récepteurs des compléments exprimés par les macrophages, constituent d'autres portes d'entrée du virus dans les cellules hôtes (Rothe, M. *et al.*, 1996).

L'entrée du VIH dans les cellules CD4⁺ (lignées des cellules neuronales U373-MG du glioblastome et MED-217 du médulloblastome) semble impliquer d'autres glycoprotéines comme les galactosylcéramides (GalCer) (Harousse, J. M., *et al.*, 1989; Harousse, J. M., *et al.*, 1991). De plus, certaines souches du VIH, comme les souches virales ADA, YU2, utilisent les récepteurs β -chimiokines CCR3 à la place des CCR5. D'autres souches bi-tropiques, particulièrement la souche 89.6, utilisent aussi le corécepteur CCR2b (Doranz, B. J. *et al.*, 1996; Lodge, R. E. *et al.*, 1998). Tous ces récepteurs alternatifs ont été démontrés *in vitro*, sans démontrer leur implication dans le cycle de réplication du VIH-1 dans les tissus (Bélec, L. *et al.*, 2007). Le GalCer est aussi considéré comme le récepteur alternatif principal d'attachement du VIH-1 pour les cellules épithéliales. Cependant, de nombreuses cellules permmissibles à l'infection par le VIH-1 n'expriment que faiblement ou pas le CD4 et le GalCer à leur surface membranaire. Ceci suggère que d'autres molécules pourraient fonctionner comme des récepteurs alternatifs (Ugolini, S. *et al.*, 1999).

Les chimiokines et leurs récepteurs interviennent dans l'infection des cellules cibles par le VIH (Samson, M. *et al.*, 1999). Ces chimiokines sont des protéines (8 à 12 KDa) formées de trois feuillets plissés β et d'une hélice β dans leur portion terminale (Baggiolini, M. *et al.*, 1997; Mackay, C. R., 1997; Samson, M. *et al.*, 1999). La plupart de ces chimiokines conservent au moins quatre résidus cystéines à leurs extrémités carboxyle - et aminotermiales, lesquelles cystéines contribuent à la formation des ponts disulfures (Samson, M. *et al.*, 1999).

Quatre sous-familles de chimiokines sont à ce jour connues: les CXC-chimiokines (IL8; Gro- α ; Gro- β ; Gro- γ ; NAP-2; ENA-78; IP-10; Mig; SDF-1 α , SDF-1 β ; GCP-2; PF-4), les CC-chimiokines (MCP-1; MCP-2; MCP-3; MCP-4; MCP-5; MIP-1 α ; MIP-1 β ; RANTES; TARC; I-309; Eotaxine; C-10; HCC-1, HCC-2, HCC-4; PARC; MIP-

3 α , MIP-3 β ; SLC; MDC; CKb-6; TECK), les C-chimiokines (lymphotactine, SCM-1 β) et les CX3C-chimiokines (la partie soluble de la Fractalkine) (Samson, M. *et al.*, 1999).

La particularité des CXC-chimiokines (IL8; Gro- α ; Gro- β ; Gro- γ et NAP-2) réside dans la conservation d'un motif ELR (glutamate-leucine-arginine) dans leur portion aminoterminal, dont le rôle serait d'exercer une activité chimiotactique pour les neutrophiles. Certains CXC-chimiokines, bien qu'ils ne possèdent pas de motif ELR, peuvent exercer une activité chimiotactique sur différentes cellules cibles. C'est le cas de la PF-4 qui exerce une activité chimiotactique sur les fibroblastes et les cellules endothéliales (Samson, M. *et al.*, 1999).

Ces chimiokines assurent la migration de différentes populations leucocytaires vers les sites inflammatoires et les activent. Elles sont impliquées dans l'angiogenèse et la prolifération des cellules tumorales. Elles participent à la prolifération et à la différenciation des cellules de la moelle osseuse et agissent comme des antiviraux (Samson, M. *et al.*, 1999). À cet effet, les chimiokines RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β sont connues depuis 1995 comme étant les principaux suppresseurs du VIH (Cocchi, F. *et al.*, 1995; Samson, M. *et al.*, 1999). Ces chimiokines bloquent la réplication du VIH-1 en empêchant particulièrement l'entrée des virus macrophages-tropiques dans les cellules cibles, via leurs récepteurs CCR5, lesquels récepteurs sont connus comme étant l'une des portes d'entrée du VIH-1 (Samson, M. *et al.*, 1999).

Les chimiokines exercent leur activité biologique en se liant à leur récepteur à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G (Samson, M. *et al.*, 1999). Les principaux récepteurs (CCR5, CXCR4, CCR3, CCR2b, CCR8, CXCR1) et le récepteur US28 (récepteur viral du cytomégalo virus) favorisent, en collaboration avec la molécule CD4, l'entrée du VIH-1 dans la cellule cible (Gallo, R. C., Lusso, P. 1999; Samson, M. *et al.*, 1999).

2).- La rétrotranscription de l'ARN viral en ADN proviral

Suite à la libération du capsid dans le cytoplasme de la cellule hôte, la transcriptase inverse assure la rétrotranscription de l'ARN viral simple brin, linéaire ou circulaire (Gilboa, E. *et al.*, 1979; Rothe, M. *et al.*, 1996). La nucléoprotéine NCp7, par son

rôle de chaperon vis-à-vis de la transcriptase inverse, recouvre cette dernière et l'aide dans la rétrotranscription (Lodge, R. E. *et al.*, 1998). Toute mutation de la NCp7 dans son domaine conservé en doigts de zinc, occasionne soit une erreur dans la rétrotranscription, soit une diminution de l'infection virale ou même une incapacité d'intégration de l'ADN proviral dans le génome cellulaire et, par conséquent, une baisse de l'activité de synthèse protéique virale (Darlix, J. *et al.*, 1995; Lodge, R. E. *et al.*, 1998). La protéine Vif interviendrait dans la finalisation de la rétrotranscription selon un mécanisme mal connu qui pourrait être une association de la protéine Vif à l'ARN, à la RT et au Zn⁺⁺, assurant ainsi l'efficacité de la rétrotranscription (Rothe, M. *et al.*, 1996; Kataropoulou¹, A. *et al.*, 2009).

La phosphorylation de la protéine de la matrice M_{Ap}17 est nécessaire pour que le noyau viral, appelé « complexe de préintégration » (CPI), puisse migrer vers le noyau cellulaire et assurer l'infection des cellules quiescentes telles que les macrophages et les cellules microgliales (Lodge, R. E. *et al.*, 1998).

3).- Le transfert et l'intégration de l'ADN proviral dans le génome cellulaire

Trois protéines, la protéine matrice (MA), l'intégrase (Int) et la protéine Vpr, sont associées à la translocation nucléaire du complexe de préintégration (CPI). La protéine Vpr stabilise l'association de la protéine "importin- α " (Imp- α) du complexe "MA/Int/CPI". Une autre protéine, la protéine "importin- β " (Imp- β), en s'intégrant au complexe Imp- α /MA/Int/CPI par sa fixation à la protéine Imp- α , facilite leur translocation dans le noyau cellulaire, via les pores nucléaires. Dans le noyau, la protéine Ran-GTP se lie à la protéine Imp- β et provoque la dislocation des protéines Imp- α et Imp- β . Seul le complexe CPI/MA/Int s'intégrera au noyau cellulaire (Strebel, K., Bour, S., 1999).

La M_{Ap}17 émet deux signaux de transport intracellulaire: le signal de translocation nucléaire et des acides aminés basiques et le signal de transport membranaire faisant intervenir un acide myristique dans la portion aminotermine du précurseur Gag. Présentement, ces deux signaux et d'autres, complémentaires à ceux de la M_{Ap}17, sont l'objet de controverse (Lodge, R. E. *et al.*, 1998). Toutefois, la phosphorylation de la M_{Ap}17 serait assurée par une sérine/thréonine-kinase du virion, laquelle

phosphorylation permettrait le transport actif du complexe de préintégration vers le noyau cellulaire et déclencherait aussi les étapes d'intégration de l'ADN proviral (Lodge, R. E. *et al.*, 1998).

Les formes linéaires de l'ADN proviral demeurent dans le cytoplasme alors que seules les formes circulaires transportées et effectivement localisées dans le noyau s'intègrent au génome cellulaire. L'intégration s'effectue grâce à l'intégrase virale dans des sites non spécifiques, mais préférentiels localisés dans des régions renfermant des gènes activés suite à l'infection par le HIV-1 (Rothe, M. *et al.*, 1996; Schröder, A. R. *et al.*, 2002).

La transcription de l'ADN proviral intégré est assurée par l'ARN polymérase II cellulaire. Le transcrit primaire de 9 kilobases code pour les protéines structurales Gag et Pol et des transcrits de 4 kilobases codent pour les protéines de structure Env et pour les protéines de régulation Vif, Vpr et Vpu. La synthèse protéique est effectuée à l'aide de la machinerie traductionnelle de la cellule hôte (Rothe, M. *et al.*, 1996).

4).- La transcription et la synthèse des protéines virales

La transcription est régulée à la fois par des facteurs cellulaires et viraux (Rothe, M. *et al.*, 1996). La transcription débute par la région LTR 5' et se termine à la région LTR 3' contenant le site de polyadénylation. Le promoteur fort de la région LTR 5' contient une boîte TATA fixant les facteurs cellulaires de transcription (TFII, A, B, D, E, F, H) en relation avec l'ARN polymérase II de la cellule hôte (Rothe, M. *et al.*, 1996).

La protéine Tat est le transactivateur principal du génome viral; elle agit en relation avec le facteur transcriptionnel TFII-D (Lodge, R. E. *et al.*, 1998). Un autre facteur, le NFκB/IκB intervient surtout dans la transcription des LTR (Hiscott, J. *et al.*, 1992; Lodge, R. E. *et al.*, 1998). La sous-unité NFκB est celle qui participe à l'activation du LTR viral alors que la sous-unité IκB, dissociée du complexe NFκB/IκB, est dégradée par un protéasome selon une voie dépendante de l'ubiquitine (Hiscott, J. *et al.*, 1992).

Le facteur NFκB active fortement la transcription et la synthèse des nouveaux virus (Gaynor, R., 1992; Rothe, M. *et al.*, 1996). Des études montrent que des activateurs

d'origine cellulaire, le PMA (phorbol myristate acétate) et les cytokines IL-1 et TNF sont des activateurs de la transcription (Israël, N. *et al.*, 1989; Rothe, M. *et al.*, 1996). Le facteur TCF-1, quant à lui, permet à l'ADN d'adopter une conformation efficace à l'interaction des facteurs transcriptionnels (Rothe, M. *et al.*, 1996).

Deux autres protéines, Rev et Vpr, jouent aussi un rôle lors de la transcription. La protéine Rev module l'expression des ARN messagers viraux codant pour les protéines structurales (Cullen, B. R., 1992; Diaz, J. *et al.*, 1997; Lodge, R. E. *et al.*, 1998).

La protéine Vpr, transactivateur faible, semble réagir avec le facteur TFII-B dans la transcription (Lodge, R. E. *et al.*, 1998). Vpr induit la transcription virale pendant la phase G2 du cycle cellulaire (Goh, W. C. *et al.*, 1998; Felzien, L. K. *et al.*, 1998; Strebel, K., Bour, S., 1999). Préalablement, la protéine Vpr induit l'arrêt de la phase G2 du cycle cellulaire. Le mécanisme d'arrêt de cette phase G2 est moins bien élucidé (Jowett, J. B. M. *et al.*, 1995; Bartz, S. R. *et al.*, 1996; Strebel, K., Bour, S., 1999). Les travaux de Strebel (1999), ont montré que pendant la phase G2 du cycle cellulaire, la protéine Vpr inactive la protéine Kinase Cdc2 par phosphorylation. La phosphatase Cdc25C n'exerce plus son rôle régulateur de la Cdc2 lorsque cette dernière est inactivée par la protéine Vpr (Strebel, K., Bour, S., 1999). Vpr activerait aussi la transcription et ceci s'effectuerait par l'intermédiaire d'une protéine co-activatrice p300, laquelle active la sous-unité NF- κ B et la machinerie transcriptionnelle (Felzien, L. K. *et al.*, 1998; Strebel, K., Bour, S. *et al.*, 1999).

La protéine Vpr induit la production des cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-8, IL-6, IFN- γ et IL-10) en stimulant les cellules T primaires, les macrophages, les cellules monocytaires U937, les cellules épithéliales humaines de la lignée A549 et les cellules de la lignée "JURKAT". La protéine Vpr accroît l'expression d'IL-8 et l'activité du promoteur d'IL-8, en activant les facteurs transcriptionnels NF- κ B et NF-IL-6, et induit aussi l'activité des promoteurs LTR (Roux, P. *et al.*, 2000).

5).- L'encapsidation et la dimérisation de l'ARN viral

Suite à la synthèse protéique, s'opère le processus d'encapsidation et de dimérisation de l'ARN viral (Rothe, M. *et al.*, 1996). Les protéines et enzymes virales, sous la

forme de précurseurs polyprotéiques Gag et Gag-Pol, de même que les glycoprotéines d'enveloppe, s'accumulent à la surface interne de la membrane cellulaire (Darlix, J. L. *et al.*, 1995). Des interactions Gag/Gag, Gag-Pol/Gag-Pol et Gag/Gag-Pol contrôlent l'assemblage du core viral. Le domaine en doigts de zinc de la protéine NCp7 est essentiel à l'assemblage et à l'encapsidation du virus. La maturation des précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol est assurée par la protéase virale activée lors de l'assemblage viral (Darlix, J. L. *et al.*, 1995).

L'intégration ou le recrutement des glycoprotéines à la membrane de la nouvelle particule virale semble résulter de l'interaction entre les protéines de l'enveloppe virale (SU-gp120 et TM-gp41) et la MAp17 (Lodge, R. E. *et al.*, 1998).

L'assemblage des particules virales infectieuses nécessite l'intervention des protéines Gag, Pol et Env; cependant, l'activité des protéines accessoires Vif, Nef et Vpu est aussi requise (Frankel, A. D., Young, J. A., 1998; Jabbar, M. A., 1995; Strebel, K., Bour, S., 1999). Les protéines Gag, Pol et Env, deux copies de l'ARN viral et de nombreuses ARNt₃^{lys}, nécessaires à l'initiation de la transcription inverse, sont rassemblées dans la structure du nouveau virion. Les protéines accessoires Vpr, Vif et Nef participent à l'assemblage du nouveau virion. Les protéines Vpr sont assemblées dans une interaction avec le complexe gag-p6 viral, alors que l'assemblage des protéines Vif et Nef nécessite des signaux spécifiques car elles doivent intervenir dans le pouvoir infectieux viral (Chowers, M. Y. *et al.*, 1994; Miller, M. D. *et al.*, 1994; Strebel, K., Bour, S., 1999). Une protéine chaperonne, la cyclophiline A, intervenant dans l'assemblage du virion, est un composé requis dans l'établissement du pouvoir infectieux viral. Elle est assemblée dans la capsidie et est liée à la protéine Gag (Franke, E. K. *et al.*, 1994; Thali, M. *et al.*, 1994; Strebel, K., Bour, S., 1999).

6).- Le bourgeonnement et la maturation des particules virales

Le bourgeonnement rétroviral est régulé par des kinases cellulaires présentes dans la cellule infectée. C'est le cas de la MAPkinase ERK-2, qui a la capacité à phosphoryler les protéines rétrovirales à domaine L, la p6 pour le VIH-1 (Hemonnot, B. *et al.*, 2004). Les particules du VIH-1 incorporent également des régulateurs de

l'assemblage rétroviral comme la protéine kinase cellulaire PKA qui est spécifiquement incorporée sous forme active dans les particules virales du VIH-1. Son incorporation conditionne l'infectiosité virale. Cette enzyme phosphoryle la protéine CAp24 dont l'assemblage permet la formation de la capsid virale (Cartier, C. *et al.*, 2003). La phosphorylation de la protéine CAp24 module à travers des répulsions électrostatiques qu'elle génère, l'assemblage du réseau hexamérique de CAp24 formant la capsid du VIH-1 (Brun, S. *et al.*, 2010).

Une fois complétés les transcrits d'ARN proviral, sont dirigés à la membrane cellulaire, sont assemblés pour former un virion qui bourgeonne et terminent leur maturation avec l'aide de la protéase dans le milieu extracellulaire. Les particules virales ainsi formées quittent la cellule par bourgeonnement à partir de la membrane cellulaire (Rothe, M. *et al.*, 1996) ou par exocytose (Pelchen-Matthews, A. *et al.*, 2003). Le bourgeonnement est majoritairement observé dans les endosomes tardifs chez les macrophages, et dans la membrane plasmique chez les lymphocytes et chez les cellules épithéliales (Pelchen-Matthews, A. *et al.*, 2003).

Des recherches plus récentes indiquent que le type cellulaire n'est pas le déterminant majeur, puisque dans des lignées cellulaires lymphocytaires et macrophagiques chroniquement infectées, le bourgeonnement dans les endosomes tardifs est prédominant, alors que le bourgeonnement à la membrane plasmique serait associé au caractère aigu des infections (Pelchen-Matthews, A. *et al.*, 2003; Grigorov, B. *et al.*, 2006; Corbin, A. *et al.*, 2008).

Le précurseur env de 160 kilodaltons est clivé pour donner naissance à la gp120 et à la gp41. Ces protéines s'insèrent dans la membrane cellulaire et les précurseurs p55^{gag} et p160^{gag-pol} associés à l'ARN viral génomique s'accumulent à la surface interne de la membrane cellulaire et interagissent également avec les glycoprotéines de l'enveloppe pour sortir par bourgeonnement (Rothe, M. *et al.*, 1996).

La protéine Vpu participe à la sortie des virions par bourgeonnement. Cette protéine est une phosphoprotéine dont l'extrémité N-terminale est ancrée dans la membrane du réticulum endoplasmique et son extrémité C-terminale constitue une queue cytoplasmique (Schubert, U. *et al.*, 1998).

Fonctions de Vpu

La protéine Vpu a plusieurs fonctions connues. Elle participe au relargage des virions à la surface cellulaire; elle induit la dégradation des CD4, et la régulation négative des CMH-1, CD1-d et NTB-A (Natural killer and B cell antigen), elle augmente la susceptibilité à la mort cellulaire des lymphocytes T infectés par le VIH et favorise la réplication virale en empêchant les mécanismes antiviraux cellulaires (Kerkau, Th. *et al.*, 1997; Lodge, R. E. *et al.*, 1998; Schubert, U. *et al.*, 1998; Akari, H. *et al.*, 2001; Neil, S. J. *et al.*, 2007; Neil, S. J. *et al.*, 2008; Van Damme, N. *et al.*, 2008; McNatt, M. W. *et al.*, 2009; Moll, M. *et al.*, 2010; Shah, A. *et al.*, 2010).

La dégradation du récepteur CD4 et le MHC-1 contribue à éviter la formation de complexes entre la protéine Env du VIH-1 et le CD4 de la cellule infectée et aussi à diminuer la reconnaissance de cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques (Willey, R. L. *et al.*, 1992; Kerkau, Th. *et al.*, 1997; Schubert, U. *et al.*, 1998).

La régulation négative des CD1d et des NTB-A interfère avec l'activation et dégranulation des cellules NK respectivement (Moll, M. *et al.*, 2010; Shah, A. *et al.*, 2010).

Pour la dégradation du récepteur CD4 et probablement du MHC-1, Vpu se lie à la protéine humaine h- β -TrCP, puis la protéine SKp1 se lie à l'h- β -TrCP, pour former un complexe de protéines (Vpu/h- β -TrCP/SKp1). La protéine SKp1 lierait le complexe Vpu/h- β -TrCP à la molécule CD4 et participerait à la dégradation de la molécule CD4 dans le protéasome (Strebel, K., Bour, S., 1999). Dans notre modèle de souris Tg-vpu, il est possible que Vpu puisse se lier à la protéine β -TrCP2 de souris, homologue à l'h- β -TrCP (Butticaz, Ch. *et al.*, 2007). Toutefois, on ne sait pas si le récepteur CD4 de la souris est détruit par l'intermédiaire de Vpu- β -TrCP2 ; donc, on ne peut pas conclure que ce mécanisme pourrait aussi dégrader Vpu, étant donné que Vpu peut échapper à la destruction par la voie de la β -TrCP (Estrabaud, E. *et al.*, 2007).

Une autre fonction de Vpu favorise la réplication virale en empêchant les mécanismes antiviraux cellulaires; Vpu est un antagoniste des variantes de la protéine cellulaire BST-2 ou tetherine trouvée chez l'homme et chez les chimpanzés, mais Vpu n'est pas un antagoniste de la tetherine de souris (Neil, S. J. *et al.*, 2007; Neil, S. J. *et al.*, 2008; Van Damme, N. *et al.*, 2008; McNatt, M. W. *et al.*, 2009). La BST-2 (tetherin) est une protéine cellulaire antivirale induite par l'IFN- α qui bloque la libération des rétrovirus naissants de cellules infectées (Mitchell, R. S. *et al.*, 2009). Vpu cause alors une déplétion de BST-2 à la membrane cytoplasmique en se liant à l'h- β -TrCP qui est un substrat adaptateur de la sous-unité du complexe SCF E3/ubiquitine ligase (Mitchell, R. S. *et al.*, 2009). Donc Vpu induit la dégradation de BST-2 principalement par voie endosomale et partiellement lysosomale et du protéasome (Estrabaud, E. *et al.*, 2007; Mitchell, R. S. *et al.*, 2009). Par contre quand la BST-2 retient les virons naissants, ils s'accumulent dans les endosomes et sont détruits dans les lysosomes (McNatt, M. W. *et al.*, 2009).

Deux voies de dégradation de Vpu, indépendantes de la voie de la β -TrCP, ont été récemment démontrées : i) quand Vpu est phosphorylée au résidu 61 de sérine, elle ne se lie pas à la β -TrCP et elle est donc dégradée au moment de l'arrêt du cycle cellulaire, au début de la mitose. ii) Vpu est reconnue comme un substrat pour une E3 ubiquitine ligase différente de la β -TrCP et est dirigée dans le protéasome pour sa dégradation (Estrabaud, E. *et al.*, 2007). Puisque Vpu ne se lie pas à la protéine BST-2 de souris, Vpu est détruite probablement par les mécanismes précédemment décrits. Cette dégradation de Vpu pourrait contribuer à la difficulté à démontrer la protéine Vpu dans notre modèle de souris Tg-vpu.

Par ailleurs, une des conséquences de la dégradation des CD4 consiste à faciliter l'assemblage de la glycoprotéine gp160 (Willey, R. L. *et al.*, 1992; Kerkau, Th. *et al.*, 1997).

D'autres protéines telles que Vif ou Nef pourraient également participer à la sortie des virons. La protéine Vif possède une activité capable de cliver la partie C-

terminale de la glycoprotéine de l'enveloppe gp41 (Rothe, M. *et al.*, 1996). La protéine Nef intervient aussi dans la régulation négative des CD4 et des CMH de classe I (Collins, K. L. *et al.*, 1998; Hanna, Z. *et al.*, 1998). Cette protéine permet l'accumulation et la rétention des complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) dans le Golgi, grâce à un complexe adaptateur AP-1, et assure leur conduction vers les lysosomes (Strebel, K., Bour, S., 1999).

I.v Pathologie

I.v.i. Physiologie du déficit immunitaire lié au VIH

Le VIH crée, dans l'organisme hôte, une infection active lui assurant une multiplication continue et non une infection latente à réaction tardive (Ho, D. D. *et al.*, 1995; Hubert, P. *et al.*, 1996). La pression exercée par l'infection du VIH sur le système immunitaire, réside dans l'habileté du virus à muter constamment ses déterminants antigéniques (par l'intermédiaire de la transcriptase inverse) et à maintenir un système répliatif extrêmement rapide (Champagne, P. *et al.*, 1998). Malgré le pouvoir du système immunitaire à éliminer les virions, sa capacité d'action semble limitée puisque le VIH arrive toujours à muter ses épitopes immunodominants et échappe à l'action des lymphocytes T cytotoxiques (Champagne, P. *et al.*, 1998). La charge virale, c'est-à-dire la quantité d'ARN viral plasmatique, comptabilise à la fois les VIH infectieux pendant le stade latent ou répliatif. Cette charge virale est un indice d'évaluation de la quantité ou de l'état des lymphocytes T CD4+. Ainsi, les individus ayant une charge virale élevée et un faible taux de lymphocytes T CD4+ sont plus susceptibles de développer le Sida (Morand-Joubert, L., 1998). Cette charge virale induit des anomalies quantitatives et qualitatives dans l'organisme hôte et crée une hyperactivation du système immunitaire, perturbe l'homéostasie lymphocytaire, puis le système de développement et de renouvellement des cellules

immunocompétentes; ces mécanismes participeraient à l'anergie, à l'apoptose et à la destruction des lymphocytes T CD4⁺ et induiraient un déficit immunitaire progressif et irréversible (Hubert, P. *et al.*, 1996; McMichael, A. J. *et al.*, 2000; Alimonti, J. B. *et al.*, 2003; Douek, D. C., 2003).

Les principales cibles du VIH sont les lymphocytes T CD4⁺ et les macrophages (Hubert, P. *et al.*, 1996). Pendant la primo-infection, le virus se réplique activement dans les lymphocytes T CD4⁺. Il s'ensuit une réaction du système immunitaire visant à éliminer l'essentiel de la charge virale mais la réponse immunitaire reste inefficace car il est difficile de détecter les antigènes p24 pendant les trois premiers mois de l'infection. Le virus se réfugie alors dans les organes lymphoïdes et une période asymptomatique (dont la durée varie selon les patients) s'installe. Dans ces organes lymphoïdes, la réplication virale continue mais la diffusion virale à l'extérieur de ceux-ci est réprimée par la forte activité des lymphocytes T cytotoxiques et par l'immunité à médiation humorale (Pantaleo, G. *et al.*, 1993; Lévy, J. A., 1993; Hubert, P. *et al.*, 1996). L'incapacité du système immunitaire à éliminer le VIH pendant la primo-infection peut s'expliquer par le fait que: i) Le provirus s'intègre dans le génome des cellules T quiescentes ou au repos. Le virus vit alors un état de latence dans les cellules T, dans les macrophages et les cellules dendritiques (Spina, C. A., *et al.*, 1994; Hubert, P. *et al.*, 1996). ii) Le VIH mute constamment ses déterminants antigéniques (par des mutations touchant surtout le gène viral env). La grande variété de ses épitopes immunodominants expliquerait l'inefficacité de l'action des lymphocytes (Dadaglio, G., *et al.*, 1991; Hubert, P. *et al.*, 1996). Échappant à l'action des lymphocytes T cytotoxiques, le VIH peut aussi infecter les lymphocytes T CD4⁺ et les macrophages, jouant un rôle dans la réponse T dépendante (Hodes, R. J., 1989; Hubert, P. *et al.*, 1996).

iii) La séquestration des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans les organes lymphoïdes, sous la stimulation de la réponse immune anti-VIH pendant la période aiguë de l'infection, permet une chute de ces deux populations lymphocytaires (Fauci, A. S., 1993; Lévy, J. A., 1993; Hubert, P. *et al.*, 1996). Après cette période, alors que les lymphocytes T CD8⁺ augmentent en nombre, les lymphocytes T CD4⁺ décroissent en

nombre en dessous du seuil critique (Pantaleo, G. *et al.*, 1993; Hubert, P. *et al.*, 1996).

iv) L'apoptose et l'anergie comptent parmi les mécanismes impliqués dans la déplétion des lymphocytes T CD4⁺. Chez les patients sidéens, il existe une apoptose des cellules infectées par le VIH. Des souches de VIH infectant les lymphoblastes induisent directement, en vingt-quatre heures, une fragmentation de l'ADN cellulaire (Wattre, P. *et al.*, 1996). Cette apoptose est la conséquence de la cytotoxicité directe du virus dans les cellules CD4⁺, soit par l'altération des lipides membranaires de la cellule infectée et l'augmentation de sa perméabilité, soit par le bourgeonnement massif des virions néo-formés à la surface de la cellule, soit par l'expression de protéines Env à la surface cellulaire (Oyaizu, N., Pahwa, S., 1995; Wattre, P. *et al.*, 1996). À cela se surajoute une apoptose des lymphocytes non infectés. Les lymphocytes sont très susceptibles à l'apoptose lorsqu'il y a activation d'une molécule de leur surface. Ainsi, des lymphocytes T au repos, prétraités par des anti-CD4, entrent en apoptose si leur récepteur TcR est stimulé (Oyaizu, N., Pahwa, S., 1995; Wattre, P. *et al.*, 1996).

Les lymphocytes T non infectés de patients VIH⁺ asymptomatiques subissent une apoptose lorsqu'ils sont activés par l'anticorps anti-CD3, la PHA (phytohaemagglutinin), le PWM (pokeweed mitogen), le calcium, les antigènes du CMH et les superantigènes (Gougeon, M. L., Montagnier, L. *et al.*, 1993; Wattre, P. *et al.*, 1996).

Également, l'expression du gène vpu rend les lymphocytes T transfectés par ce gène plus susceptibles à l'apoptose par activation de la voie de signalisation de Fas (Casella, C. R. *et al.*, 1999; Akari H. *et al.* 2001).

v) L'anergie des cellules T est un phénomène physiologique caractérisé par un défaut de la réponse à une stimulation antigénique par un déficit de production d'interleukine-2. Cette anergie expliquerait la tolérance des cellules T vis-à-vis des antigènes du soi, la perte de fonction des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, la diminution des capacités de présentation antigénique et la perte des capacités de prolifération des cellules T en réponse à une stimulation des anticorps anti-CD3 (Schwartz, R. H.,

1990; Schellekens, P. T. A. *et al.*, 1990; Hubert, P. *et al.*, 1996). Le déficit fonctionnel des lymphocytes T CD4⁺ existe dès la phase asymptomatique et semble précéder la déplétion de ces cellules. Pendant la phase symptomatique, un déficit de transmission de signal par le complexe CD3-récepteur dans les cellules T CD4⁺ a été observé (Cayotta, A. *et al.*, 1994; Hubert, P. *et al.*, 1996). Outre l'anergie, l'apoptose permet l'élimination des lymphocytes T CD4⁺, la lyse des cellules cibles par les lymphocytes T cytotoxiques et l'élimination des cellules effectrices ayant atteint le stade final de différenciation (Sprent, J., Tough, D. F., 1994; Pantaleo, G. *et al.*, 1995; Hubert, P. *et al.*, 1996).

Pendant le stade final de différenciation des lymphocytes T CD4⁺, les types cellulaires Th1 et Th2, bien qu'ils s'inhibent mutuellement, dérivent des cellules Th0. Dans les situations non pathologiques, les cellules Th1 sécrètent les cytokines IFN- γ et IL-2 nécessaires à la stimulation des réactions d'hypersensibilité retardée. Les cellules Th2 sécrètent les cytokines IL-4 et IL-10 utiles à l'activation des lymphocytes B pour produire des Igs (Mosman, T. R., 1994; Hubert, P. *et al.*, 1996). Au cours de la phase précoce d'infection, les cellules Th1 diminuent leur production d'IL-2 et les cellules Th2, quant à elles, sécrètent abondamment les cytokines IL-4 et IL-10 (Clerici, M. *et al.*, 1993; Hubert, P. *et al.*, 1996). Chez les sidéens, on observe également une déplétion de lymphocytes T mémoire CD45RO et une forte expansion d'une sous-population de lymphocytes T mémoire, identifiés comme les CD4⁺CD7⁻ lorsque les lymphocytes T CD4⁺ sont détruits en dessous du seuil critique de 200/mm³. Ces lymphocytes T CD4⁺ CD7⁻ sécrètent des cytokines du type Th0/Th2 (Hubert, P. *et al.*, 1996). Les lymphocytes T exprimant des marqueurs CD45RO ont un rôle de cellule mémoire et naissent de la stimulation antigénique des cellules T CD4⁺ naïves exprimant l'isoforme CD45RA (Sprent, J., Tough, D. F., 1994; Hubert, P. *et al.*, 1996). Cependant, les raisons de la déplétion sélective de ces cellules T CD45RO pendant la phase asymptomatique restent inconnues (Hubert, P. *et al.*, 1996). Plus récemment, il a été identifié une nouvelle sous-population de lymphocytes T CD4⁺CD25⁺ nommés lymphocytes Treg (*T regulatory cells*). Ces cellules représentent 5-10% des thymocytes CD4⁺CD8⁻ chez les humains, les souris et les rats (Shevach, E. M., 2002). Ces lymphocytes peuvent réguler les réponses de

lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Akbar, A. N. *et al.*, 2003; Thornton, A. M. *et al.*, 2004) et donc participer dans la pathogenèse de l'infection par le VIH (Tsunemi, S. *et al.*, 2005; Nilsson, J. *et al.*, 2006).

Le déficit quantitatif et fonctionnel des lymphocytes T CD4⁺ a des conséquences sur le fonctionnement des lymphocytes T CD8⁺ et sur les cellules B (Hubert, P. *et al.*, 1996). Le déficit des cellules T CD4⁺ s'effectue en parallèle avec une augmentation de l'activité cytotoxique par les lymphocytes T CD8. Un pourcentage élevé de cellules CD8 persiste de la primo-infection à la phase asymptomatique (Fauci, A. S., 1993; Lévy, J. A., 1993; Hubert, P. *et al.*, 1996).

Cependant, un déficit de la réponse cytotoxique des cellules T CD8 contre le VIH, contre les cytomégalovirus et d'autres pathogènes, au stade avancé du Sida, a été rapporté (Rook, A. H. *et al.*, 1983; Hubert, P. *et al.*, 1996; Sousa, A. *et al.*, 2002; Hazenberg, M. D. *et al.*, 2003). Ce déficit de la réponse cytotoxique des cellules T CD8⁺, *in vivo*, serait causé par l'anergie, la délétion ou la perte des fonctions Th1 des lymphocytes T CD4 et les effets régulateurs de cellules Treg (Matloubian, M. *et al.*, 1994; Hubert, P. *et al.*, 1996; Akbar, A. N. *et al.*, 2003; Thornton, A. M. *et al.*, 2004; Tsunemi, S. *et al.*, 2005; Nilsson, J. *et al.*, 2006).

Les lymphocytes T CD4⁺, ayant un déficit fonctionnel et une anergie, perdent leur capacité de production d'IL-2 et, par conséquent, ne stimulent plus les cellules B à proliférer et à se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps spécifiques (Hodes, R. J., 1989; Hubert, P. *et al.*, 1996). Ces cellules B, ne recevant plus de stimulation lymphocytaire T CD4⁺, entament une hyperproduction polyclonale de gammaglobulines et d'auto-anticorps. L'anergie, la déplétion lymphocytaire T CD4⁺ et même la participation de gp120 virale seraient impliquées dans cette hyperstimulation des lymphocytes B (Hubert, P. *et al.*, 1996). Également, la production des IL-6 par les cellules B, par les macrophages activés et les cellules Th2, contribue à ce phénomène (Hubert, P. *et al.*, 1996). Cette hyperstimulation lymphocytaire B serait aussi à l'origine des lymphoproliférations malignes et des maladies auto-immunes au cours du Sida (Miedema, F., 1992; Hubert, P. *et al.*, 1996).

Plusieurs autres mécanismes contribuant au déficit du système immunitaire ont été suggérés. Il s'agit des effets cytopathogéniques du VIH, de l'effet de certaines protéines virales, de l'activation chronique du système immunitaire et de la perturbation de la différenciation et de l'homéostasie lymphocytaire (Hubert, P. *et al.*, 1996; Sousa, A. *et al.*, 2002; Hazenberg, M. D. *et al.*, 2003). Au cours de la libération extracellulaire des virions, les protéines gp120, exprimées à la surface des cellules infectées, fusionnent avec les récepteurs CD4 des cellules non infectées. Cette fusion génère des cellules géantes multinucléées appelées “*syncytia*”. Cet effet cytopathogénique semble induire la déplétion *in vivo* des cellules T CD4 (Hubert, P. *et al.*, 1996). D'autres effets non cytopathogéniques pourraient aussi contribuer à la déplétion des cellules T CD4⁺. Il s'agirait d'une part de la destruction des cellules exprimant les protéines gp120 par les cellules NK (via un mécanisme de cytotoxicité impliquant des compléments) et d'autre part, de la destruction des cellules T CD4 par les cellules T cytotoxiques (Lyerly, H. K. *et al.*, 1987; Hubert, P. *et al.*, 1996). Les protéines virales Tat et gp120 auraient démontré un effet dans les dysfonctionnements des lymphocytes T CD4⁺. La protéine Tat inhiberait l'activation et la production des IL-2 par les cellules T, via l'altération des voies de signalisation intracellulaire ou en réduisant l'expression des molécules CD4 (Garcia, J. V. *et al.*, 1991; Hubert, P. *et al.*, 1996). Quant aux protéines monomériques gp120 virales libérées dans le milieu extracellulaire par les cellules infectées (Hubert, P. *et al.*, 1996), elles inhiberaient l'activité de la tyrosine kinase p56 (lck) par l'altération de la voie de signalisation du CD3 (Hubert, P. *et al.*, 1995; Hubert, P. *et al.*, 1996). La protéine gp120 serait capable d'induire l'apoptose des cellules T périphériques en stimulant les complexes CD3-TCR (Finkel, T. H. *et al.*, 1995; Hubert, P. *et al.*, 1996). Au cours de l'activation chronique du système immunitaire, les cytokines sont hyperproduites. Les marqueurs d'activation, la β -microglobuline, la néoptérine, les CD25 et HLA-DR (exprimés par les macrophages), les CD38 et DR (exprimés par les cellules CD4 et CD38), augmentent en nombre (Graziosi, C. *et al.*, 1994; Hubert, P. *et al.*, 1996). Pendant cette hyperstimulation, la liaison des complexes “gp120/anti-gp120” aux molécules CD4 des lymphocytes T CD4⁺ conduit à la mort par apoptose de ces derniers (Hubert, P. *et al.*, 1996). La stimulation chronique des cellules T par

les antigènes viraux induit une augmentation des lymphocytes T $CD4^+CD7^-$. Ces cellules T deviennent anergiques lorsque les antigènes viraux ne sont pas éliminés et ce, malgré leur hyperstimulation. L'hyperstimulation produit un épuisement des cellules CD4 et CD8 et ces cellules effectrices, ne se transformant plus en cellules mémoires, meurent par apoptose (Sprent, J., Tough, D. F., 1994; Hubert, P. *et al.*, 1996).

Outre l'activation chronique du système immunitaire, la perturbation de la différenciation et de l'homéostasie lymphocytaire conduirait au déficit immunitaire. L'infection (par le VIH) des progéniteurs médullaires crée non seulement leur dysfonctionnement mais semble induire la lymphopénie CD4 (Hubert, P. *et al.*, 1996). A leur sortie de la moelle osseuse, les progéniteurs T migrent dans le thymus pour y subir une différenciation et une maturation (Sprent, J., Tough, D. F., 1994; Hubert, P. *et al.*, 1996). Mais l'infection du thymus provoque une involution et une perte de son architecture et les sous-populations cellulaires $CD4^+CD8^+$, $CD4^+CD8^-$ et $CD4^-CD8^+$ subissent une déplétion (Rozenzweig, M. *et al.*, 1993; Hubert, P. *et al.*, 1996) probablement par apoptose (Su, L. *et al.*, 1995; Hubert, P. *et al.*, 1996). Les cellules CD4 détruites sont remplacées grâce à une différenciation rapide dans le thymus et on assiste aussi à une hyperplasie des ganglions. L'intense réponse anti-VIH dans les ganglions amène une capture des particules virales par les cellules dendritiques; une grande quantité virale est éliminée et des cellules CD4 infectées sont détruites (Pantaleo, G. *et al.*, 1993; Sprent, J., Tough, D. F. 1994; Hubert, P. *et al.*, 1996). A un stade avancé du Sida, les ganglions s'altèrent, les cellules dendritiques sont détruites, les mécanismes de présentation antigénique sont perturbés. En conséquence, on assiste à une inhibition des réponses immunes, une baisse de régénération des précurseurs lymphocytaires T et une déplétion des cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ (Pantaleo, G. *et al.*, 1993; Fauci, A. S., 1993; Hubert, P. *et al.*, 1996). Les cellules dendritiques associées aux antigènes viraux stimulent les cellules B à sécréter une grande quantité d'IL-6. Ces IL-6 contribuent à leur tour à l'augmentation de la réplication virale dans les cellules T (Boue, F. *et al.*, 1992; Hubert, P. *et al.*, 1996). La baisse de la production d'IL-2 par les Th1 atteints d'anergie, induit un accroissement des Th2 par rapport aux Th1 (Clerici, M. *et al.*,

1993; Hubert, P. *et al.*, 1996). Cette amplification préférentielle des Th2 serait impliquée dans la baisse de production d'IL-2 par les lymphocytes T CD4⁺ en déplétion (Boue, F. *et al.*, 1992; Hubert, P. *et al.*, 1996). L'augmentation de la production de TGF- β par les macrophages infectés, pourrait induire l'anergie ou l'apoptose des populations lymphocytaires T (Kekow, J. *et al.*, 1990; Hubert, P. *et al.*, 1996).

Enfin, la destruction des organes lymphoïdes conduit progressivement à un déficit immunitaire perturbant la régulation lymphocytaire via la dérégulation des cytokines et des progéniteurs T périphériques (Hubert, P. *et al.*, 1996).

I.v.ii. Physiologie des anomalies hématologiques

Parmi les anomalies hématologiques liées à l'infection au VIH, la pancytopenie demeure une manifestation fréquente. La pancytopenie est un syndrome lié à une insuffisance de production médullaire (Treacy, M. *et al.*, 1987; Ganser, A. *et al.*, 1990; Louache, F., Vainchenker, W., 1996; Nardi, M., Karpatkin, S., 2000). Elle est liée aussi à plusieurs facteurs associés à une dégradation générale de l'organisme (carence vitaminique, syndrome inflammatoire), à des infections opportunistes et aux traitements. D'autres types de cytopénie, surtout périphériques, à l'exemple de la thrombopénie, naissent d'une destruction immunologique (Louache, F., Vainchenker, W., 1996; Nardi, M., Karpatkin, S., 2000).

Trois types de manifestations hématologiques dues à l'infection au VIH sont connus. Il s'agit des modifications touchant le sang périphérique, la morphologie médullaire et le compartiment des progéniteurs (Louache, F., Vainchenker, W., 1996).

Les anomalies touchant le sang périphérique sont de divers ordres. L'anémie (hématocrite inférieure à 40%) touche 70 à 95% des cas et survient surtout chez les patients dont l'infection au VIH est à un stade symptomatique (Louache, F., Vainchenker, W., 1996).

La leucopénie, dans 57 à 76% des cas, affecte les patients sidéens et, dans 19 à 41% des cas, touche les patients ayant une polyadénopathie. La neutropénie (neutrophiles inférieurs à $1500/\text{mm}^3$) est associée à une hyposégmentation des neutrophiles et à une hyperactivité peroxidasique évoquant une dysgranulopoïèse (Louache, F., Vainchenker, W., 1996). La thrombopénie (plaquettes inférieures à 150 000) se présente sous deux formes cliniques: modérée ou sévère. La première survient à un stade évolué de l'infection au VIH, chez 30% des sidéens, et est associée à une insuffisance de production de plaquettes et à une destruction immunologique périphérique. La thrombopénie sévère apparaît au stade précoce ou évolué du Sida et cette fois-ci, la durée de vie des plaquettes est très raccourcie. L'insuffisance de production liée à une destruction périphérique pourrait s'expliquer par une infection des mégacaryocytes (Zucker-Francklin, D., Cao, Y., 1989; Louache, F., Vainchenker, W., 1996; Nardi, M., Karpatkin, S., 2000; Scaradavou, A., 2002).

Dans certains cas de thrombopénie, on retrouve autant d'auto-anticorps antiplaquettaires que dans les purpuras thrombopéniques immunologiques. Dans d'autres cas, ces anticorps antiplaquettaires peuvent être dirigés contre les protéines gp120 de l'enveloppe virale, et peuvent interagir avec des antigènes plaquettaires (comme les complexes GpIIb/IIIa). Un autre cause pourrait être associée à la présence de complexes immuns à la surface de plaquettes qui seront ensuite détruites par le système phagocytaire (Karpatkin, S. *et al.*, 1988; Beltaieb, A. *et al.*, 1989; Louache, F., Vainchenker, W., 1996; Nardi, M., Karpatkin, S., 2000; Scaradavou, A., 2002).

Les anomalies morphologiques médullaires se présentent sous la forme d'hypercellularité au stade précoce de l'infection (le rapport des cellules myéloïdes/érythroblastes est élevé, les granulocytes immatures augmentent en nombre alors que les formes segmentées sont en diminution). Une autre anomalie, la fibrose réticulinique, se présente sous la forme d'agrégats lymphocytaires (Louache, F., Vainchenker, W., 1996). Dans ces anomalies, on peut observer des troubles de maturation (des érythroblastes et des mégacaryocytes), une mégaloblastose, un excès de granulocytes immatures, une abondance d'éosinophiles, un début de fibrose et une population cellulaire médullaire de plus en plus importante (Treacy, M. *et al.*, 1987; Castella, A. *et al.*, 1985; Louache, F., Vainchenker, W., 1996). Ces anomalies

associées à l'infection par le VIH, ont fait suspecter que le VIH peut toucher les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques (Louache, F., Vainchenker, W., 1996; Nardi, M., Karpatkin, S., 2000).

Dans le compartiment des progéniteurs, le système hématopoïétique comporte un compartiment majoritairement formé de cellules à morphologie non reconnaissable dans la moëlle et de deux autres compartiments minoritaires, mais participant grandement à la formation des cellules hématopoïétiques. Ces deux compartiments minoritaires sont: le compartiment des progéniteurs et le compartiment des cellules souches. Les cellules du compartiment des progéniteurs sont de courte vie et représentent 0.5 à 1% des cellules médullaires; elles prolifèrent et se différencient sous l'effet des facteurs de croissance hématopoïétique, sans toutefois s'autorenouveler. C'est dans ce compartiment des progéniteurs qu'a lieu principalement la régulation hématopoïétique. Quant au compartiment des cellules souches, il représente moins de 0.05% des cellules médullaires. Ces cellules souches pluripotentielles sont capables de s'autorenouveler et représentent aussi le lieu de différenciation des cellules myéloïdes et des cellules lymphocytaires B et T (Louache, F., Vainchenker, W., 1996).

Deux études focalisées sur la croissance des progéniteurs hématopoïétiques, chez les patients sidéens, ont montré une baisse de tous les types de progéniteurs (Carlo-Stella, C. *et al.*, 1987; Louache, F., Vainchenker, W., 1996). Par rapport aux chiffres normaux, les progéniteurs BFU-E et CFU-MK ont diminué de 15% et les progéniteurs CFU-GM ont régressé de 50% (Leiderman, I. Z. *et al.*, 1987; Louache, F., Vainchenker, W., 1996). Ces anomalies de croissance des progéniteurs ont même été observées chez des patients non cytopéniques et chez des patients polyadénopathiques. Par ailleurs, l'existence de ces anomalies chez les patients VIH⁺ asymptomatiques ayant un taux CD4 proche de la normale reste à déterminer (Louache, F., Vainchenker, W., 1996).

I.v.iii. Modifications des cytokines au niveau clinique

Au cours de l'infection par le VIH, les patients sidéens présentent une dérégulation de la production de cytokines (Emilie, D., Galanaud, P., 1996). Les cytokines IL-1, IL-6, IL-13, TNF- α et IFN- γ augmentent exagérément alors que la production d'IL-2 et IL-12 est à la baisse. La production d'IL-10 est quelquefois stable ou accrue alors que l'IL-4 varie à la hausse ou à la baisse. Ce déséquilibre de production des cytokines peut, en partie, expliquer le dysfonctionnement du système immunitaire (Emilie, D., Galanaud, P., 1996). L'hyperproduction des monokines provient non seulement des monocytes et des macrophages mais, également, d'autres cellules telles que les cellules endothéliales et les fibroblastes. Cette hyperproduction des cytokines résulte, d'une part, d'une activation occasionnée par les protéines virales (protéines de l'enveloppe virale et la protéine Tat) et, d'autre part, d'une activation issue d'autres cellules du système immunitaire. Cette hyperproduction peut être limitée ou compensée soit par une hyperproduction des monokines anti-inflammatoires (IL-1RA et IL-10), soit par un déficit d'autres médiateurs issus des monokines (Emilie, D., Galanaud, P., 1996). La cytokine IL-1RA, capable de se fixer sur le récepteur de l'IL-1, agit comme un antagoniste compétitif de l'IL-1. Quant à la cytokine IL-10, sécrétée principalement par les monocytes, elle inhibe la production de l'IL-12 et des monokines pro-inflammatoires. La cytokine IL-12 chez les sujets sains, contribue au déclenchement des réactions immunitaires à médiation cellulaire. La baisse de sa production au cours de l'infection au VIH, peut expliquer la diminution des activités de l'immunité à médiation cellulaire, les premières à être affectées au cours du déficit des fonctions immunitaires (Emilie, D., Galanaud, P., 1996).

Les cytokines produites par les lymphocytes T subissent, elles aussi, un déséquilibre contribuant au dysfonctionnement du système immunitaire. Le déficit de production d'IL-2 par les lymphocytes T CD4⁺, au cours de l'infection au VIH, peut résulter des anomalies fonctionnelles ou d'une dégradation de ces lymphocytes. Le déficit de l'IL-1 entraîne à cet effet, une baisse de stimulation de nombreuses fonctions immunitaires (Emilie, D., Galanaud, P., 1996). Chez les lymphocytes Th1 et Th2, le déséquilibre de production des cytokines s'opère par une baisse d'IL-2 et IFN- γ et par

une hyperproduction des IL-4 et IL-10. La baisse d'IL-2 et IFN- γ contribue à un déficit de l'activité de l'immunité cellulaire, alors que l'hyperproduction des IL-4 et IL-10 occasionne une hyperstimulation des lymphocytes B. Les IL-4 activent également la production des IgE (Emilie, D., Galanaud, P., 1996). Chez les lymphocytes T CD8⁺, l'hyperproduction des cytokines concerne l'IFN- γ (Emilie, D. *et al.*, 1990; Graziosi, *et al.*, 1994; Emilie, D., Galanaud, P., 1996) et l'IL-10 (Emilie, D. *et al.*, 1994; Emilie, D., Galanaud, P., 1996).

Les déficiences majeures du système immunitaire causées par un déséquilibre de la production des cytokines sont: un déficit de l'immunité à médiation cellulaire, une hyperstimulation de l'immunité à médiation humorale et des lymphocytes T CD8⁺. L'atteinte de l'immunité à médiation cellulaire affecte grandement les réactions d'hypersensibilité retardée, utiles à la destruction des agents pathogènes de l'organisme (Emilie, D., Galanaud, P., 1996). Par ailleurs, si l'immunité à médiation cellulaire permet de lutter contre les virus et les tumeurs, grâce au concours des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques, le rôle de l'équilibre des cytokines IL-10/IL-12 dans le déclenchement de cette immunité cellulaire est capital. L'IL-10 (produite par les monocytes et les macrophages) inhibe la production (par les macrophages) de l'IL-12 et les effets de cette cytokine. Quant à l'IL-12, elle stimule la sécrétion des IFN- γ (par les lymphocytes T et les cellules NK) et l'IFN- γ , à son tour, inhibe la sécrétion d'IL-10 (Emilie, D., Galanaud, P., 1996). L'hyperproduction de l'IL-10 est très inconstante pendant le stade précoce de l'infection et elle aggrave encore le déficit des réponses à médiation cellulaire (Emilie, D. *et al.*, 1994; Emilie, D., Galanaud, P., 1996).

Il est à noter que seules les souches virales monocytotropiques inhibent la production de l'IL-12 (Chehimi, J. *et al.*, 1994; Emilie, D., Galanaud, P., 1996). Ce déséquilibre IL-10/IL-12 contribue aux anomalies lymphocytaires T. Il suggère que l'origine de cette dysfonction des cellules T, pourrait se trouver dans le compartiment de monocytes/macrophages (Chehimi, J. *et al.*, 1994; Emilie, D., Galanaud, P., 1996). Des recherches sur des modèles animaux ont mis l'importance de l'infection de macrophages dans la dysfonction et la destruction de lymphocytes T CD4⁺ (Mosier, D. E. *et al.*, 1993; Emilie, D., Galanaud, P., 1996). Durant l'infection par le VIH, les

lymphocytes T CD8⁺ sécrètent des quantités inhabituelles d'IL-10 et d'IL-4 et se transforment progressivement en lymphocytes T CD8⁺ suppresseurs. Finalement, les anomalies de production de cytokines au cours de l'infection par le VIH, n'affectent pas seulement les réponses à médiation cellulaire; elles contribuent à l'hyperactivité de cellules B, et la cytokine impliquée serait l'IL-6 (Emilie, D., Galanaud, P., 1996).

I.v.iv. Néphropathie associée au virus de l'immunodéficience humaine (HIVAN)

La néphropathie associée au VIH (HIVAN) est une complication touchant autour de 10% des patients Afro-Américains (Bourgoignie, J. J. *et al.*, 1989; Simon, D. B. *et al.*, 1996; Bruggeman, L. A. *et al.*, 1997). Le HIVAN se présente dans tous les stades du Sida et n'est pas associé à la charge virale ou à la baisse des lymphocytes T CD4⁺ (Rao, T. K., 1991; Kimmel, P. L. *et al.*, 1995; Bruggeman, L. A. *et al.*, 1997). Cette néphropathie se manifeste cliniquement par une protéinurie sévère qui progresse rapidement vers une insuffisance rénale grave (D'Agati, V. *et al.*, 1989; Bruggeman, L. A. *et al.*, 1997; Han, T. M. *et al.*, 2006).

L'aspect pathologique du rein dans les cas avec HIVAN est celui d'un rein plus volumineux et pâle (Adler, S. G. *et al.*, 1996; Han, T. M. *et al.*, 2006). À l'histopathologie des reins, il y a des altérations dans les glomérules (hyalinose segmentaire et focale avec collapsus glomérulaire), dans les tubules (dilatations microkystiques) et dans l'interstitium (infiltrat lymphoplasmocytaire) (Cohen, A. H., Nast, C. C. 1988; Adler, S. G. *et al.*, 1996; Kimmel, P. L. *et al.*, 2003; Han, T. M. *et al.*, 2006). Les cellules épithéliales viscérales (podocytes) sont volumineuses, vacuolées et contiennent des gouttes réabsorbées de protéines. Les capillaires affectés sont obstrués par de volumineuses cellules vacuolées. Avec la progression de la lésion, la protéine plasmatique est précipitée et bloque plusieurs capillaires (hyalinose); quelques capillaires collapsent et la substance mésangiale augmente (glomérulopathie collapsante). Dans la majorité des cas, il y a une dégénérescence ou nécrose des cellules épithéliales des tubules. Ces tubules développent des microkystes

qui sont remplis de protéines plasmatiques précipitées (Adler, S. G. *et al.*, 1996; Han, T. M. *et al.*, 2006).

À l'immunofluorescence, il y a présence d'IgM ou d'IgA de façon diffuse dans le mésangium, ou d'IgM, de C3 et de C1q dans le glomérule, de façon segmentaire. Il n'y a pas de dépôts granulaires dans les parois des capillaires (Adler, S. G. *et al.*, 1996).

À la microscopie électronique, les lésions glomérulaires ressemblent aux lésions de glomérulosclérose et d'hyalinose idiopathique focale et segmentaire (Adler, S. G. *et al.*, 1996). L'altération la plus retrouvée est la présence de nombreuses grandes structures tubuloréticulaires dans le cytoplasme des cellules endothéliales des glomérules et dans d'autres vaisseaux sanguins (Chander, P. *et al.*, 1987; Cohen, A. H., Nast, C. C. 1988; Adler, S. G. *et al.*, 1996; Han, T. M. *et al.*, 2006).

Longtemps, les mécanismes de l'HIVAN étaient mal déterminés et les altérations glomérulaires et tubulaires suggéraient une étiologie virale (Chander, P. *et al.*, 1987; Cohen, A. H., Nast, C. C. 1988; Adler, S. G. *et al.*, 1996). Le génome du VIH a été démontré dans l'épithélium glomérulaire, tubulaire et dans les podocytes des biopsies des patients atteints de ces lésions (Cohen, A. H. *et al.*, 1989; Adler, S. G. *et al.*, 1996; Kimmel, P. L. *et al.*, 2003). Un groupe de chercheurs a démontré que le VIH peut infecter des cellules endothéliales et mésangiales *in vitro* (Green, D. F. *et al.*, 1992; Adler, S. G. *et al.*, 1996). Par contre, d'autres groupes de chercheurs n'ont pas réussi à le démontrer (Alpers, C. E. *et al.*, 1992; Adler, S. G. *et al.*, 1996). Il est possible que d'autres facteurs (hérédité, autres virus, environnement, traitements ou toxines) contribuent au développement de toutes les lésions de l'HIVAN (Adler, S. G. *et al.*, 1996). Deux autres groupes de chercheurs ont démontré, avec des modèles de souris transgéniques, que la perte cellulaire de l'épithélium tubulaire est produite par apoptose et cette apoptose est associée à l'expression du transgène (génome VIH avec les gènes gag et pol supprimés, sous le contrôle transcriptionnel de LTR), mais n'est pas associée aux effets de l'environnement (cytokines) du rein (Bruggeman, L. A. *et al.*, 1997), et que certains gènes du VIH (Nef, Tat et Vpr) en l'absence de réplication virale, sont capables d'induire l'HIVAN (Ross, M. J. *et al.*, 2002).

Plusieurs cytokines tels: l'IL-1, l'IL-6, l'interféron- γ , le bFGF (basic fibroblast growth factor), le TGF- β (transforming growth factor β), le TNF- α et le TNF- β (tumor necrosis factor α et β) sont libérées par les lymphocytes infectés par le VIH-1 et sont présentes à des niveaux systémiques très élevés (Fauci, A. S. *et al.*, 1996; Bruggeman, L. A. *et al.*, 1997).

Finalement, les liens entre l'infection par le VIH et les lésions rénales dans l'HIVAN ont été mis récemment en évidence : il a été démontré que durant l'infection des podocytes par le VIH, il y a une production de protéines virales (Nef, Tat et Rev) qui entraîneraient une dédifférenciation podocytaire, caractérisée par une perte de pédicelles et des diaphragmes de fente, ces altérations morphologiques étant associées à la protéinurie (Ross, M. J. *et al.*, 2002; Kimmel, P. L. *et al.*, 2003). De plus, les podocytes infectés arrêtent la production de podocalyxine qui est nécessaire pour la production du collagène du type IV de la matrice mésangiale, entraînant une production du collagène immature qui change la conformation spatiale normale de la matrice mésangiale et entraîne le collapsus glomérulaire observé dans l'HIVAN (Kimmel, P. L. *et al.*, 2003).

I.v.v. Pathologie du système nerveux central liée au VIH

Après la détérioration du système immunitaire par le VIH, le système nerveux central constitue la deuxième cible de l'infection (Gray, F., Mallat, M., 1996; Sacktor, N., 2002). Des études cliniques ont démontré que la moitié des patients développent des troubles neurologiques précurseurs qui sont, dans 10% des cas, la principale cause de perte d'autonomie et de mortalité (McArtur, J., 1987; Gray, F., Mallat, M., 1996; Sacktor, N., 2002). Dans 80 à 100% des cas, les patients infectés au VIH présentent des lésions du système nerveux central (Gray, F. *et al.*, 1991; Gray, F., Mallat, M., 1996; Sacktor, N., 2002). Les lésions associées à l'infection productive constituent l'encéphalite au sens large; ce sont: l'encéphalomyélite, la myélite et la leucoencéphalite du VIH. Quant aux lésions résultantes de l'inconstance de

l'infection productive, elles concernent: la polyodystrophie diffuse, la myélopathie vacuolaire et la leucoencéphalopathie vacuolaire (Gray, F., Mallat, M., 1996). Les mécanismes étiopathologiques responsables de ces lésions demeurent mal compris (Budka, H., 1993; Gray, F., Mallat, M., 1996; Pomerantz, R. J., 2004). Parmi les hypothèses envisagées, il y a: la neurotoxicité de certaines protéines d'expression virale comme la gp120, Tat, Nef et Vpr ; la production de neurotoxines de médiateurs de l'inflammation, de cytokines pro-inflammatoires, de radicaux libres par les monocytes infectés et les astrocytes; la neurovirulence de certaines variantes du VIH, l'activation des récepteurs neuronaux glutamatergiques NMDA, l'apoptose neuronale, l'altération de la barrière hémato-encéphalique par les cytokines circulantes et un choc oxydatif responsable du dysfonctionnement neuronal proposé comme une possible convergence de ces facteurs vers une voie commune (Mollace, V. *et al.*, 2001; Power, C. *et al.*, 2002; Pomerantz, R. J., 2004; Wallace, D. R., 2006). Les lésions surviennent généralement au stade avancé du Sida ou, dans certains cas, au stade précoce de l'infection (Gray, F., Mallat, M., 1996). Les cibles privilégiées de l'infection productive dans le système nerveux central sont les macrophages et les cellules microgliales provenant de la moelle osseuse (Gray, F., Mallat, M., 1996; Power, C. *et al.*, 2002; Lambotte, O. *et al.*, 2003). Le système nerveux central lésé présente des cellules géantes multinucléées (Sharer, L. R. *et al.*, 1985; Gray, F., Mallat, M., 1996). Des troubles cognitifs sévères peuvent apparaître sans qu'il y ait forcément une lésion de la substance blanche (Gray, F. *et al.*, 1991; Gray, F., Mallat, M., 1996).

L'encéphalite du VIH au sens large, survient dans la substance blanche, le tronc cérébral et les noyaux gris centraux. L'encéphalite proprement dite du VIH (l'encéphalomyélite et la myélite) se caractérise par la présence de cellules microgliales, de macrophages, de cellules géantes multinucléées, d'une infiltration lymphocytaire, d'une démyélinisation, d'une gliose réactionnelle et d'une nécrose dans le parenchyme; les neurones et axones sont préservés dans la lésion (Gray, F., Mallat, M., 1996). Cependant, une myélopathie clinique peut être observée quand il y a une lésion médullaire (Geny, C. *et al.*, 1991; Gray, F., Mallat, M., 1996). Dans certains cas d'encéphalite à VIH, les espaces leptoméningés sont atteints (méningite à

VIH). Cette méningite (distincte de la méningite lymphocytaire du stade précoce de l'infection) est caractérisée par la présence de cellules géantes multinucléées et de macrophages dans les infiltrats lymphocytaires (Gray, F., Mallat, M., 1996).

La leucoencéphalopathie du VIH est caractérisée par une substance blanche hémisphérique présentant des cellules géantes multinucléées, des macrophages, une astrocytose réactive et une perte de myéline avec très peu ou pas d'infiltration lymphocytaire (Gray, F., Mallat, M., 1996). Les lésions peuvent s'étendre aux hémisphères cérébelleux, et dans certains cas, on observe des vacuoles à l'intérieur de la myéline avec une lésion des petits vaisseaux de la substance blanche (épaississement pariétal, hypercellularité, gonflement et polymorphisme des cellules endothéliales). Cette lésion vasculaire est associée à de petits foyers angiocentriques de pâleur myélinique et à des cellules géantes multinucléées exprimant les protéines virales et contenant des pigments ferriques rappelant l'ouverture des barrières hémato-encéphaliques ayant contribué aux lésions dans les axones et la myéline. (Smith, T. W. *et al.*, 1990; Gray, F., Mallat, M., 1996).

La poliodystrophie diffuse se caractérise par une gliose astrocytaire réactionnelle, une prolifération microgliale dans la substance grise (Budka, H. *et al.*, 1987; Gray, F., Mallat, M. 1996), une perte neuronale, une atrophie cérébrale, des anomalies dendritiques et une baisse de la densité des synapses dans le cortex cérébral (Masliah, E. *et al.*, 1992; Gray, F., Mallat, M., 1996). La mort cellulaire programmée, ou apoptose des neurones, peut survenir aussi bien chez l'enfant que chez l'adulte infecté au VIH (Gelbard, H. A. *et al.*, 1995; Gray, F., Mallat, M., 1996). Il est probable que l'apoptose (condensation de la chromatine du noyau, fragmentation et désintégration du noyau et phagocytose des éléments apoptotiques) soit une des causes principales de l'atrophie cérébrale observée chez les sidéens (Ketzler, S. *et al.*, 1990; Weis, S. *et al.*, 1993; Gray, F., Mallat, M., 1996).

La myélopathie vacuolaire, quant à elle, est caractérisée par des foyers comportant des vacuoles intramyéliniques et de nombreux macrophages, (souvent à l'intérieur des vacuoles), des lésions symétriques dans les cordons postérieurs et latéraux de la moelle épinière dorsale basse et par des axones souvent intacts ou lésés dans les

foyers sévèrement touchés (Gray, F., Mallat, M., 1996). Des lésions similaires à la myélopathie vacuolaire peuvent être présentes dans l'encéphalite du VIH et dans la leucoencéphalopathie et, dans ce cas, la présence de cellules géantes multinucléées et d'antigènes du VIH est observée près des vacuoles médullaires (Schmidbauer, M. *et al.*, 1990; Maier, H. *et al.*, 1989; Gray, F., Mallat, M., 1996). Les lésions associées à la myélopathie vacuolaire peuvent être attribuées à la présence de macrophages activés sécrétant des cytokines (TNF- α) toxiques pour la myéline (Selmaj, K. W. *et al.*, 1988; Gray, F., Mallat, M., 1996). La myélopathie vacuolaire a des ressemblances avec la sclérose combinée de la moelle épinière. Les troubles métaboliques des folates et de la vitamine B12 pourraient expliquer l'aspect de sclérose observée (Keiburtz, K. D. *et al.*, 1991; Gray, F., Mallat, M., 1996).

Au stade précoce de l'infection par le VIH, les lésions du SNC, le système nerveux central présente des infiltrations mononucléées périvasculaires composées de lymphocytes T et de monocytes/macrophages, une méningite lymphocytaire et des lésions secondaires de la substance blanche (pâleur myélinique avec gliose astrocytaire), associées à la rupture de la barrière hémato-encéphalique (Gray, F. *et al.*, 1992).

Dans le cortex cérébral, il y a une activation microgliale transitoire, une absence d'astrocytose réactionnelle et une perte neuronale (Sinclair, E. *et al.*, 1994; Gray, F., Mallat, M., 1996). À ce stade précoce, aucune infection productive à VIH n'a été démontrée, mais plutôt des réactions immunopathologiques non spécifiques associées à des lymphocytes T (Persuy, P. *et al.*, 1988; Gray, F., Mallat, M., 1996).

Trois propriétés virales sont impliquées dans l'infection productrice et la dysfonction cérébrale. Il s'agit de la neuropénétrance, le neurotropisme et la neurovirulence (Seilhean, D. *et al.*, 1998). La neuropénétrance est la propriété permettant l'entrée du virus dans le système nerveux. Dès les premiers stades de l'infection, le virus semble emprunter plusieurs voies; il franchirait directement la barrière hémato-encéphalique ou infecterait les cellules endothéliales, puis passerait à travers la barrière hémato-encéphalique à l'intérieur des cellules immunitaires T infectées et activées, issues du sang périphérique (Banks, W. *et al.*, 1997; Seilhean, D. *et al.*, 1998). Des molécules

d'adhérence telles que l'ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule) et le VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) sont impliquées dans la circulation des cellules immunocompétentes dans le système nerveux central. L'hypersécrétion de TNF- α dans la substance blanche permet l'expression de ces molécules d'adhérence par les cellules endothéliales et les astrocytes dans la substance blanche profonde (Seilhean, D. *et al.*, 1998).

La propriété du neurotropisme permet au VIH d'infecter les cellules du système nerveux et, en particulier, d'assurer l'infection productive dans les macrophages et les cellules microgliales. La boucle V3 de la protéine gp120 virale intervient dans ce processus. Ces boucles V3 contribuent à l'ancrage des VIH-1-macrophage-tropiques aux récepteurs CD4 et aux co-cécepteurs (CCR3, CCR5) avant la pénétration dans la cellule (He, J. L. *et al.*, 1996; Seilhean, D. *et al.*, 1998). Quant à la neurovirulence, elle permet l'induction de la maladie neurologique et survient de façon retardée par rapport à la neuro-invasion, probablement à cause de l'émergence des mutants viraux plus neurovirulents (Mankowski, J. *et al.*, 1997; Seilhean, D. *et al.*, 1998). La neurovirulence semble être due à la participation des gènes env et nef, à un accroissement de monocytes et d'un sous-groupe de cellules NK (Mankowski, J. *et al.*, 1997; Seilhean, D. *et al.*, 1988).

Plusieurs mécanismes moléculaires induisent la mort neuronale ; parmi ces mécanismes sont les facteurs viraux. Le génome du VIH-1 code principalement pour deux protéines avérées neurotoxiques: la protéine de l'enveloppe du virus (gp120) et le transactivateur de la transcription (Tat) (Seilhean, D. *et al.*, 1998; Mollace, V. *et al.*, 2001). Le mécanisme par lequel la protéine gp120 induit la neurotoxicité a été démontré; la gp120 sous forme libre, libérée par les cellules infectées se fixe aux récepteurs de type NMDA (Maddon, P. J. *et al.*, 1986; Dreyer, E. *et al.*, 1990; Gray, F., Mallat, M., 1996; Seilhean, D. *et al.*, 1998). La gp120 peut franchir la barrière hémato-encéphalique par endocytose (Banks, W. *et al.*, 1997; Seilhean, D. *et al.*, 1998). La gp120 jouerait un rôle dans la toxicité neuronale quand elle est associée à des macrophages d'origine cérébrale (Lipton, S. A., 1992, Gray, F., Mallat, M., 1996). Les lésions causées par la gp120 chez un modèle de souris transgéniques, rappellent la polydystrophie diffuse chez les patients et se caractérisent par une perte

neuronale du cortex, une réduction des connections synaptiques, une dystrophie dendritique et une altération de la morphologie neuronale (Toggas, S. M. *et al.*, 1994; Gray, F., Mallat, M., 1996; Kaul, M. *et al.*, 2005). Chez les rats immatures, l'injection intracérébrale de la gp120 induit un déficit des fonctions motrices et, chez les rats adultes, un déficit cognitif (Glowa, J. R. *et al.*, 1992; Hill, J. M. *et al.*, 1993; Gray, F., Mallat, M., 1996).

La neurotoxicité de la gp120, étudiée sur des cultures primaires de cerveaux de rongeurs, a démontré que la protéine gp120, à faible dose, n'agissait pas sur les récepteurs NMDA mais induisait surtout une augmentation des effets du glutamate endogène libéré en culture par les interactions entre neurones, astrocytes et cellules microgliales. En plus, la gp120 induit une augmentation du taux de Ca^{++} dans le cytosol de neurones due au blocage des canaux membranaires calciques de type L. Cette augmentation favorise la destruction neuronale (Lipton, S. A. *et al.*, 1991; Gray, F., Mallat, M., 1996). La gp120 stimulerait les macrophages à libérer des radicaux libres oxygénés, des agonistes glutamatergiques et de l'acide arachidonique, et ceux-ci induiraient la dégénérescence neuronale (Lipton, S. A., 1994; Gray, F., Mallat, M., 1996). Également, la gp120 pourrait inhiber, chez les astrocytes, la production des facteurs de croissance neuronaux (Brenneman, D. *et al.*, 1988; Gray, F., Mallat, M., 1996).

Les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionic acid) fixent le glutamate, tout comme les récepteurs NMDA et leur stimulation pourrait aussi induire la mort neuronale par apoptose (Larm, J. *et al.*, 1997; Seilhean, D. *et al.*, 1998). Par contre, le récepteur du peptide vasoactif intestinal (partageant une homologie de séquence avec le site de fixation de la gp120 du VIH-1) prévient surtout la neurotoxicité de la protéine gp120 (Brenneman, D. *et al.*, 1988; Seilhean, D. *et al.*, 1998). D'autres molécules agissant sur les récepteurs NMDA, ont un effet neurotoxique; il s'agit de l'acide arachidonique, des prostaglandines, des thromboxanes et des leucotriènes, lesquelles sont produites par les cellules microgliales infectées ou activées (Lipton, S. *et al.*, 1994; Seilhean, D. *et al.*, 1998). Également, l'acide quinolinique, sécrété par les macrophages et la microglie activés dans le système nerveux central, est libéré dans le sang périphérique et peut franchir

la barrière hémato-encéphalique. Il cause des troubles neuronaux (Heyes, M. *et al.*, 1996; Seilhean, D. *et al.*, 1998).

Dans le système nerveux central, les macrophages, les astrocytes et les cellules microgliales, sous activation immunitaire, sécrètent le monoxyde d'azote et ses dérivés (Bukrinsky, M. *et al.*, 1995; Seilhean, D. *et al.*, 1998). Le monoxyde d'azote (NO) réagit avec les ions superoxydes O_2^- et contribue à la formation de radicaux neurotoxiques tels que les hydroxydes OH^- (Bukrinsky, M. *et al.*, 1995; Gray, F., Mallat, M., 1996).

D'autres expériences *in vitro* montrent que le contact entre monocytes infectés et astrocytes stimule la production d'IL1- β , de TNF- α , de l'acide arachidonique, du PAF (Platelet activating factor) et des leucotriènes. Les TNF- α et l'IL-1- β n'altèrent pas directement les neurones mais, par contre, le PAF, en se liant aux récepteurs NMDA, induit la mort neuronale. Ces expériences ont permis de faire un lien entre les signes cliniques neurologiques et l'accroissement du PAF dans le liquide céphalo-rachidien des patients sidéens (Gelbard, H. A., *et al.*, 1994; Gray, F., Mallat, M., 1996).

Également, la protéine Tat libérée dans le milieu extra cellulaire par les cellules infectées (cellules lymphoïdes, cellules microgliales et astrocytes), provoque une dépolarisation neuronale (Sabatier, J. *et al.*, 1991; Gray, F., Mallat, M., 1996; Nath, A., 2002), des convulsions, une paralysie spastique létale et enfin une gliose astrocytaire et une microglie menant à la mort neuronale (Hayman, M. *et al.*, 1993; Gray, F., Mallat, M., 1996).

La protéine Tat par l'intermédiaire du récepteur de la ryanodine (RyR) cause une perte rapide du calcium du réticulum endoplasmique (RE); cette perte de calcium active la voie de signalisation de la réponse de protéines dépliées (UPR) entraînant une dilatation pathologique du RE (Murakami, T. *et al.*, 2007; Norman, J. P. *et al.*, 2008) et une hyperpolarisation mitochondriale dans des neurones corticaux, compromettant la capacité du neurone de tamponner le calcium et de soutenir la production énergétique nécessaire pour la communication synaptique normale des neurones vulnérables (Norman, J. P., *et al.*, 2007; Norman, J. P. *et al.*, 2008). Si la

voie d'UPR demeure active, la protéine pro-apoptotique CHOP (protéine homologue du C/EBP) est hyperrégulée et la cellule subit l'apoptose (Norman, J. P. *et al.*, 2007). Ces données suggèrent que la signalisation anormale du récepteur RyR régule l'UPR neuronal qui entraîne l'arrêt du métabolisme énergétique de la mitochondrie, lieu critique pour la neuropathogénèse induite par le VIH-1 (Norman, J. P. *et al.*, 2008).

Un certain nombre de cytokines ont été associées à l'apparition de la démence liée au VIH. Ces cytokines sont: le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α), l'IL-1, l'IL-6, le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) et le TGF- β (transforming growth factor- β). Ces molécules sont produites par les cellules gliales (Molina, J. *et al.*, 1989; Lafortune, L. *et al.*, 1996; Seilhean, D. *et al.*, 1998). Le TNF- α et l'IL-1 sont toxiques pour les oligodendrocytes (Selmaj, K. W. et Raine, C., 1988; Seilhean, D. *et al.*, 1998). La surexpression du TNF- α est associée à la détérioration cognitive (Seilhean, D. *et al.*, 1997; Seilhean, D. *et al.*, 1998). La démence liée au VIH n'est pas une pathologie du neurone pris isolément mais un dysfonctionnement de tout le réseau neuronal dans lequel figurent les cellules microgliales et astrocytaires (Seilhean, D. *et al.*, 1998).

I.v.vi. Pathologies associées

I.v.vi.i. Lymphomes associés au VIH

Au cours du syndrome d'immunodéficience acquise, l'incidence de lymphomes malins non Hodgkiniens est en augmentation. Ces lymphomes représentent le cancer le plus fréquent chez les sidéens (Beral, V. *et al.*, 1991; Levine, A. M., 1993; Gaidano, G., Carbone, A. 1995). Ces lymphomes sont très envahissants et sont constitués de cellules d'origine B qui ont tendance à proliférer de façon diffuse et en dehors des structures lymphatiques (Levine, A. M., 1993).

Les tumeurs non Hodgkiniennes les plus fréquemment associées au Sida sont:

°Lymphome à petites cellules (small noncleaved-cell lymphoma (SNCCL)).

°Lymphome diffus à grandes cellules (diffuse large-cell lymphoma (DLCL)).

°Lymphome anaplasique à grandes cellules (anaplastic large-cell lymphoma (ALCL)).

°Lymphomes des cavités (body-cavity-based lymphoma (BCCL)) (seulement 3% des LNH associés au Sida) (Gaidano, G. *et al.*, 1997).

Selon le National Cancer Institute (working formulation), la majorité des lymphomes (90%) associés au Sida seraient classés à l'intérieur des trois groupes suivants :

- 1) Lymphome à petites cellules non clivées (small non-cleaved cell lymphoma (SNC)).
- 2) Lymphome à grandes cellules immunoblastiques (large cell immunoblastic lymphoma (IBL)).
- 3) Lymphome à grandes cellules (large cell lymphoma (LCL)).

La majorité des patients développent des lymphomes à grandes cellules immunoblastiques (IBL) qui correspondent aussi aux lymphomes diffus à grandes cellules de la première classification (DLCL). Seulement 30% des patients présentent des lymphomes à petites cellules non clivées (Freter, C. E., 1990).

Dans le premier type de lymphome (SNCCL ou SNC), on retrouve le lymphome de Burkitt (BL) et le lymphome de Burkitt-like à haut grade (BLL) (Gaidano, G. *et al.*, 1997). La différence morphologique entre ces deux tumeurs demeure controversée.

I.v.vi.ii. Physiopathologie des lymphomes

L'étiopathogénie des lymphomes associés à l'infection au VIH est multifactorielle. La stimulation de la prolifération cellulaire B, soit directement par le VIH ou soit par des cytokines sécrétées lors de cette infection et/ou par l'Epstein-Barr virus (EBV) dans un contexte d'immuno-suppression, crée vraisemblablement les conditions favorables à l'apparition d'anomalies génétiques (mutations d'oncogènes et/ou de gènes suppresseurs de tumeurs). L'activation de certains oncogènes comme c-myc,

le plus souvent associée à une translocation impliquant les gènes des immunoglobulines, peut favoriser la sélection clonale et le développement de lymphomes. L'implication de ces différents mécanismes est variable en fonction du type histologique et de l'importance du déficit immunitaire (Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996; Lim, S. T., Levine, A. M. *et al.*, 2005).

I.v.vi.iii. Rôle du VIH et des cytokines dans les lymphomes

Le VIH peut induire directement ou indirectement une stimulation chronique des cellules B par l'induction de la production de certaines cytokines et par un déficit immunitaire qui favorise les proliférations lymphoïdes associées à l'EBV.

La gp160, stimule *in vitro* la prolifération des cellules B, la production d'Ig et de cytokines (telles que l'IL-6), induit l'expression du récepteur pour l'IL6 (l'IL6R) et pour la molécule CD23 à la surface des cellules B (Chirmule, N. *et al.*, 1993; Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996).

Le VIH stimule de manière directe la production de l'IL-6 par les monocytes/macrophages (Pluda, J. *et al.*, 1993; Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996).

L'IL-6 stimule la prolifération et la différenciation des lymphocytes B normaux et ceux infectés par l'EBV. L'IL-6 est exprimée dans tous les cas de lymphomes liés au VIH et lymphomes non Hodgkiniens du type non Burkitt (à grandes cellules et immunoblastiques avec différenciation plasmocytaire) et joue un rôle important dans les hémopathies lymphoplasmocytaires comme la maladie de Castleman (Emilie, D. *et al.*, 1992a; Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996; Duff, D. K. *et al.*, 2000). L'IL-6 est produite au sein des tumeurs par les macrophages/monocytes et les cellules endothéliales et joue un rôle paracrine dans la prolifération tumorale. Les cellules tumorales démontrent une augmentation de récepteurs pour l'interleukine 6 (IL-6R). Aucune corrélation entre l'expression de l'IL-6 et la présence de l'EBV n'a encore été démontrée (Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996).

L'IL-10, produite par les lymphocytes T, induit la prolifération et la différenciation des lymphocytes B normaux et inhibe l'activation des macrophages et la synthèse

d'interféron- γ par les lymphocytes T. Il existe une forte homologie entre le gène de l'IL-10 humain et le gène BCRF1 de l'EBV. Il a été démontré que l'IL-10 est produite par les cellules tumorales (Emilie, D. *et al.*, 1992b; Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996). En plus, il existerait une forte corrélation entre la production de l'IL-10 et la présence de l'EBV (Benjamin, D. *et al.*, 1992; Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996).

L'IL-13 serait également impliquée dans la prolifération et la différenciation des cellules B activées. L'ARNm de cette lymphokine a en effet été détecté dans les lymphomes associés au VIH. Les cellules tumorales n'expriment pas le récepteur de l'IL-13 et donc un rôle direct dans la prolifération tumorale est improbable (Fior, R. *et al.*, 1994; Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996).

L'élévation sérique de la molécule CD23 soluble a été détectée chez des patients sidéens ayant développé un lymphome (Yawetz, S. *et al.*, 1995; Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996). Cette molécule est exprimée par les cellules B matures activées et elle induit la prolifération cellulaire *in vitro* (Yawetz, S. *et al.*, 1995; Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996).

Par contre, l'IFN- γ et l'IL12 mesurées par l'expression de leur ARN par rtPCR quantitative dans des lymphomes associés au VIH, ont montré une expression diminuée (Duff, D. K. *et al.*, 2000). Cette diminution de production est impliquée dans le contrôle *in situ* des tumeurs (NHL). L'IFN- γ a des effets antiprolifératifs puissants et participe dans la réponse immunitaire cytotoxique. L'IL-12 favorise l'expression de l'IFN- γ , et a également des effets directs sur la fonction cytolitique (Emilie, D. *et al.*, 1994).

l.v.vi.iv. Rôle de l'EBV dans les lymphomes

L'EBV apparaît avec une fréquence très élevée dans les proliférations lymphoïdes malignes associées au Sida. Ce virus induit une atteinte ganglionnaire bénigne spontanément résolutive appelée "mononucléose infectieuse" (Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996). L'EBV infecte les cellules B par l'intermédiaire du récepteur CD21. Son génome viral, lorsqu'intériorisé, induit une cascade d'événements comportant

l'activation de la cellule infectée et la synthèse de protéines virales ayant des capacités transformantes (Klein, G., 1994; Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996). Les cellules activées expriment le CD23, l'IL-6 et l'IL-10 (Klein, G., 1994; Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996). Les cellules infectées sont détruites par les lymphocytes T cytotoxiques. Cette réponse ne permet cependant pas d'éliminer complètement le virus du système hématopoïétique et l'EBV peut persister dans les cellules B et les cellules oropharyngées en permanence. En l'absence d'expression des autres protéines virales (Epstein-Barr Nuclear Antigen EBNA2 à EBNA6), dont certaines ont des propriétés transformantes, les cellules infectées par l'EBV n'ont aucune tendance à proliférer ou à se transformer en absence d'événements génétiques supplémentaires tels que la translocation de l'oncogène c-myc sur le gène codant pour les immunoglobulines. Les cellules B au repos, mais infectées, peuvent être stimulées par un antigène, entraînant ainsi l'expression des protéines EBNA2 à EBNA6 et LMP-1 (Latent Membrane Protein-1) (Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996). Les protéines virales EBNA2 et LMP-1 jouent un rôle majeur dans le pouvoir de transformation et d'immortalisation du virus. L'EBNA2 induit, entre autre, l'expression des molécules CD21 et CD23 à la surface des lymphocytes B et transactive le gène codant pour LMP. Ce dernier induirait à son tour l'expression du proto-oncogène cellulaire bcl-2 (protecteur contre l'apoptose). Un autre gène viral, le BCRF1 exprimant la vIL-10, diminuerait certaines réponses immunitaires antivirales ainsi que l'expression du CMH-II et stimulerait la prolifération et la différenciation des lymphocytes B (Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996).

I.v.vi.v. Rôle de c-myc, p53 et bcl-6 dans les lymphomes

L'analyse moléculaire des lymphomes associés au Sida révèle de nombreuses anomalies génétiques (Ballerini, P. *et al.*, 1993; Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996).

Des études génétiques de ces lymphomes (BL, IBL, LCL) ont en effet démontré que 42% d'entre eux contiennent l'EBV et présentent des réarrangements de bcl-6 (14%),

de c-myc (79%), de p53 (37%) et de ras (15%) (Knowles, D. M., Dalla-Favera, R., 1994; Knowles, D. M., 1997).

Dans les lymphomes de Burkitt (BL), presque 100 % de cas présentent un réarrangement du gène c-myc, 63% contiennent une mutation ou une délétion du gène p53, et 19% une mutation du gène ras. De plus, 31% contiennent l'EBV mais, apparemment, aucun ne démontre de réarrangements du gène bcl-6 (Knowles, D. M., Dalla-Favera, R., 1994; Knowles, D. M., 1997).

Dans le cas des lymphomes à grandes cellules immunoblastiques (IBL), 100% démontrent la présence d'EBV, 25% présentent un réarrangement de c-myc, 19% un réarrangement de bcl-6, 20% de ras et seulement un faible pourcentage démontre des mutations du gène p53 (Knowles, D. M., Dalla-Favera, R., 1994; Knowles, D. M., 1997).

Dans le cas des lymphomes à grandes cellules (LCL), 25 % démontrent la présence d'EBV, 25% présentent un réarrangement de bcl-6 et 50% un réarrangement de c-myc sur le chromosome 8, mais aucun réarrangement de ras ou p53 (Knowles, D. M., Dalla-Favera, R., 1994; Knowles, D. M., 1997).

Dans les LNH associés au Sida, on observe des mutations dans la région du deuxième exon de c-myc. Cette région interagit avec la protéine p107 qui régularise la fonction de c-myc en l'inhibant. Une mutation dans cet exon empêche la p107 d'exercer son effet inhibiteur (Shibata, D., 1994).

Les mutations du gène p53 (suppresseur de tumeur) causent habituellement le dysfonctionnement de cette protéine (Shibata, D., 1994). Une des fonctions de la p53 est de maintenir l'intégrité de l'ADN durant sa réplication (Shibata, D., 1994; Hesketh, R., 1995). En effet, lorsque l'ADN est endommagé, p53 arrête la synthèse de certaines protéines et maintient la cellule au stade de repos (G0). Ceci a pour but de donner le temps aux endonucléases d'effectuer la réparation du génome. Si cette réparation est incomplète ou inexistante, la p53 peut induire une cascade conduisant à la mort cellulaire par apoptose. Quand la p53 est défectueuse, la cellule accumule des mutations et des erreurs chromosomiques qui peuvent la transformer en cellule tumorale (Shibata, D., 1994; Hesketh, R., 1995). La mutation de la p53 se présente

principalement dans les lymphomes de type Burkitt associés au Sida, mais pas dans les lymphomes LCL ou IBL (Knowles, D. M., 1997). Une perte de fonction de cette protéine pourrait aussi être causée par la protéine EBNA5 de l'EBV (Shibata, D., 1994; Hesketh, R., 1995).

Des mutations du gène *bcl-6* ont été observées dans 20% des lymphomes à grandes cellules immunoblastiques (IBL) et dans 40% des LNH non associés au Sida (Gaidano, G. *et al.*, 1994; Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996). D'autres études ont aussi démontré des réarrangements du gène *bcl-6* dans les lymphomes NHL comme le lymphome à cellules B de la zone marginale (MZBCL) (9%) (Dierlamm, J. *et al.*, 1997), le lymphome diffus à grandes cellules (DLCL) (30-40%) et dans le lymphome à cellules centre-folliculaires (Shibata, D., 1994). Ces altérations ne sont pas présentes dans la maladie de Hodgkin associée au Sida ni dans l'hyperplasie lymphoïde associée au HIV (Shibata, D., 1994).

Un autre type de lymphome non Hodgkinien, associé au Sida mais peu fréquent, est le lymphome des cavités nommé "body cavity based lymphoma" (BCCL). Cette tumeur est caractérisée par une prolifération limitée aux cavités pleurale, péricardique et abdominale, en l'absence de masses tumorales, mais se présentant plutôt comme une suffusion lymphomateuse (Knowles, D. M. *et al.*, 1989; Knowles, D. M., 1997). Ces lymphomes sont constitués de lymphocytes B et ne présentent pas de translocation de *c-myc*, *bcl-2*, *bcl-6*, *ras* ou *p53* (Knowles, D. M. *et al.*, 1994; Knowles, D. M., 1997). Tous ces lymphomes contiennent la séquence KS330Bam et l'EBV. Cette séquence n'a pas été retrouvée dans les lymphomes non-Hodgkiniens associés ou non au Sida (Cesarman, E. *et al.*, 1995; Knowles, D. M., 1997). La séquence KS330Bam est une partie du nouveau herpesvirus-8 et est présente dans tous les cas de sarcome de Kaposi (Albrecht, J. C. *et al.*, 1992; Knowles, D. M., 1997; Staskus, K. A. *et al.*, 1999; Soulier, J. *et al.*, 1995) et dans la maladie de Castleman multicentrique (Cesarman, E. *et al.*, 1995; Soulier, J. *et al.*, 1995; Larroche, C. *et al.*, 1996; Nicholas, J. *et al.*, 1997; Mylona, E. E. *et al.*, 2008). L'association très fréquente entre l'herpesvirus-8 et les lymphomes associés au Sida, suggère que ce virus pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse du sarcome de Kaposi et dans les lymphomes des cavités (Knowles, D. M., 1997). Le virus

herpes-8 peut avoir un rôle dans la transformation lymphoïde en développant ces types de lymphomes (Knowles, D. M., 1997).

I.v.vi.vi. Sarcome de Kaposi

Le sarcome de Kaposi est le cancer le plus couramment associé au Sida, même si l'incidence du sarcome de Kaposi a diminué depuis l'introduction de HAART (Vanni, T. *et al.*, 2006). Ce sarcome est un groupe de néoplasies hétérogènes qui se divise en 5 types: classique (ou sporadique), endémique (ou Africain), associé aux transplantations (ou iatrogénique), épidémique (ou associé au Sida) et associé à la reconstitution immunitaire sous traitement antiviral (IRIS) (Sangüeza, O. P., Requena, L., 2003; Schöfer, H., Sachs, D. L., 2007). Tous ces types du sarcome de Kaposi sont causés par l'herpèsvirus-8 humain (HHV-8) chez les sujets avec ou sans sida (Staskus, K. A. *et al.*, 1999; Soulier, J. *et al.*, 1995). Ce virus peut être transmis par différentes voies: sexuellement, par le sang et par la salive (Vieira, J. *et al.*, 1997; Pauk, J. *et al.*, 2000; Cannon, M. *et al.*, 2001; Martró, E. *et al.*, 2007).

Le type classique du sarcome de Kaposi se présente, chez les personnes âgées d'origine méditerranéenne, comme une prolifération vasculaire lente cutanée. Chez les patients sidéens, la prolifération vasculaire cutanée se présente d'une façon beaucoup plus agressive et s'accompagne d'une atteinte des muqueuses et des viscères (Lévy, Y., Dubreuli-Lemaire, M., 1996; Hengge, U. R. *et al.*, 2002). Ce sarcome peut se développer chez les sujets immunodéprimés traités avec des immunosuppresseurs (type iatrogénique).

Le type endémique (Africain) se divise en deux sous-types. Le premier sous type se présente localement dans la peau avec beaucoup d'œdème. La population affectée comporte des hommes et des femmes âgés entre 25 à 50 ans (James, W. D. *et al.*, 2005). Le deuxième sous-type affecte principalement les enfants Bantus âgés de moins de 10 ans. Sa présentation clinique est une lymphadénopathie généralisée plus marquée dans la région cervicale (James, W. D. *et al.*, 2005). Dans ce sous-type, il y

a de fortes indications que la transmission du virus est de la mère à l'enfant et entre les frères et sœurs (Plancoulaine, S. *et al.*, 2000), ce qui pourrait expliquer l'augmentation rapide de la séroprévalence chez les enfants âgés de plus de deux ans (Mayama, S. *et al.*, 1998).

Le sarcome de Kaposi associé à l'IRIS a été décrit depuis 2005 ; il présente un comportement agressif et peut se développer dans les trois premiers mois de la reconstitution immunitaire (Bower, M. *et al.*, 2005; Leidner, R. S., Aboulafia, D., 2005). La thérapie antirétrovirale fortement active (HAART) avec augmentation du nombre de lymphocytes CD4 et une diminution de la charge virale du VIH, est requise pour son développement (Bower, M. *et al.*, 2005; Leidner, R. S., Aboulafia, D. M., 2005).

Ces cinq formes de présentation clinique ont le même aspect histopathologique, caractérisé par une prolifération de cellules fusiformes, une angiogenèse importante, une infiltration par des cellules inflammatoires et de l'œdème, (Lévy, Y., Dubreuli-Lemaire, M., 1996; Grayson, W., Pantanowitz, L., 2008). Ces cellules fusiformes présentent un phénotype de cellules endothéliales et expriment les molécules d'adhésion ICAM-1, VCAM-1 et ELAM-1 *in vitro* (Fiorelli, V. *et al.*, 1995; Lévy, Y., Dubreuli-Lemaire, M., 1996).

L'herpesvirus-8 humain (HHV-8) est impliqué dans d'autres lésions associées au Sida comme les lymphomes des cavités "primary effusion lymphoma" (PEL) et la maladie de Castleman multicentrique (MCD). Ces deux maladies sont observées chez les patients atteints du sarcome de Kaposi (Kesler, E., Beer, R., 1983; Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996; Staskus, K. A. *et al.*, 1999). Le HHV-8 a été démontré dans les monocytes du sang périphérique et ces monocytes infectés peuvent être recrutés dans les tissus par certaines cytokines comme la MCP-1, qui est exprimée de façon abondante dans les lésions sarcomateuses (Sciacca, F. L. *et al.*, 1994; Blasig, C. *et al.*, 1997). D'autres études ont démontré l'expression de plusieurs gènes viraux du HHV-8 principalement dans les cellules d'origine B (Nicholas, J. *et al.*, 1997; Sarid, R. *et al.*, 1997; Staskus, K. A. *et al.*, 1999; Paulose-Murphy, M. *et al.*, 2001). La plupart de ces gènes sont homologues aux oncogènes cellulaires; donc le virus peut modifier le cycle cellulaire, inhiber l'apoptose, échapper aux mécanismes immunitaires et

induire l'angiogenèse (Nicholas, J. *et al.*, 1997; Sarid, R. *et al.*, 1997; Paulose-Murphy, M. *et al.*, 2001).

Le virus code pour au moins 87 protéines dont, entre autres, un homologue d'IL-6, un analogue à Bcl-2 ou vFLIP, des chémokines et un récepteur à chémokines (Nicholas, J. *et al.*, 1997; Sarid, R. *et al.*, 1997; Paulose-Murphy, M. *et al.*, 2001). La protéine vIL-6 est homologue à l'IL-6 et la vMIP-1 est homologue de la protéine d'inflammation des macrophages (MIP-1) (Nicholas, J. *et al.*, 1997; Paulose-Murphy, M. *et al.*, 2001). La présence de cet homologue fonctionnel d'IL-6 peut être un mécanisme de pathogenèse du HHV-8 dans le sarcome de Kaposi, la maladie de Castleman et les lymphomes des cavités (PEL). Les effets mitogéniques de la vIL-6, ajoutées aux effets chimiotactiques de la protéine vMIP-1, peuvent augmenter le recrutement de cellules infectées et de cellules productrices de cytokines dans les tissus affectés (Nicholas, J. *et al.*, 1997; Paulose-Murphy, M. *et al.*, 2001). La protéine virale homologue du Bcl-2 a un rôle antiapoptotique dans les cellules infectées (Sarid, R. *et al.*, 1997; Paulose-Murphy, M. *et al.*, 2001).

I.v.vi.vii. Maladie de Castleman

La maladie de Castleman, aussi connue sous le nom d'hyperplasie angiofolliculaire, consiste en une prolifération lymphoïde dont la cause demeure inconnue. Deux formes principales de cette maladie ont été identifiées; la forme localisée et la forme multicentrique (Larroche, C. *et al.*, 1996; Waterston, A., Bower, M., 2004).

La maladie de Castleman localisée atteint les jeunes adultes, sans distinction de sexe ou race et, dans 70% des cas, touche des sujets de moins de 30 ans (Frizzera, G., 1988; Calmard-Oriol, P. *et al.*, 1991; Larroche, C. *et al.*, 1996). La localisation est principalement médiastinale (65-70% de cas) (Keller, A. R. *et al.*, 1972; Peterson, B. A. *et al.*, 1993; Larroche, C. *et al.*, 1996). Les signes cliniques associés sont l'anémie modérée, une hypergammaglobulinémie et une hypoalbuminémie (Keller, A. R. *et al.*, 1972; Frizzera, G., 1988; Larroche, C. *et al.*, 1996). Cette forme localisée de la

maladie a trois variantes morphologiques: la forme vasculohyaline, la forme plasmocytaire et la forme mixte (Waterston, A., Bower, M., 2004).

La forme vasculohyaline est la plus fréquente (91% des cas). Dans cette forme, les follicules sont anormaux et sont caractérisés par de petits centres germinatifs composés de cellules dendritiques folliculaires en couches concentriques ou à mailles irrégulières (Nguyen, D. T. *et al.*, 1994; Larroche, C. *et al.*, 1996). Ces centres germinatifs comportent des capillaires radiaux très hyalinisés (Keller, A. R. *et al.*, 1972; Larroche, C. *et al.*, 1996) et de rares lymphocytes T CD57 (Frizzera, G., 1988; Calmard-Oriol, P. *et al.*, 1991; Larroche, C. *et al.*, 1996). L'épaisse couronne entourant chaque centre germinatif est constituée de petits lymphocytes à disposition concentrique, rappelant le phénotype lymphocytaire du manteau (sIgM⁺, sIgD⁺, CD10⁻, CD5⁺ et CD23⁻). Quant aux espaces interfolliculaires hypervascularisés, ils comportent des vaisseaux hypertrophiés et hyalinisés, une infiltration lymphocytaire et très peu de plasmocytes (Larroche, C. *et al.*, 1996).

La forme plasmocytaire de la maladie de Castleman localisée, moins fréquente (9% des cas), est constituée de follicules de grandes tailles dont le centre germinatif est hyperplasique et dont les cellules dendritiques folliculaires ressemblent à celles du ganglion normal (Nguyen, D. T. *et al.*, 1994; Larroche, C. *et al.*, 1996). Les vaisseaux ne sont pratiquement pas hyalinisés. La zone interfolliculaire, par contre, est très riche en plasmocytes, avec un réseau organisationnel de cellules dendritiques très différent de celui observé dans la forme vasculohyaline (Martin, J. M. E. *et al.*, 1985; Larroche, C. *et al.*, 1996).

Une troisième forme de la maladie de Castleman localisée, baptisée "forme mixte" présente certaines similitudes avec les formes vasculohyalines et plasmocytaires. Dans cette situation morphologique mixte, l'histologie prédominante est celle d'une forme vasculohyalinique riche en plasmocytes, avec des centres germinatifs hyalino-vasculaires ou même, à l'occasion, de quelques centres germinatifs normaux (Larroche, C. *et al.*, 1996; Waterston, A., Bower, M., 2004).

La maladie de Castleman multicentrique peut être diagnostiquée en utilisant quatre critères:

- 1) Une histopathologie évocatrice, surtout le type plasmocytaire.
- 2) Une polyadénopathie périphérique.
- 3) Une atteinte multiviscérale.
- 4) L'exclusion d'une autre étiologie, autrement dit, la nature idiopathique (Frizzera, G., 1988; Peterson, B. A. *et al.*, 1993; Larroche, C. *et al.*, 1996).

La maladie de Castleman multicentrique a été définie dans quatre formes histopathologiques: la forme plasmocytaire, la forme floride proliférative, la forme accumulative et la forme éteinte (Frizzera, G. *et al.*, 1985; Larroche, C. *et al.*, 1996).

La forme plasmocytaire de la maladie de Castleman multicentrique est la plus fréquente (80-90% des cas). Les follicules sont composés de volumineux centres germinatifs hypervascularisés, avec déplétion centre-folliculaire. Les cellules dendritiques folliculaires sont les cellules prédominantes des centres germinatifs et sont disposées en anneaux concentriques. Les vaisseaux sanguins qui pénètrent les follicules sont hyalinisés. Les petits lymphocytes du manteau forment une couronne autour des centres germinatifs. La zone interfolliculaire est hyperplasique, avec une prolifération vasculaire, et de nombreux plasmocytes sont organisés en nids ou en plages (Frizzera, G. *et al.*, 1985; Larroche, C. *et al.*, 1996).

La forme floride proliférative est caractérisée par une augmentation du nombre de cellules endothéliales, d'immunoblastes et de plusieurs plasmocytes dans la zone interfolliculaire (Frizzera, G. *et al.*, 1985; Larroche, C. *et al.*, 1996).

La forme accumulative présente une zone interfolliculaire composée d'une accumulation très dense de plasmocytes matures et d'une absence d'immunoblastes. La vascularisation de la zone interfolliculaire est normale (Frizzera, G. *et al.*, 1985; Larroche, C. *et al.*, 1996).

Quant à la forme éteinte de la maladie de Castleman multicentrique, elle est faite de follicules vasculohyalins à petits centres germinatifs. Sa zone interfolliculaire, très fibrosée, est composée de quelques plasmocytes (Larroche, C. *et al.*, 1996). Les lymphocytes B polyclonaux prédominant dans la forme éteinte présentent les phénotypes CD19⁺, CD20⁺, CD22⁺, sIgM⁺, sIgD⁺, CD10⁻, CD23⁻ et CD5⁺, qui correspondent au phénotype des petits lymphocytes du manteau. On note aussi la

présence de quelques rares lymphocytes T folliculaires ayant un rapport CD4/CD8 normal; par ailleurs, aucun lymphocyte T CD57 n'est observé (Miller, R. T. *et al.*, 1984; Larroche, C. *et al.*, 1996).

La maladie de Castleman multicentrique affecte surtout les sujets de la sixième décennie. Ces patients présentent de la fièvre, des sueurs nocturnes, une perte de poids, de l'anorexie et des nausées. Ils peuvent développer une splénomégalie (68 % des cas), une hépatomégalie (53 % des cas), de l'œdème, des épanchements pleuraux et péricardiques et de l'ascite (50 % des cas) (Larroche, C. *et al.*, 1996). Cette maladie peut être détectée chez des patients présentant des maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, syndrome de Gougerot-Sjögren primitif et sclérodermie) (Tavoni, A. *et al.*, 1993; Tsai, C. Y. *et al.*, 1994; Larroche, C. *et al.*, 1996), des déficits immunitaires liés au VIH, un sarcome de Kaposi du type méditerranéen ou associé au VIH (Wynia, M. K. *et al.*, 1995; Larroche, C. *et al.*, 1996), des lymphoadénopathies (périphériques, abdominales et médiastinales), des lésions cutanées, des amyloses systémiques, des insuffisances surrénaliennes de même que des atteintes cardiaques, rénales, neurologiques et rhumatologiques (Larroche, C. *et al.*, 1996).

La forme la plus fréquente de la maladie de Castleman, chez les patients infectés par le VIH, est la forme multicentrique de type plasmocytaire; la médiane de survie est inférieure à 6 mois, les patients développent un sarcome de Kaposi dans 64 % de cas (Soulier, J. *et al.*, 1995; Larroche, C. *et al.*, 1996) et le virus HHV-8 a été retrouvé dans tous les cas du sarcome de Kaposi et dans 72 % de cas de la maladie de Castleman associés au VIH (Soulier, J. *et al.*, 1995; Larroche, C. *et al.*, 1996; Mylona, E. E. *et al.*, 2008).

Bien que l'étiologie de la maladie de Castleman reste indéterminée, certains auteurs considèrent que le dérèglement de la production d'IL-6 pourrait être le point de départ de la maladie, sans en préciser le facteur déclenchant (Peterson, B. A., Frizzera, G. 1993; Calmard-Oriol, P. *et al.*, 1991; Suematsu, S. *et al.*, 1989; Brandt, S. J. *et al.*, 1990; Yoshizaki, K. *et al.*, 1989; Larroche, C. *et al.*, 1996). D'autres auteurs formulent des hypothèses selon lesquelles une immunodépression préalable,

due aux virus VIH, EBV (Epstein-Barr virus) et KSHV (Herpèsvirus 8 humain), serait également le point d'origine de la maladie de Castleman multicentrique (Larroche, C. *et al.*, 1996; Mylona, E. E. *et al.*, 2008).

I.v.vi.vii.i. Pathogénèse de La maladie de Castleman

L'implication d'IL-6 dans la pathogénèse de la maladie de Castleman a été suspectée à partir de modèles animaux. Les souris transgéniques pour l'IL-6 développent un tableau associant une plasmocytose viscérale diffuse, une splénomégalie, des adénopathies généralisées, une hypergamma-globulinémie polyclonale, une augmentation des mégacaryocytes médullaires et une glomérulonéphrite mésangio-proliférative (Suematsu, S., *et al.*, 1989; Larroche, C. *et al.*, 1996). Des souris W/W^v reconstituées avec des cellules hématopoïétiques transfectées avec un vecteur rétroviral combiné avec le gène de l'IL-6 de souris, développent une hyperproduction d'IL-6 sérique et un tableau ressemblant à la maladie de Castleman multicentrique. Le transgène n'est pas retrouvé dans les plasmocytes des souris, ce qui indique plutôt une stimulation paracrine de la production et une différenciation des lymphocytes B (Brandt, S. J. *et al.*, 1990; Larroche, C. *et al.*, 1996).

Les souris KO pour le gène C/EBP- β développent une polyadénopathie, une splénomégalie, des lésions cutanées, une hypertrophie des muqueuses, une hypergammaglobulinémie polyclonale, une hyperplasie mésangiale rénale et le sang montre un taux élevé de l'IL-6. L'examen histopathologique ganglionnaire est celui d'une maladie de Castleman de type plasmocytaire. Ces ganglions démontrent une hyperplasie lymphocytaire B polyclonale (Screpanti, I. *et al.*, 1995; Larroche, C. *et al.*, 1996).

Le C/EBP- β est un facteur de transcription qui agirait en tant que régulateur négatif de la transcription du gène de l'IL-6 (Screpanti, I. *et al.*, 1995; Larroche, C. *et al.*, 1996).

Chez l'homme, de grandes quantités d'IL-6 ont été détectées dans les centres germinatifs dans deux cas de la maladie de Castleman de type plasmocytaire, alors

qu'on n'en retrouve aucun dans un ganglion normal (Yoshizaki, K. *et al.*, 1989; Larroche, C. *et al.*, 1996). Dans ces centres germinatifs, une hyper-expression du gène de l'IL-6 n'est retrouvée, par hybridation *in situ*, que dans les cellules dendritiques de la maladie de Castleman localisée de type plasmocytaire (Leger-Ravet, M. B. *et al.*, 1991; Larroche, C. *et al.*, 1996). Les patients atteints de la maladie de Castleman multicentrique développent une dysfonction de l'immunité cellulaire; une anergie à la tuberculine, une diminution de l'activité des cellules NK et une diminution de la prolifération des lymphocytes T quand ils sont exposés aux mitogènes (Ishiyama, T. *et al.*, 1994; Larroche, C. *et al.*, 1996). Le dérèglement de la production d'IL-6 est bien démontré et pourrait être considéré comme le point de départ de la maladie, mais on ignore quel en est le facteur déclenchant (Peterson, B. A., Frizzera, G. 1993; Calmard-Oriol, P. *et al.*, 1991; Suematsu, S. *et al.*, 1989; Brandt, S. J. *et al.*, 1990; Yoshizaki, K. *et al.*, 1989; Emilie, D., Galanaud, P., 1996; Larroche, C. *et al.*, 1996). Bien que la pathogénie de la maladie de Castleman ne soit pas encore bien déterminée, au moins pour la forme multicentrique associée au VIH, on pense que cette dernière est associée à la production de vIL-6 du virus HHV-8 (Mylona, E. E. *et al.*, 2008).

I.vi. Effets des glucocorticoïdes et des Lipopolysaccharides sur le fonctionnement du système immunitaire

I.vi.i. Glucocorticoïdes

On entend par glucocorticoïde tout stéroïde naturel ou synthétique capable d'agir sur le métabolisme intermédiaire des glucides, des lipides et des protides (Biola, A., Pallardy, M., 2000). Les glucocorticoïdes naturels (cortisol ou hydrocortisone) sont utilisés en thérapeutique substitutive dans les cas d'insuffisances surrénaliennes aiguës ou chroniques, alors que leurs analogues synthétiques sont utilisés comme des modulateurs très puissants des réponses immunitaires et inflammatoires (Biola, A., Pallardy, M., 2000).

La dexaméthasone appartient au groupe des glucocorticoïdes analogues synthétiques (Biola, A., Pallardy, M., 2000).

Les glucocorticoïdes et la dexaméthasone sont connus pour leurs effets apoptotiques sur les lymphocytes T et B. Ils induisent une diminution et une redistribution des lymphocytes sanguins circulants et de l'intestin (Toft, P. *et al.*, 1993; Deguchi, M. *et al.*, 1998; Norman, J. *et al.*, 2003), induisent l'apoptose des lymphocytes immatures du thymus, des lymphocytes immatures double positifs CD4⁺/CD8⁺ (McConkey, D. J. *et al.*, 1989; Deguchi, M. *et al.*, 1998), des lymphocytes CD8⁺ et NK (Migliorati, G. *et al.*, 1992; Deguchi, M. *et al.*, 1998). Après une dose intra-péritonéale de dexaméthasone chez les rats, les lymphocytes sanguins circulants diminuent très sévèrement à partir de 3 heures après le traitement et, dans le thymus, près de 40% des lymphocytes sont en apoptose 6 heures après le traitement (Deguchi, M. *et al.*, 1998).

Les glucocorticoïdes exercent leurs effets en se fixant à leur récepteur GR, qui est un membre de la superfamille des récepteurs nucléaires. Lorsque ce récepteur est activé par son ligand, il se comporte comme un facteur de transcription qui régularise

positivement ou négativement l'expression de ses gènes cible (Biola, A., Pallardy, M., 2000).

Les glucocorticoïdes traversent passivement la membrane cytoplasmique en raison de leur nature hydrophobe et se lient spécifiquement à un récepteur à localisation intracytoplasmique, le GR (Biola, A., Pallardy, M., 2000). Ce récepteur (GR) fait partie d'un complexe multiprotéique cytosolique et c'est la fixation des glucocorticoïdes sur le récepteur qui entraîne la dissociation de ce complexe et la migration du récepteur-ligand dans le noyau où il se lie à l'ADN, dans une séquence nucléotidique GRE (Glucocorticoid Responsive Element), ce qui va permettre au GR-ligand d'activer ou de réprimer la transcription de ses gènes cibles (Biola, A., Pallardy, M., 2000).

Le mécanisme des effets apoptotiques des glucocorticoïdes sur les lymphocytes n'est pas très bien connu. Des résultats suggèrent que l'effet lytique serait dû à l'induction de "gènes de mort" ou de gènes indispensables à la survie des cellules (Biola, A., Pallardy, M., 2000). D'autres recherches démontrent que l'apoptose de lymphocytes est associée à l'expression de la protéine proapoptotique Bim, une élévation du cAMP et la participation de la protéine kinase A (PKA) (Zhang, L., Insel, P. A., 2004). Également, le gène anti-apoptotique *Tnfrsf8* a été proposé comme facteur crucial pour réguler l'apoptose de thymocytes induite par les corticoïdes (Woodward, M. J. *et al.*, 2009).

I.vi.ii. Lipopolysaccharides

Les lipopolysaccharides (LPS) nommés fréquemment "endotoxines bactériennes", sont connus pour produire une réponse généralisée pro-inflammatoire chez les hôtes infectés. Les LPS sont abondants et sont un composant essentiel de la membrane externe des bactéries Gram négatives (Raetz, C. R. H. *et al.*, 1991; Qureshi, S. T. *et al.*, 1999). Les propriétés stimulatrices des LPS sont dues au lipide A, une molécule interne, bien conservée dans le domaine lipidique de la molécule "LPS". Ce lipide A

peut induire une réponse inflammatoire très grave ou fatale chez l'hôte infecté (Glauser, M. P. *et al.*, 1994; Qureshi, S. T. *et al.*, 1999).

Les LPS ne produisent pas de dommages directs dans les tissus de l'hôte mais ils les induisent par l'intermédiaire des médiateurs d'inflammation (TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6) (Dinarello, C. A., 1996; Zhang, H. *et al.*, 1997) en activant principalement les macrophages et les lymphocytes B et T. De plus, ils induisent l'apoptose des lymphocytes T circulants et des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ de la rate, des ganglions lymphatiques et du cortex thymique (Norimatsu, M. *et al.*, 1995; Castro, A. *et al.*, 1998).

La première étape de la réponse de l'hôte débute avec l'association du lipide A du LPS et d'une protéine sérique "LBP" (Lipopolysaccharide Binding Protein), produite par le foie (Tobias, P. *et al.*, 1986; Kirschning, C. J. *et al.*, 1997). La LBP amplifie la liaison du LPS avec la protéine CD14, celle-ci existant sous deux formes: une forme soluble "sCD14" et une forme membranaire "mCD14" (Wurfel, M. M. *et al.*, 1994; Qureshi, S. T. *et al.*, 1999). Les complexes LPS/sCD14 ou LPS/mCD14 induisent une activation cellulaire dont résulte une réponse inflammatoire systémique (Qureshi, S. T. *et al.*, 1999).

La signalisation interne induite par les LPS n'est pas très bien connue. Quelques composantes de la signalisation ont été démontrées récemment. Ceux-ci, le TLR-2 et le TLR-4 (Toll-like receptor) de la famille TLR (toll like family receptor proteins) sont des récepteurs de LPS qui entraînent une signalisation dépendante de la formation du complexe "LPS/LBP/CD14", ce dernier étant présenté au récepteur TLR (Kirschning, C. J. *et al.*, 1998; Paludan, S. R., 2000). Le récepteur TLR déclenche la signalisation du LPS jusqu'à l'activation du NF κ B et la transcription des gènes de la réponse immune, à travers l'activation des protéines TIR, Toll/II-1, MyD88 (Myeloid differentiation factor-88), SIIK (Serine-Threonine innate immunity kinases), TRAF-6 (Tumor necrosis factor receptor-associated factor-6), MAP kinase (Mitogen-activated protein) et I κ B kinase (Kirschning, C. J. *et al.*, 1998; Qureshi, S. T. *et al.*, 1999; Paludan, S. R., 2000). D'autres facteurs de transcription comme le

C/EBP- β , l'AP-1 et le C/EBP- δ peuvent aussi être activés par les LPS (Paludan, S. R., 2000; Slofstra, S. H. *et al.*, 2007).

Un des effets le mieux connu du LPS est la stimulation des macrophages à la production de TNF- α (Paludan, S. R., 2000). Le TNF- α a deux récepteurs: le TNF-R1 et le TNF-R2. Le TNF-R1 est exprimé dans plusieurs types cellulaires pendant que le TNF-R2 est exprimé dans les cellules myéloïdes, lymphoïdes et endothéliales (Darnay, B. G., Aggarwal, B. B. 1997; Paludan, S. R., 2000). Le TNF-R1 contient le domaine TRADD (TNF receptor-associated death domain), lequel est associé à d'autres protéines comme TRAF-2, RIF (Receptor interacting protein) et FADD (Fas-associated death domain) (Darnay, B. G., Aggarwal, B. B. 1997; Paludan, S. R., 2000). La signalisation par la voie de FADD entraîne l'apoptose avec l'activation de la caspase-8 (Darnay, B. G., Aggarwal, B. B. 1997; Paludan, S. R., 2000). La protéine TRAF-2 interagit avec NIK (NF κ B-binding kinase) qui active IK en induisant la phosphorylation et la dégradation d'I κ B; cette dégradation induit l'activation de NF κ B (May, M. J., Ghosh, S., 1998; Paludan, S. R., 2000).

Les LPS peuvent aussi réprimer de nombreux gènes qui sont exprimés constitutivement (Gao, J. J. *et al.*, 2002; Wells, C. A. *et al.*, 2003). Parmi ces gènes réprimés on trouve le CC chémokine éotaxine-2 (CCL24) et le PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor). Le CCL24 code pour une chémokine impliquée dans le recrutement d'éosinophiles et de basophiles aux sites de l'inflammation, et sa suppression peut contrôler le type de réponse inflammatoire. De même, le PPAR- γ inhibe la production de plusieurs médiateurs inflammatoires (TNF- α , IL-1, IL-6 et l'oxyde nitrique synthétase inductible (NOS)) dans les macrophages (Clark, R. B., 2002; Welch, J. S. *et al.*, 2003).

I.vii. Induction des réactions cutanées pour l'évaluation des fonctions du système immunitaire

I.vii.i. Réaction de Schwartzman

La réaction de Schwartzman est une réponse exacerbée de l'hôte *in vivo*, envers les microbes, par laquelle l'organisme essaie de limiter la dissémination et d'éliminer des microbes (Abbas, A. K. *et al.*, 2010b). Cette réaction peut être induite de façon expérimentale, chez les animaux, suite à deux injections consécutives de LPS à 24 heures d'intervalle. La première injection (sous-cutanée) est appelée "sensibilisante" ou "de préparation" et la deuxième (intraveineuse ou intrapéritonéale) est appelée "provocante" (Movat, H. Z. *et al.*, 1985; Koide, N. *et al.*, 1999; Slofstra, S. H. *et al.*, 2006).

La réaction de Schwartzman est caractérisée par une occlusion vasculaire, une hémorragie, une accumulation périvasculaire de leucocytes et de la nécrose tissulaire (Movat, H. Z. *et al.*, 1985; Koide, N. *et al.*, 1999; Slofstra, S. H. *et al.*, 2006; Abbas, A. K. *et al.*, 2010b). La réaction de Schwartzman se présente sous deux formes: la forme généralisée et la forme locale (Abbas, A. K. *et al.*, 2010b). Dans la réaction généralisée, les lésions sont causées par un dommage systémique des cellules endothéliales (Movat, H. Z., Burrowes, C. E., 1985; Koide, N. *et al.*, 1999; Slofstra, S. H. *et al.*, 2006; Abbas, A. K. *et al.*, 2010b). Quelques études suggèrent que les dommages endothéliaux sont causés par l'apoptose et que l'IFN- γ et les molécules d'adhésion pourraient être impliquées dans la mort cellulaire (Koide, N. *et al.*, 1997; Koide, N. *et al.*, 1999).

Dans la réaction locale, la deuxième injection cause la nécrose hémorragique de la peau exclusivement au site de la première injection (Kathleen, C. F. *et al.*, 1992; Slofstra, S. H. *et al.*, 2006; Abbas, A. K. *et al.*, 2010b).

La dose de sensibilisation de LPS pourrait stimuler les macrophages à produire du TNF- α et à modifier les LPS. Ces deux produits peuvent stimuler les cellules NK et

possiblement des cellules T à produire et à sécréter de l'interféron- γ (IFN- γ). Quand les cellules NK, activées par la stimulation d'IFN- γ , sont exposées à une deuxième dose de LPS, elles vont stimuler d'autres macrophages proches à produire une très grande quantité de TNF et d'autres cytokines, telles que l'IL-1 et IL-8. Le TNF- α induit une cascade de réactions qui entraîne le développement des symptômes comme ceux observés dans le choc septique (Kathleen, C. F. *et al.*, 1992; Slofstra, S. H. *et al.*, 2006; Abbas, A. K. *et al.*, 2010b). Ces cytokines incitent les macrophages à libérer encore plus de TNF. Le TNF- α ensuite incite les macrophages à sécréter de l'IL-1b qui, à son tour va stimuler les macrophages et les cellules endothéliales à libérer de l'IL-6 et de l'IL-8 (Slofstra, S. H. *et al.*, 2006; Abbas, A. K. *et al.*, 2010b).

1.vii.ii. Réaction d'hypersensibilité retardée

Les réactions d'hypersensibilité retardée sont, en général, développées contre toutes les protéines antigéniques lorsqu'elles sont introduites à faibles concentrations dans la peau (Leenaars, M. *et al.*, 1997). Ce sont des réactions à médiation cellulaire dans lesquelles la cellule effectrice est le macrophage activé (Abbas, A. K. *et al.*, 2003c).

La réponse immune chez le cobaye immunisé avec un antigène (Ag) contenu dans une teinture appliquée sur la peau ou injecté dans le derme, est considérée comme le modèle classique de la réaction d'hypersensibilité retardée. Cette réaction peut être induite également chez les humains. Par exemple, la fraction protéique poly-antigénique de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) induit une réaction d'hypersensibilité retardée quand elle est injectée chez les individus qui ont récupéré d'une infection primaire de tuberculose ou qui ont été vaccinés contre la tuberculose (Abbas, A. K. *et al.*, 2010c).

La réponse caractéristique de la réaction d'hypersensibilité retardée se manifeste entre vingt-quatre et quarante-huit heures après l'injection de l'antigène. Quatre heures après l'injection, les neutrophiles s'infiltrent autour des veinules, au site de

l'injection. Après douze heures, des lymphocytes et des monocytes infiltrent périvasculairement le site d'injection. Les cellules endothéliales deviennent cubiques et laissent passer certaines macromolécules plasmatiques. Le fibrinogène sort des vaisseaux sanguins et se dépose dans le parenchyme où il est transformé en fibrine. C'est le dépôt de fibrine et l'infiltration de cellules inflammatoires (lymphocytes et macrophages), dans le tissu au site de l'injection, qui cause la tuméfaction et celle-ci peut être observée après dix-huit heures et devenir très évidente entre vingt-quatre et quarante-huit heures après l'injection de l'antigène. Chez la souris et le rat, la réaction d'hypersensibilité retardée est composée principalement d'une infiltration de neutrophiles. Cette différence entre cette réponse et celle observée chez l'homme n'est pas encore expliquée mais il est possible qu'elle soit due à la réponse inflammatoire des cellules endothéliales ou à une différence dans la production de cytokines (Abbas, A. K. *et al.*, 2010c).

Le début de la réaction d'hypersensibilité retardée est appelé "phase de sensibilisation". À ce stade, les antigènes (Ags) sont présentés aux cellules T naïves. Les cellules présentatrices d'antigènes (cellules de Langerhans et cellules interdigitées) prennent en charge les protéines antigéniques et migrent vers les ganglions lymphatiques et la rate. Dans ces organes, les Ags sont présentés aux cellules T CD4⁺ et CD8⁺ naïves, en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Leenaars, M. *et al.*, 1997; Lebec, H. *et al.*, 1999; Abbas, A. K. *et al.*, 2003c). Cette présentation d'antigènes active les lymphocytes, les induit à la prolifération et à la différenciation soit en cellules effectrices, soit en cellules de mémoire (Lebec, H. *et al.*, 1999; Abbas, A. K. *et al.*, 2003c). Après cette activation, les cellules quittent les tissus et rentrent dans le sang (Abbas, A. K. *et al.*, 2003c).

Après la phase de sensibilisation, la réaction d'hypersensibilité retardée peut être déclenchée lors d'une réexposition à l'antigène chez l'animal déjà sensibilisé. À ce stade, les cellules mémoire CD4⁺/Th1 et CD8⁺ circulants reconnaissent l'antigène présenté par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) qui, dans ce cas, peuvent être des macrophages et des cellules endothéliales (Abbas, A. K. *et al.*, 2010c). Quand les cellules mémoire ont déjà reconnu l'antigène, elles vont activer les cellules

endothéliales locales pour recruter d'autres leucocytes sanguins (monocytes) au foyer d'inflammation. Une fois que ces monocytes affluent, ils sortent des vaisseaux sanguins et se rendent au foyer inflammatoire, où ils se différencient en macrophages qui deviennent les dernières cellules effectrices, en mettant fin à la réaction d'hypersensibilité retardée en éliminant les micro-organismes et d'autres antigènes (Abbas, A. K. *et al.*, 2010c).

I.viii. Modèles animaux de souris transgéniques

Les animaux transgéniques ont pu être produits grâce à l'ensemble de découvertes dans plusieurs disciplines dans un période de quelques décennies (Shuldiner, A. R., 1996). Ces découvertes ont permis le contrôle hormonal de la reproduction chez les mammifères et la mise au point de techniques pour collecter, manipuler, et réimplanter les ovocytes et les embryons (Shuldiner, A. R., 1996). Ces techniques sont actuellement utilisées dans la fertilisation *in vitro* dans la pratique médicale partout dans le monde (Shuldiner, A. R., 1996). Un autre avancement scientifique important est l'utilisation de l'ADN recombinant pour isoler, caractériser, couper et coller des segments d'ADN (Shuldiner, A. R., 1996). Même si ces techniques de transgénèse ont été développées chez plusieurs espèces animales comme le mouton, la chèvre, la vache, les poulets et les poissons, ce sont les souris transgéniques qui sont les plus utilisées dans la recherche biomédicale (Shuldiner, A. R., 1996).

La première étape pour produire des animaux transgéniques, consiste à construire l'ADN qui sera transféré (le transgène) (Shuldiner, A. R., 1996). Ce transgène doit s'exprimer à l'endroit désiré. Pour cela, des techniques d'ADN recombinant sont utilisées (Shuldiner, A. R., 1996).

Un transgène typique contient des séquences de nucléotides qui correspondent au gène d'intérêt, avec toutes ses composantes nécessaires pour une expression efficace, en incluant un site d'initiation de la transcription, la région 5', un codon d'arrêt, la région 3' et un site de polyadénylation (Shuldiner, A. R., 1996). Une autre

composante essentielle du transgène est le promoteur ou région régulatrice qui induit la transcription (Shuldiner, A. R., 1996). Le transgène peut s'exprimer dans plusieurs tissus chez l'animal transgénique quand on utilise un promoteur d'expression ubiquitaire, comme c'est le cas de la β -actine (Shuldiner, A. R., 1996). En revanche, le transgène peut s'exprimer dans un tissu déterminé en utilisant des promoteurs tissu-spécifiques; par exemple, en utilisant le promoteur P2 d'adipocytes on peut faire en sorte que le gène s'exprime seulement dans les adipocytes (Shuldiner, A. R., 1996).

Il y a deux méthodes pour étudier les effets de produits d'un gène *in vivo*. La première est la création de souris transgéniques où il se produit une surexpression d'un gène particulier dans un tissu déterminé (Abbas, A. K. *et al.*, 2010e). La deuxième méthode est la création de souris à gène supprimé (*knockout*), dans laquelle il se produit une délétion ciblée pour inhiber la fonction d'un gène candidat (Abbas, A. K. *et al.*, 2010e). Ces deux techniques ont été très utilisées pour analyser nombre de phénomènes biologiques (Abbas, A. K. *et al.*, 2010e).

Pour créer des souris transgéniques, des séquences d'ADN étrangères (transgènes), sont introduites dans les pronoyaux des œufs fertilisés des souris (Abbas, A. K. *et al.*, 2010e). Pour obtenir ces œufs, des souris femelles sont injectées avec des gonadotrophines pour induire une hyper ovulation (Shuldiner, A. R., 1996). Plus tard, les souris sont accouplées avec un mâle fertile (Shuldiner, A. R., 1996). Les œufs fertilisés sont collectés avant la première division, placés dans des boîtes de Petri et cultivés jusqu'au stade de deux cellules (Shuldiner, A. R., 1996).

Ces œufs sont implantés dans l'oviducte de femelles pseudogestantes. Les souris nées sont toutes vérifiées par Southern blot ou par PCR pour démontrer lesquelles sont porteuses du gène. Seulement les souris porteuses du gène (souris Fondateurs) sont croisées avec des souris normales pour avoir des animaux hétérozygotes. Ensuite, les souris hétérozygotes sont croisées entre elles pour obtenir des animaux homozygotes (Shuldiner, A. R., 1996).

I.viii.i. Souris transgéniques pour étudier la pathogenèse du VIH-1

Dans le contexte de la réplication virale, il est difficile de déterminer les effets de chaque gène viral sur les fonctions cellulaires. Pour comprendre le développement du SIDA, des modèles animaux ont été développés, comme les modèles de souris transgéniques qui expriment différents produits géniques du VIH-1 dans des tissus spécifiques (Klotman, P. E. *et al.*, 1995). Ces souris développent des lésions qui ressemblent à celles que l'on observe chez les patients atteints du SIDA, comme la néphropathie (Kopp, J. B. *et al.*, 1992), le syndrome d'amaigrissement (Santoro, T. *et al.*, 1994), les altérations du système nerveux, l'atrophie du thymus et de la déplétion de lymphocytes T CD4⁺. Cependant aucun de ces modèles de souris Tg ne reproduit le syndrome immunitaire retrouvé chez les patients atteints du SIDA. C'est pourquoi, d'autres modèles de souris Tg ont été développés par Hanna, H. et collaborateurs (1998) comprenant l'expression de séquences complètes du VIH-1 dans les lymphocytes CD4⁺, et dans les cellules du lignage macrophage/dendritique en utilisant un promoteur CD4C humain. Ces chercheurs ont démontré que seul le produit génique du gène nef a été capable de produire une maladie sévère semblable au SIDA chez les humains. Au plan pathologique, ces souris ont développé de l'œdème, de l'amaigrissement, de l'atrophie de tous les organes lymphoïdes; thymus, rate, et autres structures lymphoïdes, de la néphrite tubulo-interstitielle et la mort prématurée. D'autres modèles de souris Tg (RAG-hu) produisent des cellules humaines qui permettent une infection productive d'HIV-1. Ce modèle de souris Tg, reproduit des aspects importants de la pathogenèse du SIDA, comme la déplétion de lymphocytes T CD4 dans le sang périphérique et dans le thymus (Berges, B. K. *et al.*, 2006).

D'autre part, pour étudier spécifiquement la néphropathie associée au VIH-1, Bruggeman, L. A. *et al.*, (1997) ont développé un modèle de souris transgéniques, avec le génome VIH-1, sans les gènes gag et pol, sous le contrôle transcriptionnel de LTR. Ces souris développent une maladie rénale progressive, histopathologiquement semblable à l'HIVAN chez les humains. Ce modèle indique que la perte cellulaire de l'épithélium tubulaire est produite par apoptose et cette apoptose est associée à

l'expression du transgène, mais elle n'est pas associée aux effets de cytokines de l'environnement du rein, tels que l'IL-1, l'IL-6, l'interféron- γ , le bFGF (basic fibroblast growth factor), le TGF- β (transforming growth factor β), le TNF- α et le TNF- β (tumor necrosis factor α et β) qui sont libérées par les lymphocytes infectés par le VIH-1. Ces cytokines sont présentes à des niveaux systémiques très élevés et considérées associées à l'HIVAN (Fauci, A. S. *et al.*, 1996; Bruggeman, L. A. *et al.*, 1997). D'autres modèles de souris Tg (HIV13FVB) exprimant les gènes vpr et nef dans les podocytes, développent les lésions caractéristiques de l'HIVAN (Zuo, Y. *et al.*, 2006).

Un modèle de souris transgénique a été développé pour connaître les effets de l'expression de la protéine gp120. Les lésions causées par la gp120 chez les souris, rappellent celles de la polydystrophie diffuse chez les patients, caractérisée par une perte neuronale du cortex, une réduction des connexions synaptiques, une dystrophie dendritique et une altération de la morphologie neuronale (Toggas, S. M. *et al.*, 1994; Gray, F. *et al.*, 1996). Un autre modèle de souris Tg a démontré que l'expression de Tat exclusivement dans les astrocytes est capable de produire des lésions du système nerveux similaires à celle observées chez les humains atteints du Sida (Kim, B. O. *et al.*, 2003).

Quand j'ai commencé ma recherche dans le laboratoire de Dr Kessous et Dr Michaud il y avait quatre modèles établis avec un seul gène, le gène vpr, nef, env et vpu. Cependant, les lignées de souris avec vpr et nef n'étaient pas encore établies. Avec le gène env, deux articles scientifiques ont été publiés. J'ai participé comme coauteur dans le deuxième. Les lignées de souris Tg vpu étaient bien établies et se reproduisaient bien; ce qui nous permettait de réaliser des expériences à grande échelle. En plus, comme il n'y avait pas encore eu beaucoup de recherche sur le gène vpu, notre modèle de souris Tg-vpu devenait très prometteur pour la recherche.

Pour établir les lignées de souris porteuses de vpu, deux types de construction ont été utilisés : l'une (RV) portant le gène vpu sous le contrôle du promoteur ubiquitaire du LTR de RSV ; l'autre (SV) sous le contrôle tissu spécifique du LTR du virus SL3-3

connu pour générer de hauts niveaux d'expression génique. Plusieurs lignées de souris transgéniques porteuses du transgène RV ont été obtenues, mais aucune lignée n'a été générée avec la construction SV. Pourtant, le promoteur LTR de SL3-3 utilisé avec le gène vpr a permis d'obtenir plusieurs lignées de souris viables porteuses du transgène SL3-3 vpr. Ceci nous a suggéré que Vpu pouvait être cytotoxique lorsque exprimée à haut niveau et entraîner probablement l'élimination très précoce des embryons transgéniques.

- A) Les quatre lignées transgéniques ont démontré un profil d'intégration de transgène différent d'une lignée à l'autre, excluant ainsi un possible effet du site d'intégration dans les lésions développées chez ces souris.
- B) Toutes ces lignées de souris ont exprimé les ARNs messagers vpu dans les différents tissus examinés soit le cerveau, le thymus le cœur, le poumon, rate, foie, rein, et muscle squelettique tel que démontré par RT-PCR. De plus, un signal d'expression du messenger vpu a été détecté dans les lymphocytes T CD8 et les cellules dendritiques.
- C) Les expériences de localisation de cette expression d'ARN messenger par hybridation in situ au niveau de cerveau, du poumon, de la rate, du rein et du foie ont permis de détecter un signal positif seulement dans cellules endothéliales et musculaires (muscle lisse) des artérioles rénales, dans des cellules de la plèvre et dans les cellules à cytoplasme réticulé de la rate.
- D) La protéine Vpu a été détectée sur les extraits protéiniques des fractions microsomales de plusieurs tissus : cerveau, le thymus le cœur, le poumon, rate, foie, rein. Cependant, les expériences d'immunohistochimie n'ont pas permis d'identifier les cellules productrices de Vpu. Ceci pourrait s'expliquer principalement par la faible expression de Vpu et/ou par la qualité limitée des anticorps anti-Vpu disponibles pour la reconnaissance efficace et spécifique de Vpu. Il faut signaler ici que nous n'avons pas d'anticorps avec une

meilleure spécificité pour permettre la détection de faibles quantités de Vpu (Casella, C. R. *et al.*, 1999) et l'identification des cellules qui l'expriment. L'hypothèse d'une faible expression de Vpu nous apparaît plus probable, car de forts niveaux de protéines Vpu semblent incompatibles avec la survie des animaux, tel que démontré avec le transgène SV alors que les constructions SL3-3 vpr ont généré des animaux transgéniques viables.

E) La technique d'immunobuvardage utilisant les extraits protéiniques des microsomes purifiés par centrifugation différentielle (Cooper, G. M; Hausman, R. E., 2008) à partir des tissus positifs pour l'expression de l'ARNm (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit) a permis de mettre en évidence un faible signal pour la protéine Vpu dans les fractions microsomales de presque tous les organes de souris Tg (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit). Cette approche cependant ne permet pas d'identifier les cellules qui expriment cette protéine. Aussi il ne nous a pas été possible de savoir si cette expression est restreinte à une faible population cellulaire présente dans tous les tissus ou étendue à tous les composants cellulaires des organes examinés.

Pour ce qui concerne les lésions développées, ces animaux laissaient entrevoir une atteinte rénale et aussi un certain degré de lymphoprolifération pansystémique mais rien ne permettait de déterminer la pathologie prédominante, le lien entre les différentes atteintes, leur fréquence, leur développement et évolution en fonction de l'âge et finalement l'exploration de l'état immunitaire. L'objectif de ma recherche pour le doctorat a donc été de faire cette exploration des lésions tissulaires développées dans ces lignées transgéniques.

II. Matériel et méthodes

II.i. Développement et caractérisation des souris transgéniques vpu

II.i.i. Construction des transgènes RV et SV

Les constructions plasmidiques RV-Vpu et SV-Vpu, utilisées pour générer les différentes lignées transgéniques, ont été produites à partir des plasmides SVRSVvpu et SL3vpu (fig. 2 A et 2B) par Lemaire C. *et al.*, (manuscrit en préparation) de façon à pouvoir isoler des transgènes fonctionnels de 1.8-Kb composés du gène vpu de la souche virale HXB10 (Terwilliger, E. F *et al.*, 1989), d'un promoteur fort et de la séquence de polyadénylation du SV40. Pour ce faire, un site de restriction BamHI situé à l'extrémité 3' de chacun des transgènes devait être modifié en un site unique XhoI. Cette substitution a été réalisée en excisant dans un premier temps un fragment NdeI-SacI de 4.4-Kb du plasmide SVRSVvpu (Lemaire, C. *et al.*, manuscrit en préparation) et en l'insérant à l'intérieur du vecteur pUC18 (Pharmacia) préalablement digéré avec les mêmes enzymes de restriction (position 183-402). Le site BamHI, situé à l'intérieur du fragment de 4.4-Kb a été ouvert et les extrémités cohésives ont été transformées en extrémités franches à l'aide de l'enzyme Klenow (Gibco BRL) afin de pouvoir ajouter l'adaptateur XhoI (Pharmacia). Après introduction de l'adaptateur XhoI en lieu et en place de BamHI, le fragment de 4.4 kb a été délété du vecteur pUC18 et réinséré à l'intérieur du plasmide SVRSVvpu original. Cette construction a été appelée RV (figure 2C).

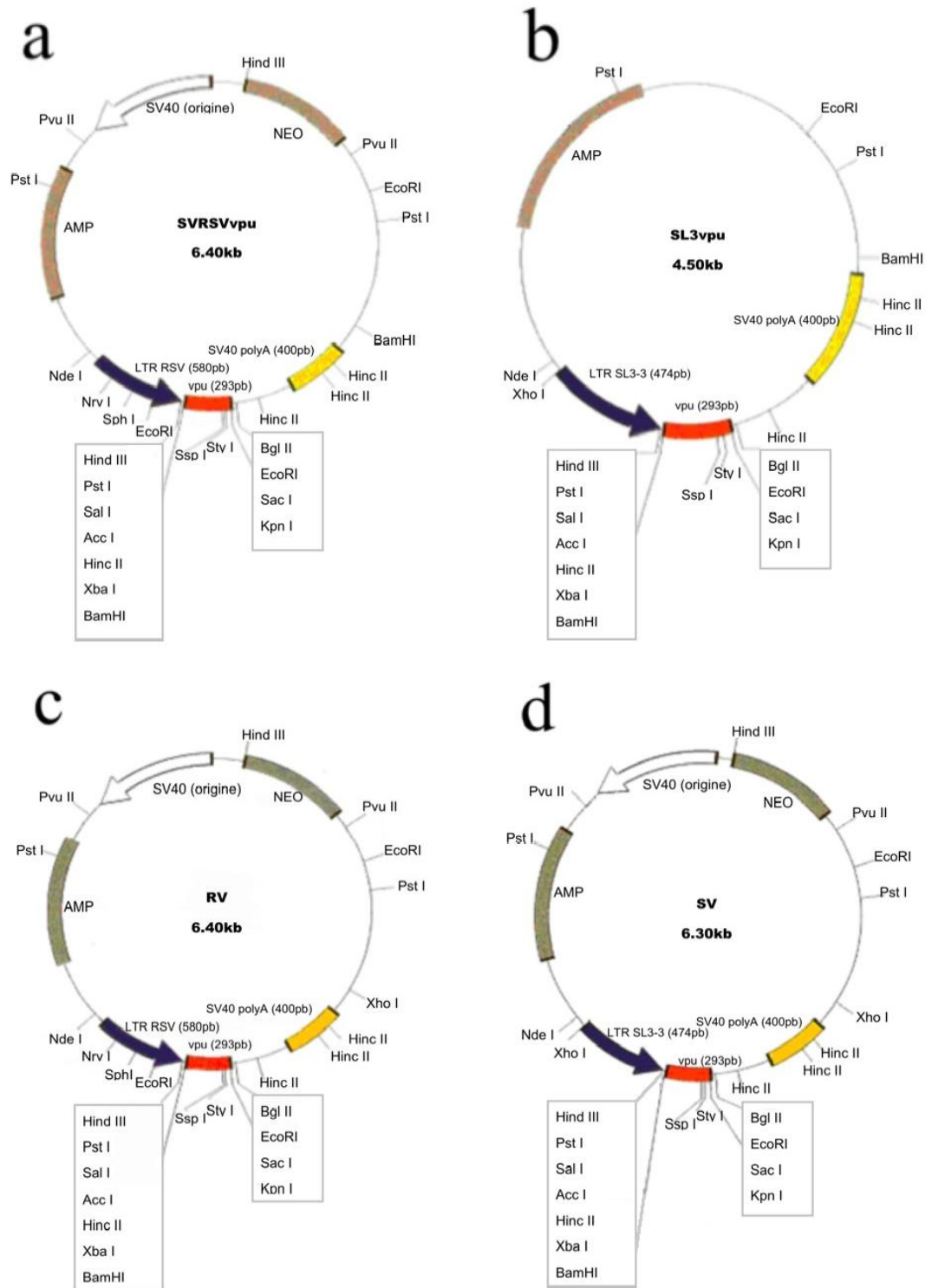
La construction SV a été dérivée de la construction RV en digérant celle-ci avec les enzymes de restriction NdeI et SalI et en remplaçant le promoteur LTR de RSV par le LTR du virus SL3-3 (fragment NdeI-SalI de 474 pb) isolé du plasmide SL3vpu pour donner le plasmide SL3Vpu (figure 2D).

Fig. 2. Représentations schématiques de la construction des transgènes RV et SV

A-B) Représentations schématiques des plasmides RSVvpu (A) et SL3vpu (B) pour la construction des plasmides RV et SV utilisés pour isoler les transgènes vpu et développer les souris transgéniques RV et SV.

C) Le transgène vpu, possédant une longueur totale de 1.8 Kb, a été excisé de la construction RV à l'aide d'une double digestion enzymatique NdeI-XhoI. Le transgène était constitué du LTR RSV (boîte bleue), du gène vpu (boîte rouge) et de la séquence de polyadénylation du SV40 (boîte jaune) (Fig. 2C).

D) Représentation schématique du transgène utilisé pour développer les souris transgéniques SV. Le transgène vpu, possédant une longueur totale de 1.8 Kb, a été excisé de la construction SV à l'aide d'une double digestion enzymatique NdeI et Sall. Le transgène était constitué du LTR SL3-3 (boîte bleue), du gène vpu (boîte rouge) et de la séquence de polyadénylation du SV40 (boîte jaune).



II.i.ii. Développement des souris porteuses des transgènes RV et SV: microinjection et établissement des lignées transgéniques

Tel que décrit par Julien, J. P. *et al.*, 1987, et Brinster, R. L. *et al.*, 1981, 150 à 400 copies de chacun des transgènes RV ou SV ont été microinjectées à l'intérieur de pronoyaux mâles d'embryons de souris issus d'un croisement C3H X C57BL/6J. Les embryons ont ensuite été réimplantés dans l'oviducte de souris ICR (Charles River) pseudogestantes. Après la période de gestation, les fœtus ont été testés pour la présence des transgènes dans leur ADN génomique. Pour obtenir la génération F1, les fondateurs porteurs du transgène ont été récroisés avec des souris C3H normales. Les descendants issus d'un même fondateur ont été subséquentement croisés entre eux de façon à dériver les premières souris homozygotes porteuses du gène vpu et pour permettre d'établir des lignées transgéniques stables et individuelles. Tous les animaux étudiés au cours de cette étude ont été maintenus dans un environnement stérile et ont été contrôlés périodiquement pour la présence d'agents pathogènes (Lemaire, C. *et al.*, manuscrit).

II.ii. Immunodétection de la protéine Vpu dans les souris transgéniques

Les analyses par transfert d'ARN (northern blot) (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit) effectuées sur les souris transgéniques développées ont permis de démontrer l'expression des mRNA vpu avec des profils d'expression qui varient selon les différentes lignées obtenues (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit). Pour démontrer la présence de la protéine et identifier les cellules qui l'expriment, nous avons utilisé deux approches, l'immunohistochimie et l'immunoprécipitation, en utilisant un anticorps monospécifique anti-Vpu de lapin (Yao, X. J. *et al.*, 1995; Cohen, A. H. *et al.*, 1988).

II.ii.i. Détection de Vpu par immunohistochimie

1) Immunofluorescence : Des échantillons de tissus ont été prélevés des organes positifs pour la présence de mRNA vpu chez les souris transgéniques et des mêmes organes chez les souris contrôles. Ces échantillons ont été congelés dans l'isopentane avec la glace sèche puis inclus dans le milieu d'enrobage O.C.T (Miles Inc.). Ils ont été sectionnés en coupe de 5-6 μ m d'épaisseur à l'aide d'un cryostat; ces coupes ont été montées sur des lames de verre superfrost, fixées dans un mélange d'éthanol/acide acétique (4 :1 v/v) pendant 20 minutes à -20°C puis séchées à température ambiante. Les sections ont été réhydratées, rincées plusieurs fois dans du PBS, incubées dans un tampon de blocage (5% de sérum normal de lapin, 1% BSA, 0,5% triton X-100) pendant 30 minutes à la température ambiante et finalement incubées pendant 4 heures à 37°C en présence de l'anticorps de lapin anti-Vpu (gracieusement offert par le Dr E. Cohen du Département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal) dilué à 1/600 dans du PBS. Pour la coloration à l'immunofluorescence, les coupes ont été rincées plusieurs fois dans du PBS et incubées pendant une heure à température ambiante en présence d'un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin conjugué à la fluorescéine isothiocyanate (Jackson Laboratories) préalablement dilué à 1:50 dans du PBS. À la fin de cette réaction, les coupes ont été lavées plusieurs fois au PBS, puis elles ont été montées dans du Vectashield (Vector Laboratories) et recouvertes de lamelles pour l'observation au microscope à fluorescence.

2) Immunoperoxydase: Pour cette réaction, les échantillons de tissus transgéniques et normaux ont été congelés, sectionnés et fixés selon les conditions décrites précédemment. Après une préincubation de 30 minutes à température ambiante dans le tampon de blocage (5% sérum normal de lapin, 1% BSA, 0.5% triton X-100), les sections ont été incubées pendant 4 heures à 37°C en présence de l'antisérum monospécifique de lapin anti-Vpu dilué à 1/600 dans du PBS. Les coupes ont été ensuite rincées à 4 reprises dans du TBS et mises à incuber en présence d'un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin biotinylé (Vector Laboratories) à une dilution

de 1 :500 dans du TNB (0.1M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15 NaCl, 0.5% du réactif de blocage DuPont) pendant 1 heure. La réaction immune a été révélée par la streptavidine-HRP (trousse Vectastain ABC, Vector Laboratories), diluée à 1 :500 dans du TNB pendant 30 minutes, selon les conditions recommandées par le manufacturier. À la fin de la réaction, les coupes ont été colorées au bleu Evans (0.01% dans du PBS) pendant 5 minutes, les tissus ont été déshydratés et les lames ont été montées avec le système automatisé de Miles de Sakura, pour l'observation en microscopie conventionnelle.

3) Immunoperoxydase et amplification du signal par la tyramine couplée à la fluorescéine

Cette approche permet d'amplifier plusieurs fois le signal résultant de la réaction par immunoperoxydase par formation de complexes de tyramine couplée à la fluorescéine autour des résidus de peroxydase (direct tyramide signal amplification, DuPont NEN) (Plenat, F. *et al.*, 1997). Cette technique a été utilisée sur des coupes de tissus transgéniques et contrôles normaux paraffinés ou congelés.

Pour les tissus paraffinés, les coupes ont été déparaffinées au xylène (deux bains de xylène de 5 minutes chacun), passées dans des bains successifs d'éthanol 100% (2 fois 5 minutes), 90% (5 minutes) 75% (5 minutes), 50% (5 minutes) et 30% (5minutes) et, finalement, rincées pendant 15 minutes dans du PBS à pH 7.2

Les tissus congelés ont été sectionnés en coupes de 5 à 8 μm d'épaisseur, dans un cryostat à une température de -15°C à -18°C et fixées selon la méthode de Zhang, L. et Tarleton, R. L., (1996). Les coupes ont été passées pendant 3 minutes dans des bains d'acétone froide à différentes concentrations (60%, 70%, 80% et 90%) et dans un bain final de paraformaldéhyde (PAF) 2% à pH 7.2 pendant 3 minutes à température de la pièce puis rincées pendant 15 minutes dans du PBS à pH 7.2.

Toutes les coupes ainsi préparées ont été traitées dans les mêmes conditions pour les réactions immunohistochimiques subséquentes. Après un bain de 10-20 minutes dans une solution de peroxyde (H_2O_2) à 0.3% pour bloquer les peroxydases non spécifiques des différents tissus examinés, elles ont été lavées pendant 15 minutes dans du PBS et ensuite incubées dans une solution de glycine (Sigma) à 0.15M dans

du PBS durant 5 minutes afin de neutraliser les groupements aldéhydes de la PAF et de la formaline. Les coupes ont été ensuite incubées dans une solution de sérum normal de lapin (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, cat 011-000-120) à 5% dans du PBS pendant 20 minutes à la température de la pièce et finalement rincées durant 15 minutes dans du PBS.

Pour détecter la protéine Vpu, les coupes ainsi préparées ont été incubées pendant une nuit à 4°C en présence d'un antisérum monospécifique anti-Vpu de lapin dilué à 1/600 dans du PBS. À la fin de cette incubation, les tissus ont été lavés pendant 15 minutes dans du tampon TNT (0.1M Tris-HCl, pH 7.5, 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20). Pour la réaction secondaire, les sections ont été mises en présence d'un anticorps biotinylé de chèvre anti-IgG de lapin (Sigma) à une dilution de 1/500 dans du TNB pendant 30 minutes puis rincées dans du TNT pendant 15 minutes. Suite à ces traitements les coupes ont été incubées pendant 30 minutes dans du tampon TNB contenant la streptavidine-HRP (SA-HRP) diluée 1:500 dans du TNB pendant 30 minutes puis rincées dans du TNT durant 15 minutes. Les coupes ont été ensuite incubées dans l'obscurité avec la FITC-tyramide à une dilution 1/50 pendant 10 minutes et rincées à l'abri de la lumière dans du TNT pendant 15 minutes

Pour visualiser les structures histologiques, les coupes ont été colorées au bleu d'Evans (0.01% dans du PBS) pendant 5 minutes et ensuite lavées pendant 5 minutes dans du PBS. Les lames ont été montées avec le milieu de montage de Dabco (5 % glycérol dans du PBS).

II.ii.ii. Détection de la protéine Vpu par immunobuvardage (Lemaire *et al.*, manuscrit)

L'expression de la protéine Vpu dans les tissus (poumon, rein, foie, thymus et rate) de souris transgéniques a été également recherchée par la technique d'immunobuvardage (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit).

Les extraits protéiniques ont été purifiés à partir de la fraction microsomale qui renferme le réticulum endoplasmique rugueux. Les microsomes ont été isolés de

différents tissus de souris transgéniques et de contrôles normaux selon la méthode décrite par Fujiki Y. et collaborateurs (1982) et Toyoda et collaborateurs (1995). Les protéines membranaires retenues à l'intérieur des extraits microsomaux ont été solubilisés en resuspendant les microsomes dans 800 μ l de tampon de lyse RIPA (140mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2mM NaH₂PO₄, 1% NP-40, 0.5% SDS) ; ils ont été ensuite incubés sur glace pendant 5 heures, sous agitation douce (Yao, X. J. *et al.*, 1995). Après une centrifugation de 60 minutes à 105 000g à 4°C pour éliminer le matériel insoluble, les surnageants ont été transférés dans de nouveaux tubes et leur concentration en protéines a été déterminée par dosage colorimétrique de Lowry (Lowry, O. H. *et al.*, 1951) tel qu'adapté par Bio-Rad. L'albumine de sérum bovin (Sigma) a été utilisée pour établir la courbe étalon pour permettre la conversion de la densité optique (λ 750nm) des échantillons protéiques en mg/ml.

Des échantillons de 2 μ g de protéines, prélevés à partir de chaque extrait microsomal, ont été immunoprécipités par l'anticorps monospécifique de lapin dirigé contre la protéine Vpu selon la procédure décrite par Yao et collaborateurs (1995). Les culots des complexes immuns obtenus suite à cette immunoprécipitation ont été resuspendus dans 50 μ l de tampon de Laemmli (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycérol, 5% SDS, 0.25% bleu de bromophénol, 572 mM β -mercaptoéthanol) et ont été chauffés à 95°C pendant 5 minutes de façon à solubiliser les complexes immuns. Les billes de sépharose ont été éliminées par centrifugation pendant 10 minutes à 14 000 rpm à 4 °C ; les surnageants ont été déposés sur gel de polyacrylamide 12% et les protéines ont été séparées par électrophorèse (ampérage constant de 20mA) pendant 2 heures à 4°C dans 25mM Tris-HCl, pH 8.7, 190mM glycine, 0.1% SDS. Suite à cette séparation sur gel, les protéines ont été électro-transférées (50 volts) sur membrane de nitrocellulose 0.22 μ m (Schleicher & Schuell) (Sambrook *et al.* 1989). La membrane ainsi préparée est soumise aux différentes étapes de la réaction avec l'anticorps anti-Vpu. Dans une première étape, la membrane est soumise à un traitement dans 100 ml de tampon TBST (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20) contenant 5% de lait écrémé, pendant 16 heures sous agitation continue, afin de neutraliser les sites d'interactions non spécifiques de l'anticorps primaire. Cette solution est ensuite remplacée par le même tampon contenant 1.5% de lait écrémé et

6 µl de sérum de lapin anti-Vpu et la membrane est incubée pendant 2 heures à température ambiante. Ceci a été suivi par 4 lavages successifs de 15 minutes dans 50 ml de TBS contenant 0.1% de Tween-20. Après ces lavages, la membrane est incubée pendant 1 heure à 22°C dans le tampon TBST avec 1.5% de lait écrémé et l'anticorps de chèvre anti-IgG de lapin, conjugué à la biotine (Zymed Laboratories) à la dilution de 1 :10 000. À la fin de cette incubation, la membrane est lavée plusieurs fois pour éliminer l'excès d'anticorps biotinylé et la réaction est révélée par chemiluminescence (ECL, Western Blotting Analysis System) selon les conditions recommandées par le fabricant.

II.iii. Étude histopathologique des souris transgéniques

II.iii.i. Nécropsie et prélèvement des tissus pour l'histopathologie et pour l'immunohistochimie

Avant d'effectuer les prélèvements nécropsiques, les animaux ont été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital sodique (35mg par kg) (Somnotol de MTC Pharmaceuticals, cat # 00141690). Afin de créer une banque de différents tissus, nous avons effectué des prélèvements au niveau des poumons, du thymus, de la rate, des reins, du foie et de la peau, et nous les avons fixés à la formaline 10%. Pour les analyses immunohistochimiques, d'autres prélèvements de ces mêmes tissus ont été congelés directement dans l'azote liquide ou dans l'isopentane et glace sèche puis conservés à -80°C. Les échantillons fixés ont été paraffinés et sectionnés en coupes de 4 à 6 µm. Pour l'examen histopathologique, les colorations suivantes ont été effectuées sur les coupes déparaffinées selon les conditions appliquées de routine en laboratoire de pathologie: l'hématoxyline-phloxine-safran (HPS), l'acide périodique de Schiff (PAS), les colorations au Gram, au Giemsa et au vert methyl pyronine et la coloration à l'argentation telle que décrite par Marshall A.H.E. (1956) mais légèrement modifiée dans notre laboratoire. Cette dernière coloration permet d'examiner la distribution et l'organisation des cellules

dendritiques et macrophages métallophiliques. Pour cette technique, les tissus paraffinés ont été coupés entre 8 à 10 μ m; les coupes ont été déparaffinées, graduellement amenées dans l'alcool 50% et lavées à l'eau distillée. Puis les tissus ont été immergés pendant 3 à 10 minutes dans une solution de nitrate d'argent 10% et nous avons effectué un virage chimique avec de l'hydroxyde d'ammonium en conservant un certain niveau de turbidité. Ensuite, les lames ont été immergées dans la formaline à 3% pendant 3 minutes, puis rincées trois fois pendant 5 minutes dans l'eau distillée. Ceci a été suivi par un bain de 30 à 40 secondes dans du thiosulfate de sodium à 0.5%, puis par un lavage à l'eau distillée trois fois, une contre-coloration avec le rouge neutre pendant 3 minutes, et rinçage à l'eau du robinet. Finalement les tissus ont été déshydratés et les lames ont été montées avec le système automatisé de Miles de Sakura.

II.iii.ii. Analyse histopathologique des souris transgéniques

L'analyse histopathologique a été effectuée en trois étapes: Dans un premier examen exploratoire nous avons procédé par approche histo-morphométrique afin d'identifier les altérations histopathologiques, d'établir une gradation des lésions observées et de déterminer leur fréquence dans le groupe des souris transgéniques toutes lignées et âges confondus, comparativement aux lésions spontanées du groupe contrôle (tableau III). Pour cela il a fallu préalablement déterminer les caractéristiques histo-morphométriques des tissus chez les animaux du groupe contrôle et établir les paramètres de morphométrie normale (tableau II). Pour cette première analyse, nous avons utilisé 151 souris femelles et mâles à différents âges dont 120 souris transgéniques (Tg) de différentes lignées et 31 non transgéniques (Ntg) contrôles. Dans le groupe des souris Tg, nous avons inclus vingt-sept souris de la lignée RV-96, trente-cinq de la lignée RV-105, vingt-huit de la lignée RV-106 et trente de la lignée RV-719. Les coupes des différents tissus examinés ont été colorées au HPS.

Dans une deuxième étape, nous avons examiné les lésions histologiques dans les différents organes de chacune des lignées Tg et déterminé leur fréquence tous âges

confondus par rapport aux animaux contrôles. La caractérisation complète des lésions a été effectuée par des colorations additionnelles: PAS pour les lésions glomérulaires, Gram et Giemsa pour le foie, vert methyl-pyronine et argentation de Marshall pour les rates.

Finalement, pour mieux suivre l'évolution de ces lésions dans le temps, nous avons examiné leur grade et fréquence à l'intérieur des groupes d'âge suivants: groupe A : 2 à 6 mois ; groupe B : 7 à 12 mois ; groupe C : 13 à 24 mois.

II.iii.iii. Analyse histopathologique **en fonction de l'âge**

b) Dans une seconde étape nous avons réexaminé les tissus et déterminé les fréquences des lésions par organe chez toutes les lignées de souris transgéniques (Tg) et non transgéniques (Ntg) tous âges confondus, en utilisant notre approche histomorphométrique (tableaux II et III).

Après avoir établi les fréquences des lésions par organe et par lignée des souris Tg et de souris contrôles (Ntg), nous avons analysé la fréquence de ces lésions par catégorie d'âge afin de mieux comprendre leur évolution dans le temps. Les groupes d'âges ont été formés de la façon suivante: groupe A : 2 à 6 mois; groupe B : 7 à 12 mois; groupe C: 13 à 24 mois (tableau IV).

II.iii.iv. Caractérisation des lymphoproliférations spléniques

Pour mieux évaluer la fréquence, le développement, l'évolution et le type histopathologique des lymphoproliférations, nous avons examiné les rates de 19 souris de la lignée RV-105, 18 souris de la lignée RV-106 et nous les avons comparées aux rates de 8 souris Ntg. Les paramètres considérés dans cette étude ont été pour chacune des souris la lignée, l'âge, l'état histopathologique de la rate et les caractéristiques des lymphoproliférations observées en tenant compte des types définis par la classification de Peuchmaur, M. *et al.*, 1991 et de Larroche, C. *et al.*,

1996. Pour ce dernier paramètre les tissus ont été examinés à l'aide de la coloration HPS, au vert de méthyl-pyronine et la technique de l'argention (Marshall, A. H. E., 1956) modifiée dans notre laboratoire. Toutes ces colorations ont été effectuées sur des tissus paraffinés.

II.iv. **Détection d'interleukine 6 (IL-6) par immunohistochimie**

Pour tenter d'appréhender le mécanisme de production des altérations lymphoïdes (lymphoproliférations) observées dans la rate et reins, nous avons évalué par immunohistochimie l'expression de l'interleukine IL-6 dans lésions lymphoprolifératives de la rate et des reins.

Pour cela nous avons sélectionné, dans le groupe des souris transgéniques (Tg), 4 souris qui, lors de l'étude histopathologique, ont montré une lymphoprolifération allant de légère à sévère. Nous avons également sélectionné 2 rates de souris non transgéniques (Ntg) du même âge, avec une hyperplasie de type folliculaire. Pour les reins, nous avons sélectionné un rein provenant d'une souris Tg RV-105 ayant développé une lymphoprolifération splénique et un rein provenant d'une souris Tg RV-106 qui avait développé une lymphoprolifération lymphomateuse splénique. Comme contrôles, nous avons sélectionné deux reins provenant de souris Ntg du même âge. Toutes les souris Tg et Ntg présentaient des manchons lymphoïdes périvasculaires dans la région du bassin rénal.

La détection d'IL-6 a été effectuée sur des coupes de tissus congelés par la technique d'immunopéroxydase à l'aide de la trousse Vectastain ABC (Vector Laboratories). Les tissus (rate et rein) ont été coupés à une épaisseur variant de 5 à 8 μm ., à une température de -15°C , et les sections ont été fixées selon la méthode de Zhang, L. *et al.*, (1996) pendant 3 minutes dans des bains avec des concentrations croissantes d'acétone froide (60%, 70%, 80% et 90%) dans l'eau et finalement surfixées à la paraformaldéhyde (PAF) 2% à pH 7.2 pendant 3 minutes à température de la pièce. Nous avons ensuite lavé les lames pendant 15 minutes avec du PBS à pH 7.2. Nous avons traitées les coupes dans une solution PBS avec 5% de sérum normal de lapin

(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) pendant 20 minutes à la température de la pièce.

Comme anticorps primaire, nous avons utilisé un anticorps de chèvre anti-IL6 de souris (R & D Systems, Inc.) à une concentration de 20µg/ml. Les coupes ont été incubées à 4°C pendant toute la nuit.

Après rinçage pour enlever l'excès d'anticorps primaire, les coupes ont été incubées en présence de l'anticorps biotinylé de lapin anti-IgG de chèvre (Vector Laboratories) à une dilution de 1:200 pendant 30 minutes à température ambiante. Après rinçage, les lames ont été traitées au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à la concentration de 0.3% dans du PBS pendant 15 minutes pour bloquer la peroxydase tissulaire non spécifique. Ensuite, les lames ont été lavées dans du PBS pendant 15 minutes. La réaction immune a été révélée en utilisant la trousse ABC Vectastain (Vector Laboratories) et la coloration au tétrahydrochlorure du diaminobenzidine (DAB), selon les recommandations du fournisseur.

La contre-coloration des tissus a été faite à l'hématoxyline de Mayer (Sigma, St Louis, MO) pendant 5 minutes. Les lames ont été montées avec un système automatisé (Miles de Sakura).

II.v. Essais d'exploration *in vivo* de la fonction immunitaire

Certaines observations histopathologiques telles que les hyperplasies lymphoïdes dans plusieurs tissus, l'hyperplasie lymphomateuse de la rate ainsi que le type cellulaire de ces lymphoproliférations suggèrent qu'il pourrait y avoir une stimulation non spécifique du système lymphocytaire pouvant entraîner une dysfonction immunitaire. Les souris étant élevées dans un environnement exempt de pathogènes et nourries avec de l'eau et de la nourriture stérilisées, ces souris n'ont donc aucun contact avec les pathogènes et leur fonction immune n'est donc pas soumise aux défis antigéniques. Dans ces conditions, toute dysfonction immunitaire ne peut être détectée si elle n'est testée par la réaction à certains agents.

Pour examiner *in vivo* la fonction du système immunitaire des souris Tg comparativement aux souris Ntg, nous avons examiné la réponse de ces souris au traitement avec la dexaméthasone et avec des lipopolysaccharides. Par ailleurs des travaux récents (Casella, C. R. *et al.*, 1999; Akari, H. *et al.*, 2001) ont montré que Vpu a la propriété d'augmenter la susceptibilité à l'apoptose. Pour tenter d'évaluer cet effet de Vpu sur les lymphocytes *in vivo* chez les souris transgéniques, nous avons soumis ces dernières au traitement par la dexaméthasone (Dex).

Il est bien établi que les glucocorticoïdes, comme la dexaméthasone induisent la mort sélective des lymphocytes T et B immatures par apoptose, en activant des nucléases endogènes qui coupent l'ADN (Staples, J. E. *et al.*, 1998; Norman, J. *et al.*, 2003; Abbas, A. K. *et al.*, 2010a). Cependant les corticostéroïdes ne lysent pas les thymocytes médullaires matures, les lymphocytes T matures circulants et les lymphocytes T matures des organes lymphoïdes périphériques (Staples, J. E. *et al.*, 1998; Norman, J. *et al.*, 2003; Abbas, A. K. *et al.*, 2010a). La signalisation de l'apoptose induite par la Dex peut être bloquée par la voie du bcl-2 (Staples, J. E. *et al.*, 1998).

Les lipopolysaccharides sont connus pour induire l'apoptose des lymphocytes T, la mitose des lymphocytes B sans la participation des lymphocytes T et activent les macrophages/monocytes (Castro, A. *et al.*, 1998). Les LPS peuvent induire une réponse physiopathologique très similaire à celle du choc septique avec une coagulation intravasculaire disséminée (Kathleen, C. F. *et al.*, 1992). En outre, les LPS peuvent induire la réaction de Schwartzman, une réponse immunitaire exacerbée similaire à celle développée par l'organisme pour limiter la dissémination des agents microbiens et favoriser leur élimination (Abbas, A. K. *et al.*, 2010b).

La réaction locale de Schwartzman a été induite avec deux injections de LPS administrés à vingt-quatre heures d'intervalle. La première est une dose sensibilisante donnée par voie sous-cutanée et la deuxième est une dose de réaction, donnée par voie intrapéritonéale. C'est la deuxième injection qui causera la réaction de Schwartzman et la nécrose hémorragique de la peau, limitée au site de la première injection (Kathleen, C. F. *et al.*, 1992). La dose de sensibilisation de LPS stimule les macrophages à produire du TNF- α et aussi une forme transformée de LPS. Ces deux

réponses vont entraîner la stimulation des cellules NK, et possiblement des cellules T, pour produire et sécréter de l'interferon- γ (IFN- γ). Quand les cellules NK, générées suite à la stimulation d'IFN- γ , seront exposées à la deuxième dose de LPS, elles vont stimuler d'autres macrophages localement proches à produire une très grande quantité de TNF- α et d'autres cytokines, telles que l'IL-1 et l'IL-8. Le TNF- α induit une cascade de réactions qui entraînent le développement des symptômes comme ceux observés dans le choc septique (Kathleen, C. F. *et al.*, 1992). Ces cytokines induisent les macrophages à libérer le TNF- α qui, à son tour, induit les macrophages à sécréter de l'IL-1, qui va stimuler les macrophages et les cellules endothéliales à libérer de l'IL-6 et de l'IL-8 (Abbas, A. K. *et al.*, 2010b).

Pour explorer la fonction immunitaire *in vivo*, nous avons examiné la réponse aux effets suivants:

- 1) les effets de la dexaméthasone sur la population lymphocytaire du thymus, de la rate et du sang chez les souris Tg (RV-105 et RV-106) et Ntg.
- 2) les effets des lipopolysaccharides sur la population lymphocytaire du thymus, de la rate, du sang et leurs effets inflammatoires sur la peau (réaction locale de Schwartzman) chez les souris Tg (RV-105 et RV-106) et Ntg.
- 3) l'induction d'une réaction d'hypersensibilité retardée à l'albumine bovine (ABS).

II.v.i. Effets de la dexaméthasone sur la population lymphocytaire du thymus, de la rate et du sang chez les souris Tg (RV-105 et RV-106) et Ntg

Avant de réaliser cette expérience nous avons fait des leucogrammes des souris Tg et Ntg avant tout traitement pour connaître l'état immunitaire et obtenir des valeurs de référence afin de mieux interpréter les résultats après traitement avec la DEX ou les LPS. Nous avons analysé trois paramètres leucocytaires principaux: les leucocytes totaux, les lymphocytes totaux et le pourcentage de lymphocytes par rapport aux leucocytes totaux. Pour cela, nous avons utilisé 10 souris RV-105, 8 RV-106 et 12

Ntg, toutes âgées de 3 mois. Pour ces décomptes, le sang, prélevé par ponction cardiaque (500 μ l) avec des seringues contenant 50 μ l d'anticoagulant (citrate de sodium 3.8 %) a été utilisé pour réaliser les numérations leucocytaires, en utilisant le compteur de leucocyte disponible au département (Coulter T-890 Corporated Communications).

Pour l'expérience à la DEX, nous avons utilisé 6 souris de la lignée RV-105, 6 souris de la lignée RV-106 et 6 souris non transgéniques contrôles. Toutes les souris, âgées de 70 jours et d'un poids de 28 à 30g, ont reçu une injection par voie intra-péritonéale de 125 μ g de dexaméthasone (Sigma, #2915). Après 24 heures, toutes les souris ont été sacrifiées; le sang, la rate, le thymus, le foie et les reins ont été collectés par les méthodes déjà décrites.

Le sang, prélevé par ponction cardiaque (500 μ l) avec des seringues contenant 50 μ l d'anticoagulant (citrate de sodium 3.8%) a été utilisé pour réaliser les numérations leucocytaires au Coulter (Coulter T-890 Corporated Communications). Pour évaluer la signification des différences statistiques entre les décomptes de cellules sanguines chez les souris Tg RV-105 et RV-106 et souris Ntg, nous avons utilisé la méthode statistique d'analyse de variance (ANOVA) et Bonnferroni.

Pour l'étude histopathologique, la rate, le thymus, les reins et le foie ont été fixés dans la formaline 10% pendant 24 heures, enrobés dans la paraffine, puis sectionnés et colorés selon les techniques déjà décrites.

De plus, les thymus et les rates ont été examinés par immunohistochimie pour évaluer l'activité apoptotique développée dans ces organes suite au traitement à la dexaméthasone. Pour cela nous avons utilisé la méthode de TUNEL, selon les conditions décrites par le fournisseur (Boehringer Mannheim, cat. 1684817). Pour cette technique, les coupes ont été déparaffinées au xylène, déshydratées à l'alcool puis lavées pendant 15 minutes avec du PBS à pH 7.2.

Pour bloquer la peroxydase non spécifique des tissus, nous avons utilisé le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ à 0.3% dans du PBS pendant 15 minutes. Après lavage dans le PBS pendant 15 minutes, les coupes ont été traitées pendant 15 minutes avec la protéinase K à une concentration de 20 μ g/ml dans 10mM de Tris-HCl à pH 7.4 à la température de 37°C. Les lames ont été rincées au PBS pendant 15 minutes, traitées

avec le réactif “TUNEL” durant 1 heure, à 37°C, puis de nouveau lavées avec du PBS pendant 15 minutes. Elles ont été finalement incubées avec le réactif “POD” durant 30 min, à 37°C et ensuite lavées avec du PBS pendant 15 minutes avant la révélation de la réaction avec le DAB (tétrahydrochlorure du diaminobenzidine de Mannheim Boehringer #1684817).

La contre-coloration des tissus a été faite à l’hématoxyline de Mayer (Sigma, St Louis, MO) pendant 5 minutes. Un système automatisé (Miles de Sakura) a été utilisé pour le montage des lames.

II.v.ii. Réponse à la stimulation par les lipopolysaccharides (LPS)

Pour cette expérience, nous avons voulu examiner la réponse au LPS des cellules lymphocytaires du sang, du thymus et de la rate des souris Tg et Ntg. Nous avons également voulu évaluer les effets du LPS au site d’injection (réaction de Schwartzman).

Pour cette expérience nous avons utilisé un total de 74 souris soit 24 RV-105, 24 RV-106 et 26 Ntg, toutes âgées de 70 jours. Toutes ces souris ont reçu une injection sous-cutanée de LPS de *Serratia marcescens* (Sigma, L61136 phenol-extracted) à raison de 5 µg/30gr de poids de l’animal.

Vingt quatre heures après l’injection, 6 animaux (2 RV-105, 2 RV 106, 2 Ntg) ont été sacrifiés et les 68 autres ont reçu une deuxième injection de LPS par voie intrapéritonéale à raison de 3.3 mg/kg de poids de l’animal. Deux souris de chaque lignée ont été sacrifiées 25h30, 27h, 30h, 36h et 48h après la première injection (ou encore 1h30, 3h, 6h, 12h, et 24h après la deuxième injection). Les douze souris restant dans chacune des lignées ont été sacrifiées 72 heures après la première injection. Les temps de sacrifice des animaux ont été établis par des résultats obtenus lors d’expériences préliminaires effectuées dans notre laboratoire.

Pour les numérations leucocytaires, un prélèvement de 500µl de sang par ponction cardiaque avec un anticoagulant (citrate de sodium 3.8%) a été effectué avant le sacrifice des animaux. Les numérations ont été réalisées au Coulter (Coulter T-890

Corporated Communications). Pour évaluer la signification des différences numériques entre les décomptes de cellules sanguines chez les souris Tg RV-105 et RV-106 et souris Ntg, nous avons utilisé la méthode statistique d'analyse de variance (ANOVA) et Bonnferroni.

Pour tous les animaux inclus dans cette expérience, nous avons effectué un examen anatomopathologique complet avant le prélèvement des tissus d'intérêt (poumon, foie, rate, rein, thymus et peau) pour l'évaluation histopathologique et immunohistochimique. Des échantillons de tous ces tissus ont été soit congelés soit fixés pendant 24 h à la formaline 10%. Les tissus ont été ensuite enrobés dans la paraffine, sectionnés en coupes de 4-6 μ m et colorés à l'HPS. De plus des coupes des tissus obtenus à 72h post-injection de LPS ont été également colorées au vert de méthylpyronine et à l'argentation de Marshall tel que précédemment décrit.

Finalement, les thymus et les rates ont été examinés par immunohistochimie pour évaluer l'activité apoptotique développée dans ces organes suite au traitement aux LPS selon la technique décrite antérieurement.

II.v.iii. Analyse immunohistochimique de populations leucocytaires de la rate des souris traitées aux LPS

Pour savoir quelles populations cellulaires de la rate ont été le plus affectées par le traitement au LPS à 72 heures après l'injection, nous avons examiné, par la technique d'immunoperoxydase telle que décrite précédemment, les populations cellulaires suivantes: lymphocytes B, macrophages activés, lymphocytes T CD4 et lymphocytes CD8, en utilisant, respectivement, les anticorps monoclonaux de rat anti-B220, anti-Mac-3/84, anti-CD4 et anti-CD8 de souris (PharMingen International). Les réactions ont été effectuées en duplicata sur des coupes de tissus congelés provenant des souris Tg (RV-105 et RV-106) et contrôles Ntg, en utilisant la trousse Vectastain ABC (Vector Laboratories).

Lors de l'examen anatomopathologique, les organes d'intérêt ont été prélevés et congelés à -80°C jusqu'à l'utilisation. Les rates ont été sectionnées en coupes

d'épaisseur variant entre 5 et 6 μm , à une température de -15°C , puis fixées pendant 3 minutes dans des bains à 60%, 70%, 80% et 90% d'acétone froide dans l'eau et finalement fixées à la paraformaldéhyde (PAF) 2% à pH de 7.2 pendant 3 minutes à température de la pièce, selon la méthode de Zhang, L. et Tarleton, R. L. (1996). Après la fixation, nous avons lavé les coupes pendant 15 minutes avec du PBS à pH 7.2. Nous les avons ensuite bloquées avec du sérum normal de lapin dilué à 5% dans du PBS (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, cat 011-000-120) pendant 20 minutes à la température de la pièce. Pour la réaction primaire, tous les anticorps monoclonaux ont été utilisés à une dilution de 1:200 et l'incubation a été effectuée à 4°C pendant toute la nuit.

Pour la réaction secondaire, nous avons utilisé un anticorps biotinylé de souris anti-IgG de rat (PharMingen International #10042S), à une dilution de 1:200 et nous avons laissé incuber les coupes pendant 30 minutes à température de la pièce. Pour toutes les étapes ultérieures, nous avons appliqué les mêmes conditions décrites précédemment. Excepté que, pour révéler la réaction, la DAB avec 50 μl de chlorure de nickel à une concentration de 80mg/ml ($\text{NiCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a été utilisée.

II.vi. Induction de la réaction d'hypersensibilité retardée (DTH)

Pour cette étude nous avons utilisé 16 souris, dont 5 de la lignée RV-105, 6 de la lignée RV-106 et 5 souris contrôle Ntg, toutes âgées de 70 jours et de poids entre 28 et 30g.

L'antigène choisi pour induire la réaction d'hypersensibilité, a été l'albumine bovine sérique (ABS) (Laboratoire Boehringer Mannheim, Cat. # 735 086). À partir d'une solution mère à 25% ABS, nous avons préparé une solution à 1% dans l'eau stérile et nous l'avons mélangée volume/volume avec l'adjuvant complet de Freund (Laboratoire Difco, cat. 0638-60-7). Chaque souris a reçu, par voie sous-cutanée, un volume total de 100 μl de ce mélange d'ABS 1% et d'adjuvant de Freund.

Vingt et un jours après l'inoculation, nous avons induit la réaction d'hypersensibilité retardée (DTH) selon le protocole décrit par Lane, (1988). Chaque souris a reçu une

injection intradermique de 30 μ g d'ABS dans un volume de 50 μ l d'eau stérile dans le coussinet plantaire postérieur droit.

Pour évaluer le degré de tuméfaction due à la réaction DTH, les coussinets plantaires des pattes postérieures droites des souris ont été mesurés avant l'injection (temps 0) et 24 et 48 heures après l'injection intradermique, en utilisant un pied coulissant digital de précision (calibreur de Vernier). Conformément au protocole (Lane, 1988), les souris ont été sacrifiées 48 heures post-injection intradermique. La patte injectée, la rate, le thymus et la peau ont été recueillis pour l'histopathologie. Les pattes ont été fixées dans la formaline pendant 24 heures, décalcifiées dans une solution aqueuse d'acide formique à 10% pendant 24 heures, avant d'être disséquées et incluses dans la paraffine. Pour l'analyse statistique des données recueillies dans cette étude, nous avons utilisé la méthode d'analyse de variance (ANOVA) et Bonnferroni pour évaluer la signification des différences dans les tuméfactions induites. La sévérité des tuméfactions a été évaluée par la différence entre les mesures des coussinets prises aux temps 0, 24 h et 48 h après l'injection de l'antigène.

III. Résultats

III.i. Développement des lignées de souris porteuses du transgène Vpu: Expression du transgène et établissement de la colonie transgénique

Comme cela a été mentionné précédemment, la pathogenèse induite par le virus VIH-1 est complexe et affecte de nombreux organes et fonctions des patients qui en sont atteints. En l'absence de modèles animaux pouvant reproduire l'atteinte induite chez l'humain, plusieurs laboratoires ont eu recours aux modèles de souris transgéniques porteuses du génome partiel ou de gènes individuels de HIV-1. Dans le but de mieux comprendre les effets pathogènes possibles de Vpu, nous avons développé plusieurs lignées de souris transgéniques porteuses du gène vpu.

Avec le transgène RSV-vpu (RV) nous avons obtenu 4 fondateurs, RV96, RV105, RV106 et RV719. Avec le transgène SL3-3-vpu (SV), aucun fondateur transgénique n'a été trouvé parmi les 95 embryons issus des différents essais de micro-injection de ce transgène. Il nous est donc apparu que la présence du transgène SV était incompatible avec la survie des embryons. Pour vérifier ce point nous avons remplacé, dans la construction SL3-vpu, le gène vpu par le gène vpr de HIV-1. Avec cette construction, nous avons obtenu plusieurs fondateurs porteurs de SL3-vpr et généré plusieurs lignées de souris porteuses du transgène SL3-vpr. Ceci suggère qu'avec le promoteur SL3, Vpu a probablement induit une létalité précoce *in utero*, ce qui n'a pas permis d'avoir des fondateurs transgéniques.

Les fondateurs RV ont été rétro-croisés avec les souris C3H pour établir les colonies de souris homozygotes. La colonie de souris contrôles a été développée dans les mêmes conditions.

Les diverses colonies des souris transgéniques et non transgéniques (contrôles) ont été maintenues avec de l'eau et de la nourriture stérilisées et ont été gardées en environnement sans pathogènes pour éviter des infections qui invalideraient les études de pathogenèse. Des contrôles sérologiques microbiologiques réguliers ont permis de vérifier l'absence de pathogènes dans ces animaux (virus Sendai, virus de

l'hépatite (MHV), réovirus-3, virus minute de la souris (MVM), poxvirus de la chorioméningite-lymphocytaire (LCMV), virus éctromélie, virus de la diarrhée épidémique des nourrissons (EDIM), parvovirus murin (MPV), virus de la nécrose thymique de souris (MTLV), pneumovirus murin (MPV), coronavirus, bacille respiratoire associé aux cils (CARB), *M. pulmonis* et *E. cuni*. (Tableau I).

Les diverses études effectuées pour caractériser les différentes lignées de souris RV (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit) ont permis de faire les observations suivantes:

i) Le profil d'intégration du transgène dans le génome des souris est différent pour chacune des lignées obtenues.

ii) Les quatre lignées ont démontré l'expression de mRNA vpu dans tous les tissus examinés, mais avec des profils d'expression qui varient selon les lignées. Ainsi donc, RV-105 et RV-96 expriment le mRNA vpu plus fortement dans le cerveau, les poumons, la rate, les reins, le thymus, et plus faiblement dans le foie, le cœur et les muscles squelettiques. Les deux autres lignées, RV-106 et RV-719, expriment le mRNA transgénique plus fortement dans le foie (RV-106) et dans le thymus et la rate (RV-719).

iii) Dans les deux lignées représentatives (RV-105 et RV-106) qui ont été analysées, l'expression de l'ARNm et de la protéine Vpu a été détectée, respectivement, dans les extraits d'ARNm et dans les fractions microsomales de tous les tissus testés (cerveau, poumon, rein, thymus et rate) (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit). De plus, ces mêmes techniques ont été utilisées pour examiner les populations leucocytaires : les cellules-B, CD4, CD8, macrophages et cellules dendritiques. De toutes ces lignées leucocytaires, seules les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD8 ont montré un signal détectable par RT-PCR (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit). D'autres cellules qui ont démontré un signal détectable d'ARNm vpu par hybridation *in situ* ont été quelques neurones et cellules épendymaires de ventricules cérébraux, les cellules épithéliales de bronchioles et des pneumocytes, les cellules réticulées du centre germinatif folliculaire de la rate et de cellules endothéliales et du muscle lisse des artérioles rénales (Lemaire, Ch. *et al.* manuscrit).

Tableau I. Résultats sérologiques pour le contrôle sanitaire chez les souris Tg et Ntg

Agent	Analyse	
	ELISA	IFA
Virus Senday	-	
PVM	-	
MHV	-	
MVM	-	
GD-7	-	
REO-3	-	
MPUL	-	
LCMV	-	
ECTRO	-	
K	-	
POLY	-	
MAD	-	
EDIM	-	
MCMV	-	
HANT	-	
<i>E. cuni</i>	-	
MTLV		-
CARV	-	
MPV	-	
Coronavirus	-	
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	-	
Négatif	-	

Ces analyses ont été réalisées par Charles River Laboratories

III.ii. Immunodétection de la protéine Vpu

a) Immunohistochimie

Pour identifier les cellules exprimant la protéine Vpu, des essais d'immunodétection ont été effectués par les techniques d'immunofluorescence indirecte et d'immunoperoxydase en utilisant un antisérum monospécifique anti-Vpu dans les conditions décrites dans la section III. ii.i. dans Matériel et Méthodes. Malgré les nombreuses tentatives, aucun signal significatif n'a pu être obtenu. Ceci suggère que dans ces tissus, Vpu est produit en trop faible quantité pour que ces techniques puissent la détecter.

Pour compléter ces tentatives de détection de la protéine Vpu dans les tissus transgéniques, nous avons effectué des réactions d'immunoperoxydase suivies de réaction d'amplification du signal par la FITC-tyramide. Des échantillons de tissus positifs pour l'expression de mRNA vpu ont été prélevés chez les souris transgéniques RV-105 et RV-106 et les souris contrôles, toutes âgées de 7 et 30 jours. Les réactions ont été effectuées sur des coupes de tissus congelés et des tissus paraffinés en utilisant l'anticorps monospécifique de lapin anti-Vpu. Là encore, malgré les nombreuses tentatives et essais de conditions de réaction, nous n'avons pas obtenu de résultats concluants. L'anticorps anti-Vpu a réagi avec des structures cellulaires même au niveau des tissus contrôles. Des anticorps anti-Vpu de meilleure spécificité que celui qui nous a été fourni n'étant pas disponibles, il ne nous a donc pas été possible d'avoir une localisation claire des cellules exprimant Vpu.

b) Immunobuvardage pour la détection de Vpu

Les techniques d'immunohistochimie n'étant pas assez sensibles pour détecter la protéine Vpu, nous avons utilisé la méthode de Western blot sur des extraits de microsomes isolés à partir de tissus de cerveau, rate, poumon, thymus. Pour obtenir de quantités suffisantes d'extraits de microsomes, plusieurs organes ont été collectés pour extraire les microsomes de chacun de ces tissus. Ces extraits ont été préparés à

partir de tissus provenant de souris âgées soit d'un jour, un mois ou dix mois. Pour les souris d'un jour, les organes à partir de 30 souris ont été récoltés, pour les souris plus âgées, 10 à 15 animaux ont été utilisés pour la collecte d'organes (poumon, cerveau, rate, thymus et poumon). Les extraits de tous ces tissus analysés ont démontré un signal de la protéine Vpu (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit).

III.iii. Évaluation clinique, anatomo-pathologique et histopathologique

Nous avons utilisé pour cette étude 151 souris femelles et mâles à différents âges dont 120 souris transgéniques (Tg) et 31 non transgéniques (Ntg) à titre de groupe contrôle. Ces souris Tg proviennent de quatre lignées différentes : vingt-sept souris de la lignée RV-96, trente-cinq de la lignée RV-105, vingt-huit de la lignée RV-106 et trente de la lignée RV-719.

Durant toute la durée de nos études, les animaux transgéniques et contrôles ont été soigneusement suivis sur le plan clinique afin de surveiller tout signe pathologique significatif pour notre étude. Aucune des lignées de souris portant le gène vpu et de même que les souris contrôles n'ont montré de signes cliniques pathologiques ou de malformations anatomiques à l'exception d'une distension abdominale plus ou moins marquée chez plusieurs souris dans chacune des lignées transgéniques.

L'examen anatomopathologique de ces animaux a permis de noter une splénomégalie allant de légère (2.0 x 0.4 cm) à très sévère (3.0 x 0.7 cm). Cette splénomégalie a été observée chez 16/25 souris RV-96, 19/34 RV-105, 18/28 RV-106, 15/30 RV-719). Aucun cas de splénomégalie n'a été observé chez les souris non transgéniques (1.5 x 0.3 cm) (figure 3 A). Les animaux avec une distension abdominale évidente présentaient une splénomégalie sévère (figure 3 B).

Dans les autres organes examinés (cerveau, coeur, poumons, reins, estomac, intestins, foie, pancréas, testicules, utérus, muscles et peau), aucune altération macroscopique n'a été observée.

III.iii.i. Exploration histopathologique chez des souris porteuses de vpu

Dans un premier temps, cette exploration a été effectuée pour recenser toutes les lésions présentes chez les animaux transgéniques et/ou les souris contrôles, sans tenir compte de leur âge ou leur sexe. Ce premier examen exploratoire a été effectué sur des coupes paraffinées colorées au HPS des organes suivants: la rate, le thymus, les poumons, le foie, les reins, le cerveau, les muscles, les intestins, la peau. Pour établir la fréquence de ces lésions et leur relation éventuelle à la présence du transgène, nous avons effectué l'examen histopathologique de tous ces organes chez 27 souris RV96, 35 souris RV105, 28 souris RV106, 30 souris RV719 et 31 souris non transgéniques. Les données recueillies de cette première exploration révèle une hyperplasie du tissu lymphoïde évidente et fréquente dans plusieurs organes dont la rate, les poumons, le foie, les reins, les plaques de Peyer quand ces derniers étaient retrouvés sur les coupes. La peau, les muscles et le thymus ont toujours présenté une morphologie d'apparence normale. Dans les coupes du cerveau nous avons noté chez quelques souris au niveau du thalamus la présence de calcifications intra-vasculaires et de corps d'inclusions intracytoplasmiques dans les neurones (tableaux II et III).

a) Histomorphométrie de la rate

Les rates de toutes les souris transgéniques incluses dans cette étude ont été examinées et la lésion la plus évidente et la plus fréquemment a été l'hyperplasie lymphoïde plus ou moins importante selon le degré de splénomégalie observée chez ces animaux. Chez les animaux avec splénomégalie sévère cette hyperplasie lymphoïde était pansystémique et les rates avaient une pulpe blanche très abondante avec augmentation du nombre et de la taille des follicules. Ceci était accompagné par une désorganisation à des degrés variables de la structure de la pulpe blanche (fig. 4 B, D, H). Aucune des souris non transgéniques n'a démontré des anomalies similaires (fig. 4 A, C, G). Plusieurs souris transgéniques (Tg) et quelques souris contrôles (NTg), sans présenter de splénomégalie significative, ont montré une légère hyperplasie lymphoïde, avec un nombre de follicules légèrement supérieur à la normale, tout en gardant une architecture normale. Dans l'ensemble, cette hyperplasie

lymphoïde est plus fréquente dans les souris Tg que dans les souris NTg. Ainsi parmi les animaux examinés, 16/25 RV-96, 19/34 RV-105, 18/34 RV-106 et 15/30 RV-719 ont démontré cette hyperplasie. Dans les souris NTg seulement 8/31 souris ont montré l'hyperplasie lymphoïde (Tableau III).

D'autres souris Tg et NTg, par contre, ont montré un nombre diminué de follicules (1 à 2 par section), suggérant plutôt une atrophie de la rate (fig. 5).

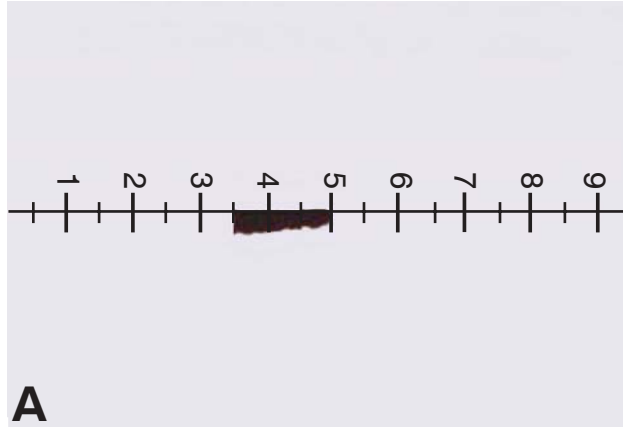
Cette variation dans le nombre des follicules suggère que certaines souris étaient en train de développer une hyperplasie lymphoïde folliculaire alors que dans d'autres, au contraire une atrophie splénique était plutôt évidente (fig. 5). Il faut signaler ici qu'avec l'âge, les souris développent une atrophie sénile de la rate, caractérisée par une diminution du nombre et de la taille des follicules (1 à 2 par section) et par une diminution du nombre de cellules dans la pulpe rouge.

Cette variation dans la présentation des follicules nous a incités à utiliser une analyse morphométrique pour mieux évaluer les lymphoproliférations spléniques (tableau II). Étant donné que nous n'avons pas trouvé d'études morphométriques élaborées pour évaluer les hyperplasies lymphoïdes, nous avons développé une approche basée sur le nombre et l'état histopathologique des follicules. C'est à l'aide de cette méthode que nous avons déterminé les fréquences des hyperplasies dans la rate, l'organe lymphoïde cible, pour évaluer l'état de la lymphoprolifération dans cet organe et les autres tissus inclus dans l'évaluation histopathologique des souris Tg et Ntg (tableau II).

Tableau II. Caractéristiques histomorphométriques chez les animaux du groupe contrôle

Rate:	<ul style="list-style-type: none"> • hyperplasie folliculaire (présence de quatre follicules ou plus).
Rein:	<ul style="list-style-type: none"> • hyperplasie lymphoïde (présence de manchons lymphoïdes dans le bassinet rénal. • épaissement mésangial glomérulaire (cinq ou plus glomérules avec un épaissement mésangial sur vingt glomérules).
Poumon:	<ul style="list-style-type: none"> • hyperplasie du tissu lymphoïde bronchio-alvéolaire (TLBA), (présence de TLBA). • hyperplasie du tissu lymphoïde périvasculaire pulmonaire (TLPV), (présence de TLPV).
Foie:	<ul style="list-style-type: none"> • présence des lymphoproliférations dans l'espace porte. • hépatite (nécrose des hépatocytes, infiltrations par de neutrophiles, macrophages et lymphocytes.
Cerveau:	<ul style="list-style-type: none"> • présence de calcifications intra-vasculaires dans la région du thalamus. • présence des corps d'inclusion intracytoplasmiques dans les neurones de la région thalamique

Fig. 3. Splénomégalie: A: rate à grandeur normale de souris Ntg (1x). B: rate de souris Tg avec splénomégalie sévère (flèche) (1x).



A



B

b) Histomorphométrie des reins

Dans les reins, l'hyperplasie lymphoïde a été retrouvée dans la région périvasculaire du bassinet rénal. Cependant ces proliférations lymphoïdes n'envahissent ni ne compriment les parois vasculaires ou le parenchyme rénal (figure 4 D). Chez les souris Ntg, 16/31 ont présenté quelques amas de lymphocytes dans le tissu rénal. La fréquence de cette lésion a été évaluée dans la population de souris Tg examinée. Elle a été retrouvée dans 18/26 RV-96, 22/35 RV-105, 25/28 RV-106, 22/30 RV-719 (tableau III). Globalement, la lymphoprolifération apparaît être plus remarquable et plus fréquente dans les souris Tg comparativement aux souris contrôles.

Une autre altération histopathologique très fréquemment observée dans les reins, est la présence de plusieurs glomérules hypertrophiés avec une hyperplasie de cellules mésangiales et un épaississement de la matrice mésangiale (figure 4 F). Pour mieux caractériser cette atteinte glomérulaire nous avons effectué la coloration au PAS, la recherche d'Ig et la microscopie électronique. La coloration au PAS a démontré la présence d'un matériel rouge (mucopolysaccharides) dans les glomérules affectés (figure 4 F), et l'immunofluorescence pour la détection des immunoglobulines (IgA, IgM et IgG) dans les glomérules, a également été positive pour ces espèces d'Igs (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit). De plus, la microscopie électronique a démontré un épaississement focal de la membrane basale du glomérule (dépôts électrodenses) (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit). Par contre l'examen microscopique des tubules rénaux n'a révélé aucune modification notable.

Compte tenu de ces résultats, nous avons cherché à savoir s'il y avait une protéinurie associée à ces atteintes glomérulaires. Les analyses des prélèvements d'urines n'ont pas démontré d'altérations significatives par rapport aux souris contrôles Ntg (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit).

L'épaississement de la matrice mésangiale dans les glomérules constitue une altération fréquemment retrouvée chez les souris (Tg et Ntg). Cet épaississement de la substance mésangiale peut affecter un nombre très variable de glomérules (0-10 parmi 20 ou 30 glomérules examinés). Cette variation du nombre de glomérules atteints chez les souris Tg nous a également incités à utiliser une approche morphométrique adaptée à notre modèle animal (tableau II). Cette approche nous a

permis d'établir la fréquence de cette lésion. L'épaississement de la matrice mésangiale est plus fréquemment rencontré chez les souris Tg de toutes les lignées comparativement aux souris NTg. Les données colligées montrent que 17/26 RV-96, 26/35 RV-105, 24/28 RV-106, 26/30 RV-719 ont cette atteinte des glomérules comparativement à 16/31 souris NTg (tableau III).

c) Histopathologie des poumons

L'examen histopathologique des poumons a montré la présence des manchons lymphoïdes importants péribronchiolaires et/ou périvasculaires avec une légère compression (figure 3 H) et parfois infiltration du parenchyme pulmonaire.

La présence de ces manchons lymphoïdes, signalant une hyperplasie lymphoïde dans cet organe, est fréquente chez les deux groupes de souris Tg et Ntg, mais elle est plus fréquemment observée chez les animaux Tg (tableau III). On retrouve principalement ces manchons autour des bronches (RV-96 13/27, RV-105 28/35, RV-106 21/26, RV-719 23/30 et NTg 13/31) et des vaisseaux (RV-96 12/27, RV-105 25/35, RV-106 19/26, RV-719 20/30 et NTg 9/31), causant une légère infiltration du parenchyme pulmonaire (figure 4H) plus marquée chez les souris Tg. Ces hyperplasies lymphoïdes sont caractérisées par une augmentation de la taille des manchons lymphoïdes péribronchiques, sans comprimer les parois bronchiques ou vasculaires. Ces modifications avec ce niveau de sévérité n'ont jamais été observées dans les souris normales contrôles.

d) Histopathologie du foie

Dans le foie, des manchons lymphoïdes ont été observés dans la région périvasculaire de l'espace porte mais, plus souvent, il y a un envahissement multifocal disséminé du parenchyme hépatique par des cellules de type lymphoïde. Aucune souris Ntg n'a présenté ce degré de sévérité de la lymphoprolifération. Ces hyperplasies lymphoïdes observées principalement dans la région périvasculaire de l'espace porte sont presque aussi fréquentes chez les souris Tg et NTg (RV-96 3/14, RV-105 12/23, RV-106 10/19, RV-719 7/12 et Ntg 12/28) (tableau III). Par contre, la prolifération lymphoïde

ne produit aucune infiltration ou compression des parois vasculaires et du parenchyme hépatique.

Nous avons aussi remarqué une autre altération histopathologique fréquente chez les souris Tg et Ntg: une hépatite nécrotique multifocale très légère, caractérisée par la nécrose de petits groupes d'hépatocytes (2-5 cellules) trouvée occasionnellement dans le parenchyme. Ces foyers nécrotiques sont accompagnés d'un petit nombre de macrophages et de neutrophiles. Bien que cette hépatite soit fréquente (tableau III), elle ne revêt aucune importance clinique.

Les colorations histochimiques Gram et Giemsa du foie, ainsi qu'une série de tests sérologiques pour la détection de l'infection par des pathogènes spécifiques, n'ont mis en évidence aucun agent pathogène (tableau I).

e) Histopathologie des autres organes

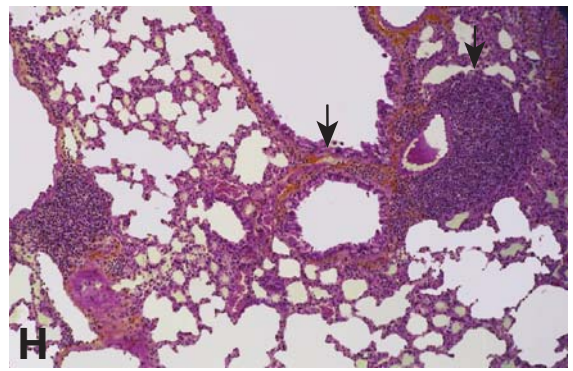
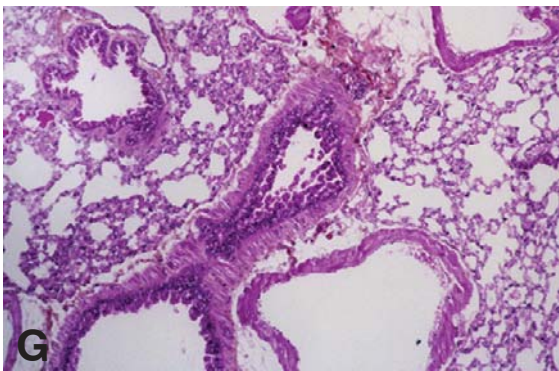
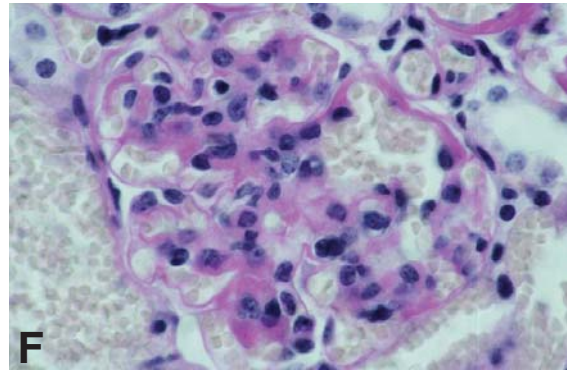
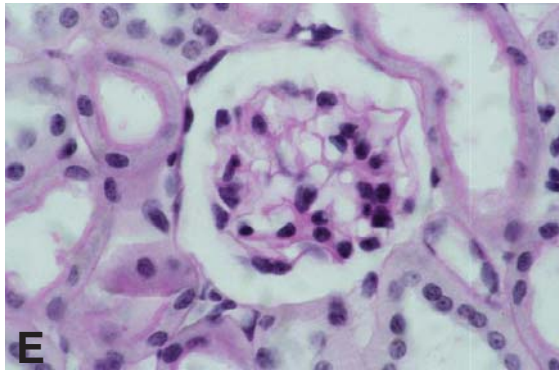
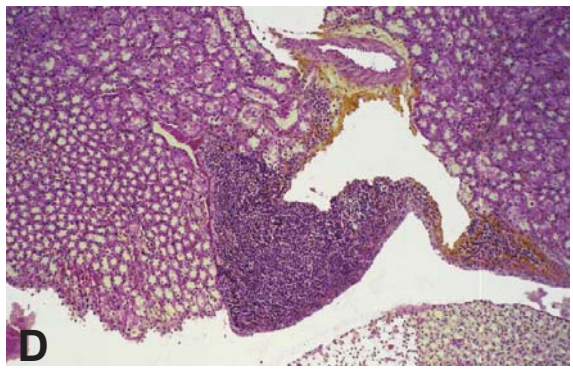
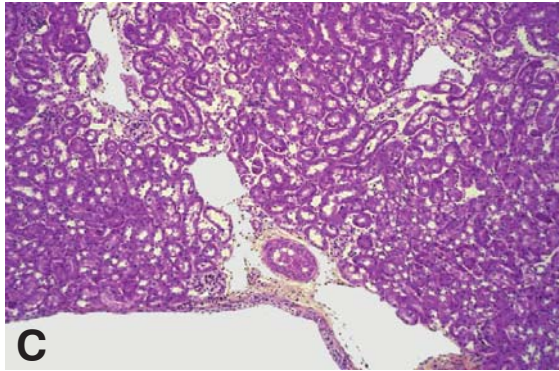
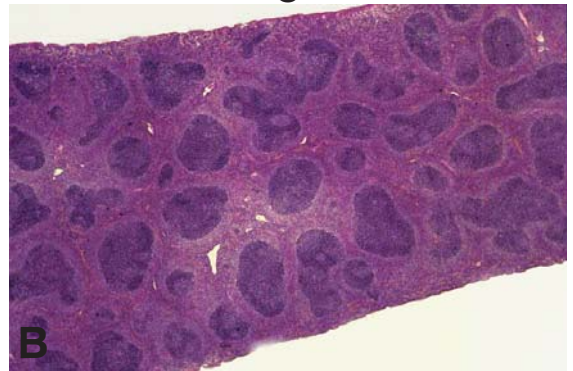
Tous les autres organes (thymus, peau, cerveau) examinés dans cette première étude exploratoire n'ont montré aucune lésion histologique significative et de ce fait nous ne les avons pas inclus dans nos investigations ultérieures. Dans le cas du cerveau, les calcifications des petits vaisseaux sanguins trouvés dans la région du thalamus ont été trouvées chez les souris Tg et Ntg et nous avons noté que leur fréquence augmentait avec l'âge chez toutes les souris.

Fig. 4. Altérations histopathologiques: hyperplasie lymphoïde marquée pansystémique et altérations glomérulaires. Les tissus en A, B, C, D, G et H ont été colorés au HPS. Les tissus en E et F ont été colorés au PAS. A: rate normale de souris Ntg (50x). B: splénomégalie et hyperplasie folliculaire (50x). C: rein normal de souris Ntg (200x). D: rein avec infiltration lymphoïde marquée, dans la région du bassinnet de souris Tg (200x). E: glomérule normal de souris Ntg (2000x). F: glomérule hypertrophié avec hyperplasie de cellules mésangiales et expansion de la matrice mésangiale de souris Tg (2000x). G: poumon normal de souris Ntg (200x). H: poumon de souris Tg, avec des infiltrats lymphoïdes marqués, péribronchiolaires (flèche à droite). La flèche à gauche montre une paroi bronchiolaire (200x).

Ntg



Tg



Dans l'analyse anatomopathologique et histopathologique, nous avons pu constater que des cas splénomégalie sévère avec une lymphoprolifération très importante avec une perte à différents degrés de la structure normale des follicules dans les différentes lignées de souris Tg portant le gène vpu. Ces mêmes analyses ont montré que souris Tg de toutes les lignées ont développé une lymphoprolifération significative dans plusieurs organes. Cette hyperplasie lymphoïde pansystémique suggère une stimulation constante ou chronique du système immunitaire; cette stimulation immunitaire n'est associée à aucun pathogène spécifique puisque les tests de contrôle sérologique n'ont montré la présence d'aucun germe (tableau I). De plus, malgré la différence d'intégration et du patron d'expression du transgène vpu dans les quatre lignées Tg (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit), toutes démontrent le même phénotype pathologique. Ceci suggère que les lésions lymphoprolifératives pourraient être reliées à la présence du transgène vpu dans ces lignées.

Tableau III. Fréquences d'altérations histopathologiques chez les souris Tg-vpu et Ntg tous âges confondus

Lignée	Lésions Lymphoprolifératives				Lésions Inflammatoires			
	Spléniques	Pulmonaires Péribronchiques	Pulmonaires Périvasculaires	Rénales Périvasculaires	Hépatiques	Hépatique Hépatite	Autres Rénale GNMP*	
RV-96	16/25 (64%)	13/27 (48%)	12/27 (44%)	18/26 (69%)	3/14 (21%)	3/14 (21%)	17 (65%)	
RV-105	19/34 (56%)	28/35 (80%)	25/35 (71%)	22/35 (62%)	12/23 (52%)	11/23 (48%)	26 (74%)	
RV-106	18/28 (64%)	21/26 (81%)	19/26 (73%)	25/28 (89%)	10/19 (53%)	6/19 (32%)	24 (86%)	
RV-719	15/30 (50%)	23/30 (77%)	20/30 (67%)	22/30 (73%)	7/12 (58%)	6/12 (50%)	26 (87%)	
Ntg	8/31 (25%)	13/31 (42%)	9/31 (29%)	16/31 (52%)	12/28 (43%)	7/28 (25%)	16 (52%)	

* GNMP glomérulonéphrite membranoproliférative

III.iii.ii. Analyse de la lymphoprolifération folliculaire de la rate

Étant donné que la lymphoprolifération constitue l'altération principale dans ce modèle de souris transgéniques nous avons tenu à mieux la définir en termes de fréquence selon l'âge des animaux, de caractéristiques histopathologiques et immunopathologiques dans la rate, l'organe lymphoïde où elle était la plus évidente.

1) Fréquence de la lymphoprolifération selon l'âge

Notre investigation exploratoire préliminaire ayant laissé suggérer un processus évolutif en fonction de l'âge, nous avons subdivisé la population de souris transgéniques et contrôles en trois catégories d'âge: 2 à 6 mois (groupe A), 7 à 12 mois (groupe B) et 13 à 22 mois (groupe C). Pour chaque souris transgénique ou contrôle inclus dans cette étude, nous avons analysé trois sections transversales de rate prises à des niveaux de coupe différents. Les sections ont été colorées au HPS.

Dans une première étape nous avons examiné les rates des souris normales dans les trois catégories d'âge retenues pour bien établir l'histomorphologie normale de la rate de souris en fonction de l'âge. Les paramètres considérés sont le nombre, la taille et la structure des follicules. Étant donné qu'une minorité de souris Ntg présentait une hyperplasie lymphoïde avec plus de quatre follicules (tableau III), nous avons considéré que les rates dont les sections avaient quatre follicules ou plus ont de l'hyperplasie lymphoïde folliculaire. Ce nombre minimum de follicules a été établi après avoir examiné par histopathologie les rates de trente et une souris Ntg contrôles. Vingt huit d'entre elles (75%) avaient des sections de rate avec trois follicules ou moins et ont donc été considérées normales. Les huit autres souris (25%) de ce groupe ont présenté des sections de rate avec quatre follicules ou plus et ont été considérées hyperplasiques. Les souris Tg de toutes les lignées tous âges confondus, ont montré de l'hyperplasie plus fréquemment que les souris Ntg avec des fréquences allant de 50% à 64% (RV-96 64%, RV-105 56%, RV-106 64%, RV-719 50%) (tableau IV).

L'examen histologique des rates de souris à l'intérieur des groupes d'âge définis a montré les résultats suivants:

a) Dans le groupe A (0-6 mois), des cas d'hyperplasie lymphoïde folliculaire ont été retrouvés chez les souris Tg et Ntg. Cependant ces cas d'hyperplasies avec un nombre de follicules égal ou supérieur à quatre sont plus fréquemment observés parmi les souris Tg de toutes les lignées (RV-96 67%, RV-105 63%, RV-106 44%, RV-719 53% et Ntg 36%) (tableau IV). La population cellulaire folliculaire est constituée principalement de petits lymphocytes.

b) Dans le groupe B (7-12 mois), les résultats sont variables; certaines rates présentent une augmentation du nombre de follicules (hyperplasie) alors que d'autres montrent soit un nombre normal de follicules soit une atrophie avec une diminution du nombre et de la taille de follicules. Il demeure tout de même que l'hyperplasie est présente dans 64% de RV-96, 56% de RV-105, 64% de RV-106, 50% de RV-719 et 25% de Ntg (tableau IV).

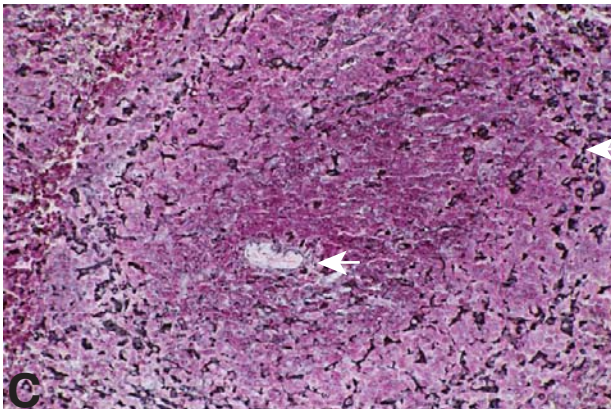
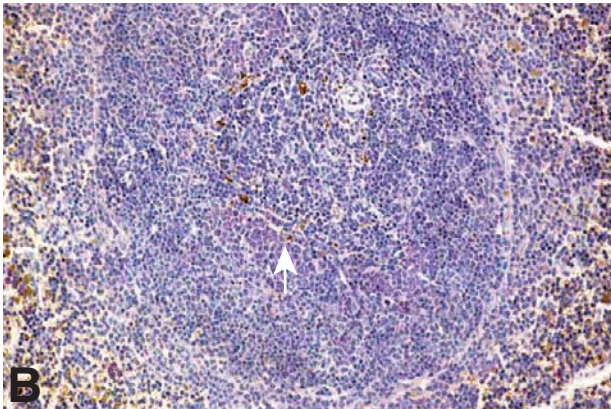
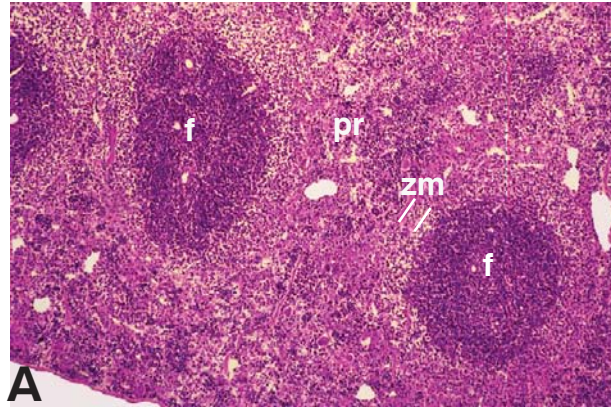
c) Dans le groupe C (13-24 mois), nous avons observé dans toutes les lignées de souris Tg (tableau IV), une fréquence plus élevée de lymphoproliférations comparativement aux souris Ntg (RV-96 92%, RV-105 88%, RV-106 92%, RV-719 44% et Ntg 0%) (tableau IV). Nous avons remarqué non seulement une augmentation du nombre et de la taille des follicules mais aussi des caractéristiques histopathologiques variables allant jusqu'à la perte de l'architecture normale (tableau V). Par contre, aucune souris Ntg de ce groupe n'a développé d'hyperplasie. À cet âge, ces animaux ont montré plutôt une atrophie sénile de la rate, caractérisée par une diminution du nombre et de la taille des follicules (1 à 2 par section) et par une diminution du nombre de cellules dans la pulpe rouge (figure 5).

Cette étude nous a permis de voir que la lymphoprolifération est plus fréquente chez les souris Tg comparativement aux souris Ntg à tous les groupes d'âges considérés. De plus cette fréquence est nettement plus marquée chez les souris Tg de 12 mois et plus. Dans ces souris l'atrophie sénile normalement observée chez les souris normales, ne semble pas se produire, suggérant un effet de stimulation lymphoproliférative prolongée qui n'est pas observé dans les souris Ntg contrôle (tableau IV).

Tableau IV. Fréquence et distribution des lymphoproliférations folliculaires spléniques par groupe d'âge et par lignée

Lignée	Groupes d'âge (en mois)							
	A (2-6)		B (7-12)		C (13-22)		A+B+C (2-22)	
RV-96	4/6	(67%)	1/7	(14%)	11/12	(92%)	16/25	(64%)
RV 105	5/8	(63%)	7/18	(39%)	7/8	(88%)	19/34	(56%)
RV-106	4/9	(44%)	3/7	(43%)	11/12	(92%)	18/28	(64%)
RV-719	3/6	(50%)	8/15	(53%)	4/9	(44%)	15/30	(50%)
Ntg	4/11	(36%)	4/11	(36%)	0/9	(0%)	8/31	(25%)

Fig. 5. Atrophie sénile de la rate chez les souris Ntg âgées (16 mois). A: grands follicules (f) dispersés, zone marginale (zm) évidente mais peu peuplée, pulpe rouge (pr) moins peuplée, (coloration HPS) (200x). B: grand follicule avec quelques cellules centro-germinatives au cytoplasme rouge pâle (flèche), (coloration VMP) (500x). C: grand follicule, avec une organisation normale des cellules métallophiliques (flèche à droite), très peu de cellules métallophiliques périartériolaires (flèche au centre), (argentation de Marshall modifiée (500x).



2) Caractéristiques histopathologiques des lymphoproliférations spléniques

Pour cette étude nous avons sélectionné deux lignées transgéniques représentatives, RV 105 et RV 106, qui ont le même phénotype pathologique, qui sont homozygotes pour le transgène et qui se reproduisent facilement.

Nous avons examiné 19 rates hyperplasiques de la lignée RV-105, 18 de la lignée RV-106 et 8 du groupe contrôle.

Parmi ces 35 cas de lymphoprolifération, nous avons distingué trois degrés de sévérité dans les trois groupes d'âge (tableau V):

- a).- l'hyperplasie folliculaire.
- b).- la prolifération lymphomateuse mais avec maintien de la structure splénique (Castleman-like).
- c).- la lymphoprolifération avec perte de la structure normale splénique (lymphomes).

a) **Hyperplasie folliculaire:** dans cette catégorie, sont inclus 12 cas de la lignée RV-105, 9 de RV-106 et 8 dans le groupe contrôle Ntg (tableau V); tous présentent une augmentation du nombre de follicules mais sans splénomégalie. La région du manteau à l'intérieur des follicules est composée principalement de lymphocytes de taille petite à moyenne. Le centre germinatif des follicules est constitué de grandes cellules centro-folliculaires à cytoplasme peu abondant. La pulpe rouge démontre la présence de plusieurs foyers de cellules érythropoïétiques, une quantité légère à modérée de mégacaryocytes, des neutrophiles, quelques cellules histiocytaires et plasmocytaires et une hémossidérose légère. L'espace interfolliculaire est, quant à lui, préservé. Chez certaines souris transgéniques, tous ces éléments sont légèrement plus abondants, avec les centres germinatifs plus volumineux et la zone marginale plus large. L'espace interfolliculaire, dans ces cas, est légèrement réduit. Dans ces cas aussi, la pulpe rouge contient plusieurs foyers de cellules érythropoïétiques, des mégacaryocytes, des neutrophiles, des cellules histiocytaires et plasmocytaires. L'hémossidérose reste légère ou modérée. Comparativement aux souris Ntg, l'argention de Marshall chez les souris Tg a mis en évidence une désorganisation et

une plus grande quantité de cellules métallophiles (cellules dendritiques et macrophages) de façon marquée dans les follicules. Quant à la coloration au vert de méthyl-pyronine, elle colore l'ARN en rouge et est utilisée pour identifier les plasmocytes qui synthétisent beaucoup d'ARN pour produire des protéines (Prento, P. et Lyon, H. O. 2003). Dans nos coupes, elle a révélé une quantité très variable de plasmocytes dans la pulpe rouge et dans les follicules de la rate des souris Tg, et un plus grand nombre chez les souris Ntg, particulièrement dans les grands centres germinatifs des follicules (figures 6 A à F).

Fig. 6. Hyperplasie lymphoïde splénique:

A, C, E: rates de souris Ntg contrôle.

B, D, F: rates de souris Tg.

A et B coloration au HPS.

C et D coloration au VMP.

E et F argentation de Marshall modifiée.

A: souris Ntg avec plusieurs follicules volumineux et ses structures (pr: pulpe rouge, cg: centre germinatif, m: manteau, zm: zone marginale). Le centre germinatif est très bien développé (200x). L'encadré droit: détails folliculaires (2000x).

B: souris Tg avec plusieurs follicules volumineux et ses structures (pr: pulpe rouge, cg: centre germinatif, m: manteau, zm: zone marginale). Le centre germinatif est mal défini (200x). L'encadré droit: détails folliculaires (2000x).

C: souris Ntg avec des follicules volumineux et de nombreuses cellules riches en ribosomes qui donnent une coloration rouge au cytoplasme, coloration au VMP (500x). L'encadré droit: détails cellulaires (2000x).

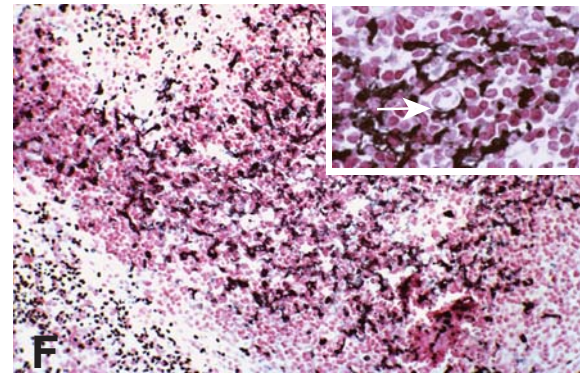
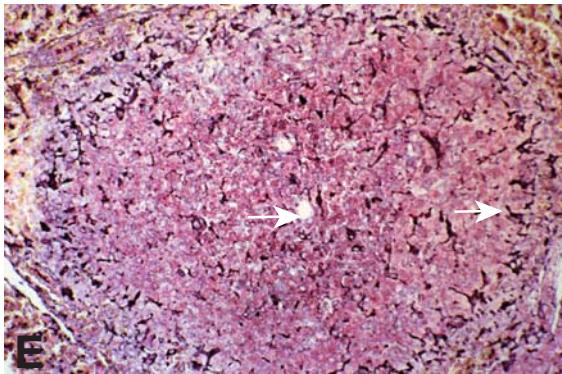
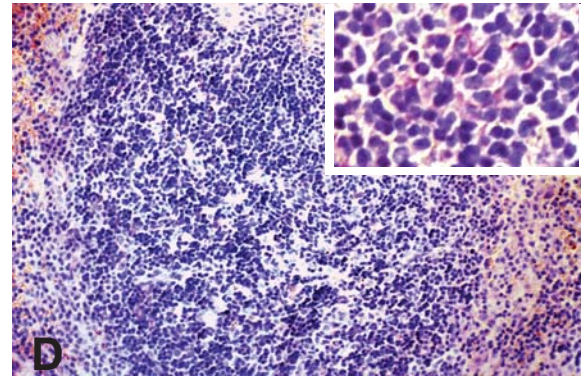
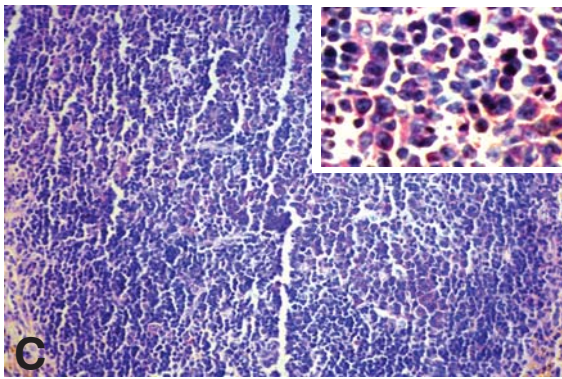
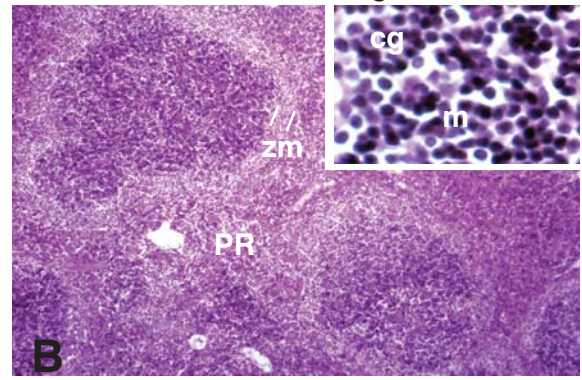
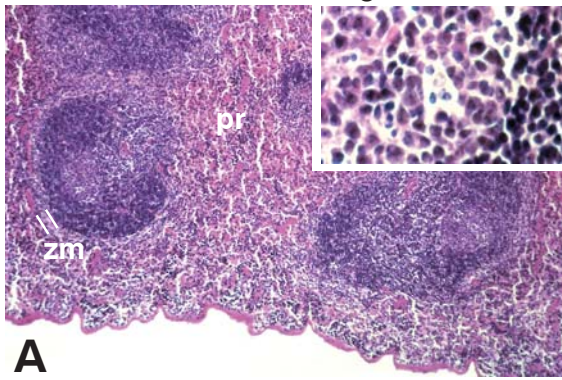
D: souris Tg avec un follicule volumineux et très peu de cellules positives (coloration rouge du cytoplasme) (500x). L'encadré droit: détails cellulaires (2000x).

E: souris Ntg avec un grand follicule et son organisation de cellules métalophiliques colorées en noir. La flèche au milieu montre une artériole folliculaire. La flèche à droite montre une cellule métalophile dans l'espace périfolliculaire (500x).

F: souris Tg avec un grand follicule présentant une désorganisation et une apparence d'hyperplasie des cellules métalophiliques colorées en noir (500x). Dans l'encadré droit, une artériole folliculaire (MLPA) présente des cellules métalophiles périvasculaires (2000x).

Souris Ntg

Souris Tg



b) Prolifération lymphomateuse avec maintien de la structure splénique

Dans cette catégorie, nous avons identifié 3 cas dans la ligné RV-105, 3 cas dans RV-106 et aucun chez les souris Ntg (tableau V).

Ces hyperplasies lymphomateuses sont caractérisées par une splénomégalie modérée à sévère et une augmentation du nombre et de la taille des follicules. Ces derniers sont confluents et composés principalement d'une grande population de cellules centro-folliculaires à grand noyau non clivé (large noncleaved cell type) avec très peu de cytoplasme (immunoblastes) (figure 7 A). Les petits lymphocytes du manteau ne sont pas très nombreux et sont refoulés à la périphérie du follicule. La zone marginale, de dimension variable (mince ou hyperplasique), est composée de lymphocytes moyens, mais d'autres cellules à grand noyau et à cytoplasme abondant et clair sont également présentes.

L'espace interfolliculaire est réduit et rempli de plusieurs cellules de type plasmocytaire. La pulpe rouge contient une grande quantité de neutrophiles, de cellules érythroïdes, de mégacaryocytes et d'hémosidérophages.

Ces lymphoproliférations montrent quelques similarités histopathologiques avec celles observées chez les patients atteints de la maladie de Castleman localisée de type plasmocytaire (Larroche, C. *et al.*, 1996). Ces caractéristiques histopathologiques sont aussi similaires à celles retrouvées dans le modèle de souris dont le gène *C/EBP-β* a été inactivé (knocked-out) (Screpanti, I. *et al.*, 1995) et qui ont développé la maladie de Castleman. L'argention de Marshall sur des coupes provenant de ces rates a démontré un grand nombre de cellules métallophiles (dendritiques et macrophages) disséminées dans la pulpe rouge, dans les grands follicules et organisées en amas dans les manchons lymphoïdes périartériolaires (MLPA) (figures 7 C et D). La coloration au vert de méthylpyronine a révélé une grande quantité de plasmocytes faiblement colorés dans les pulpes rouge et blanche (figure 7 B).

Tableau V. Classification histopathologique, distribution et fréquence des lymphoproliférations spléniques par groupe d'âge des souris RV-105, RV-106 et Ntg

Lignée	Type de lésion	Groupe d'âge			A+B+C
		A	B	C	
RV-105	Hyperplasie folliculaire	3	6	3	12
	Prolifération lymphomateuse	1	0	2	3
	Lymphome	1	1	2	4
	Total des cas	5	7	7	19
RV-106	Hyperplasie folliculaire	3	3	3	9
	Prolifération lymphomateuse	1	0	2	3
	Lymphome	0	0	6	6
	Total des cas	4	3	11	18
Ntg	Hyperplasie folliculaire	4	4	0	8
	Prolifération lymphomateuse	0	0	0	0
	Lymphome	0	0	0	0
	Total des cas	4	4	0	8

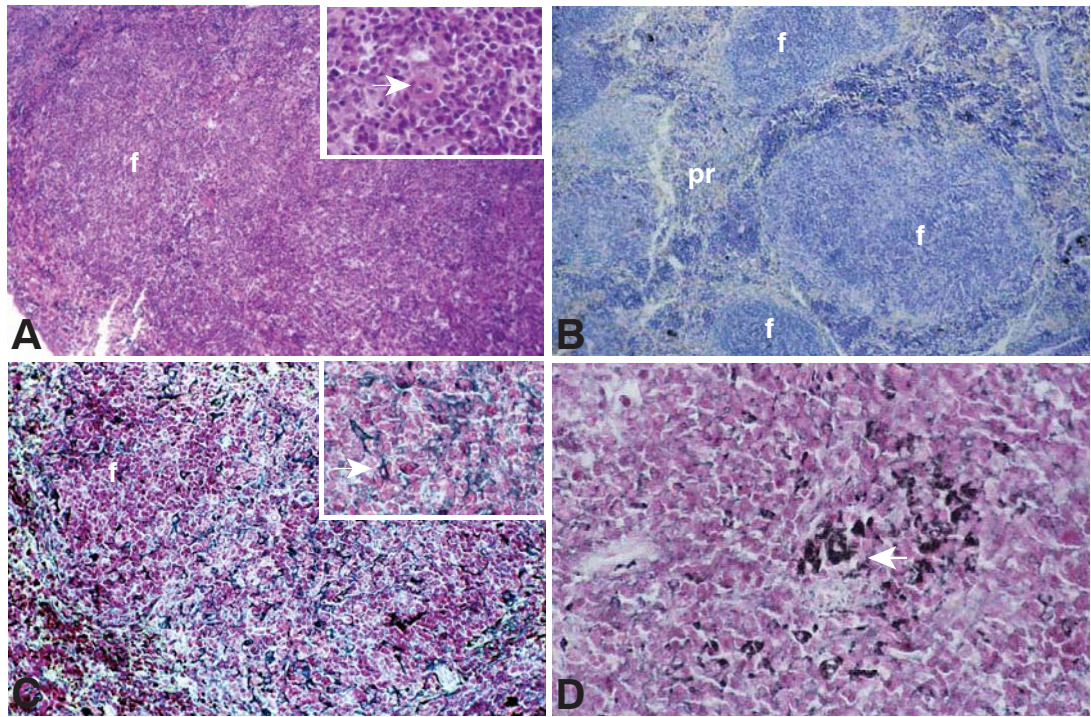
Fig. 7. Hyperplasie lymphomateuse (Castleman-like).

A: coloration au HPS.

B: coloration au VMP.

C et D: argentation de Marshall.

A: rate de souris Tg avec des follicules très volumineux (f) et une réduction de l'espace interfolliculaire (coloration au HPS) (200x). Encadré: manchon lymphoïde périartériolaire (flèche) (2000x). B: même rate, plusieurs follicules avec manque de coloration rouge (f: follicule, pr: pulpe rouge), coloration VMP (200x). C: même rate avec une légère désorganisation des cellules métallophiliques folliculaires (f: follicule), argentation de Marshall modifiée (200x). Encadré: détails cellulaires (flèche), argentation de Marshall (500x). D: présence d'amas de cellules métallophiliques périvasculaires à l'intérieur du follicule (flèche) argentation de Marshall (800x).



c) Lymphoprolifération avec perte de structure splénique

Dans cette catégorie, nous avons eu 4 proliférations lymphoïdes dans la lignée RV-105, 6 dans la lignée RV-106 et aucune parmi les souris Ntg (tableau V). Toutes ces lymphoproliférations présentent une perte de la structure normale de la rate et une prolifération envahissante de cellules lymphoïdes du type monoclonal. Ces altérations histopathologiques sévères et l'envahissement d'autres tissus ont été les critères principaux pour les considérer comme des lymphomes. Ces lymphomes sont caractérisés par une splénomégalie très marquée et par une augmentation du nombre et de la taille des follicules qui progressent vers une structure morphologiquement très altérée.

Dans 3 cas des quatre cas trouvés dans la lignée RV-105, les follicules sont composés de centres germinatifs volumineux avec de grandes cellules de type centro-folliculaire, principalement non clivées, à noyau pâle, rond ou ovale. Les lymphocytes du manteau sont peu nombreux et refoulés à la périphérie du follicule. La zone marginale est abondante et composée de quelques grandes cellules à cytoplasme abondant et clair et d'autres cellules à noyau pléomorphe avec anisocariose. L'espace interfolliculaire est réduit. La pulpe rouge comporte de nombreuses cellules histioplasmocytaires, quelques petits lymphocytes à noyau foncé avec très peu de cytoplasme, plusieurs mégacaryocytes, de nombreux neutrophiles et présente une hémossidérose modérée (figure 8 B). La coloration au vert de méthylpyronine a révélé une petite quantité de cellules faiblement positives dans quelques follicules encore reconnaissables (figure 8 E). L'argentation de Marshall a mis en évidence une grande quantité de cellules métallophiles, organisées de façon périvasculaire dans la pulpe blanche (follicules) (figure 8 H).

Ces caractéristiques histopathologiques ressemblent à celles d'un lymphome folliculaire à grandes cellules centro-folliculaires (Peuchmaur, M. *et al.*, 1991). En outre, ces lymphoproliférations peuvent être le résultat de l'évolution d'une hyperplasie lymphomateuse comme celle observée dans le groupe d'âge plus jeune.

Dans 1 cas de la lignée RV-105 et 6 cas de la lignée RV-106, les lymphoproliférations ont produit une splénomégalie sévère et une perte de l'architecture normale. La prolifération importante peut être diffuse ou nodulaire

confluente. Ces lymphoproliférations sont composées de grandes cellules de type histioplasmocytaire à noyau polymorphe rond, lobulé ou clivé, à cytoplasme très abondant, clair et vacuolé. Ces cellules peuvent former des syncytiums. La pulpe rouge est remplie de cellules érythropoïétiques, de mégacaryocytes, de neutrophiles et de plusieurs grandes cellules à cytoplasme abondant et clair (figures 8 A et C). Parmi ce groupe nous avons observé la présence de fibrose, de thromboses ou de foyers de nécrose. Dans certains cas, des nids de cellules séparés par du tissu fibreux et de grandes cellules à cytoplasme abondant et clair présentent des caractéristiques histopathologiques semblables à celles du lymphome diffus à grandes cellules, à cytoplasme clair, provenant des lymphocytes B (Peuchmaur, M. *et al.*, 1991). La coloration au vert de méthyl-pyronine n'a pas révélé des cellules positives ou quelques rares cellules faiblement positives dans quelques follicules (figures 8 D et F). L'argentation de Marshall a mis en évidence une grande quantité de cellules métallophiles, désorganisées et disséminées dans les pulpes rouge et blanche (figure 8 I). Dans les cas de prolifération diffuse, il y a eu une diminution et une désorganisation des cellules métallophiles (figure 8 G).

L'ensemble de ces observations laissent donc suggérer que les souris Tg porteuses de vpu présentent une incidence d'hyperplasie lymphoïde plus élevée que celle rencontrée chez les souris Ntg. Par ailleurs, cette hyperplasie peut évoluer vers des stades plus avancés de lymphoproliférations ayant des caractéristiques de la maladie de Castleman ou du lymphome malin.

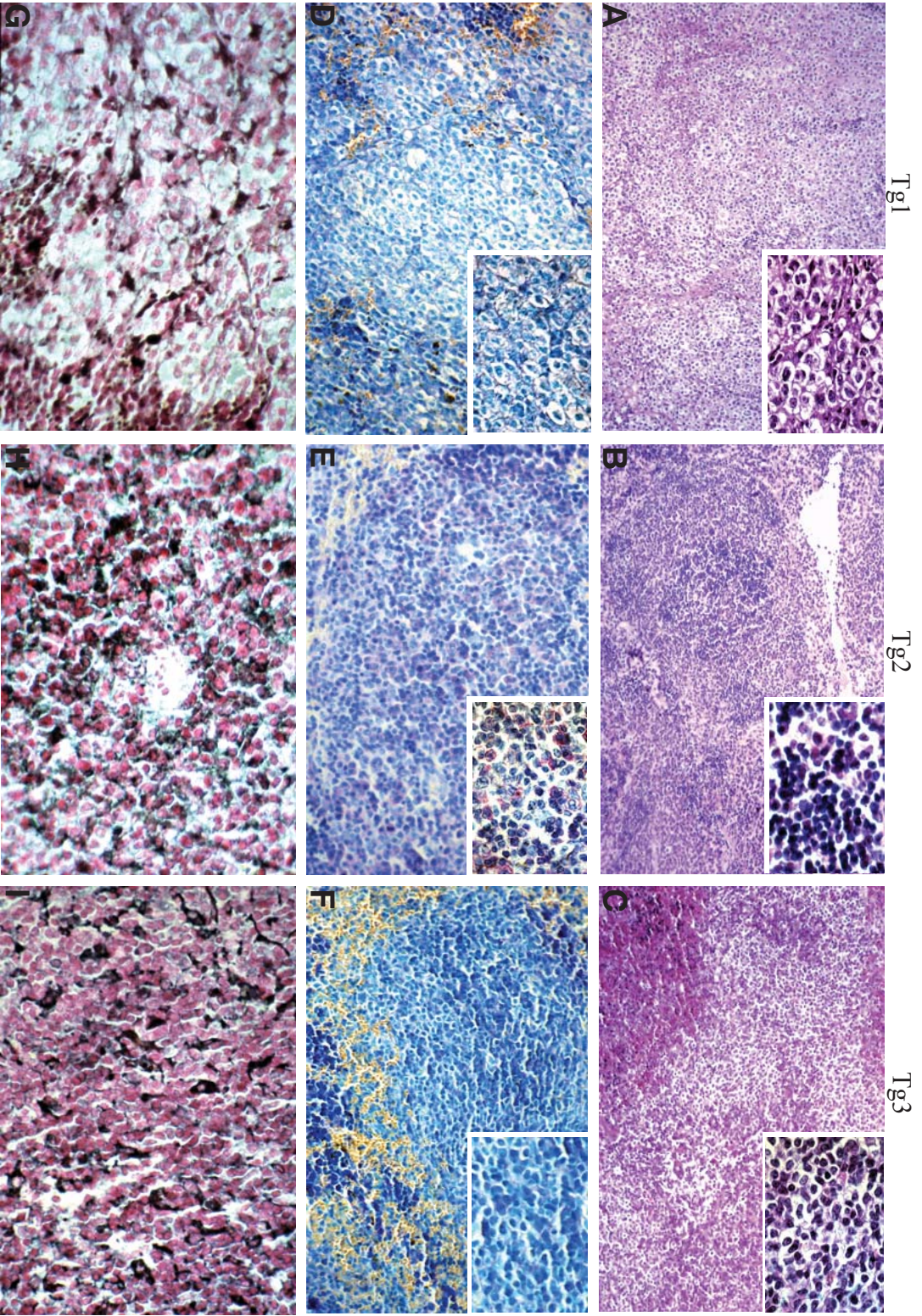
Fig. 8. Caractéristiques histopathologiques des lymphoproliférations spléniques (lymphomes) chez trois souris Tg; 1 (A, D, G), 2 (B, E, H,) et 3 (C, F, I).

A, B, C: Coloration au HPS.

D, E, F: Coloration vert de méthyle pyronine (VMP).

G, H, I: Coloration de Marshall.

Tg1 A: perte structurale, absence de follicules et prolifération cellulaire diffuse (coloration au HPS) (200x). L'encadré droit, montre des cellules à cytoplasme clair et abondant (coloration au HPS) (2000x). Tg2 B: perte structurale avec quelques restes de follicules (coloration au HPS) (200x). L'encadré droit montre une partie d'un follicule anormal, constitué des cellules de type centro-folliculaire (coloration au HPS) (2000x). Tg3 C: perte structurale, follicule anormal (coloration au HPS) (200x). L'encadré droit montre une prolifération cellulaire composée de grandes cellules à cytoplasme clair et abondant (coloration au HPS) (2000x). D: apparence histopathologique d'un follicule anormal (coloration au VMP) (500x). Encadré droit détails cellulaires (2000x). E: apparence histopathologique d'un follicule anormal (coloration au VMP) (500x). Encadré droit, détails des cellules (2000x). F: apparence histopathologique d'un follicule anormal (coloration au VMP) (500x). Encadré droit, détails cellulaires (2000x). G: diminution de la quantité et désorganisation de cellules métallophiles (argentation de Marshall) (800x). H: désorganisation et concentration de cellules métallophiles périartériolaires (argentation de Marshall) (800x). I: désorganisation de cellules métallophiles, (argentation de Marshall) (800x).



III.iii.iii. Immunodétection de IL-6 dans la rate et les reins de souris Tg atteintes de lymphoprolifération splénique

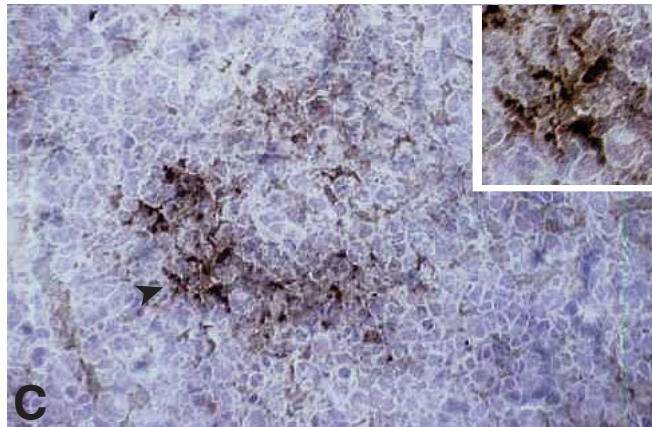
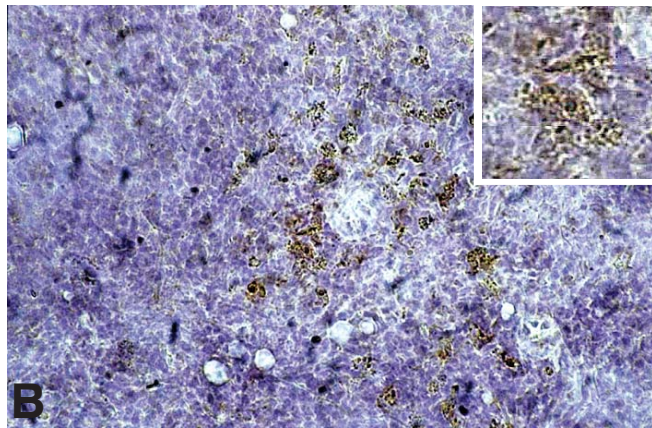
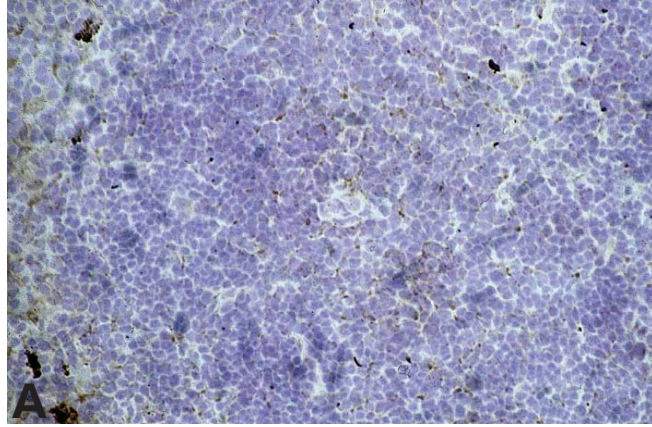
Les résultats antérieurs d'histopathologie suggèrent fortement que le mécanisme d'activation de la lymphoprolifération chez les souris Tg pourrait se faire par l'intermédiaire de cytokines, principalement l'interleukine-6 (IL-6), comme c'est le cas pour la maladie de Castleman. C'est pour cette raison que nous avons tenté de déterminer l'état de l'expression d'IL-6 au niveau de tissus de la rate et du rein chez les souris Tg par comparaison avec ces mêmes tissus chez les souris Ntg. Cet examen de l'expression d'IL-6 a été réalisé par immunohistochimie en utilisant l'anticorps anti-IL-6 sur coupes congelées et fixées tel que décrit par Zhang, L. et Tarleton, R. L. (1996).

Les réactions au niveau des rates de deux souris Tg ayant une lymphoprolifération splénique a démontré un immuno-marquage positif à l'IL-6 dans les manchons lymphoïdes périartériolaires (MLPA), dans la région périfolliculaire et dans la pulpe rouge. Les cellules positives dans les manchons lymphoïdes périartériolaires montrent un cytoplasme très abondant et réticulé qui ressemble à celui des cellules dendritiques. Les cellules de la pulpe rouge et périfolliculaires ressemblent aux cellules du type histiocytaire (figures 9 B et C).

Dans la rate des souris Ntg avec de l'hyperplasie lymphoïde splénique, nous n'avons trouvé aucune présence de cellule positive de type dendritique dans les manchons lymphoïdes périartériolaires (figure 9 A). Des cellules positives de type histiocyte ont été retrouvées dans la pulpe rouge.

Dans les reins des souris Tg, seules quelques rares cellules positives ont été observées dans les manchons lymphoïdes périvasculaires de la région du bassin. Dans les reins de souris contrôles (Ntg), aucun immuno-marquage positif n'a été révélé.

Fig. 9. Immunodétection de IL-6, chez des souris avec hyperplasie lymphoïde et lymphome splénique. A: rate hyperplasique de souris Ntg mais avec absence de cellules positives dans la zone périvasculaire (au centre) (200x). B: rate de souris Tg avec hyperplasie lymphomateuse. Présence d'amas de cellules positives concentrées autour des microvaisseaux (200x et l'encadré droit 1500x). C: rate de souris Tg avec lymphome. Présence d'amas de cellules positives à cytoplasme réticulé (flèche) (800x et l'encadré droit 1500x).



III.iv. État de la fonction du système immunitaire: réactions *in vivo* à la Dex et aux LPS

III.iv.i. Traitement avec la dexaméthasone

Les effets des traitements à la Dex ont été évalués en faisant le décompte des lymphocytes circulants et l'examen histopathologique des deux organes lymphoïdes majeurs, la rate et le thymus.

III.iv.i.i. Leucogrammes des souris Tg et Ntg avant tout traitement

Pour aborder cette expérience, nous avons effectué des décomptes leucocytaires sanguins sur des souris Tg et Ntg non traitées pour obtenir des valeurs de référence afin de mieux interpréter les résultats après traitement avec la Dex ou les LPS. Nous avons analysé trois paramètres leucocytaires principaux: les leucocytes totaux, les lymphocytes totaux et le pourcentage de lymphocytes par rapport aux leucocytes totaux. Pour cela, nous avons utilisé 10 souris RV-105, 8 RV-106 et 12 Ntg, toutes âgées de 3 mois. Dans une première expérience, ces décomptes leucocytaires ont été effectués en utilisant le compteur de leucocyte disponible au département.

Pour RV 105, les moyennes obtenues sont: 1.54, 0.81 et 53 respectivement pour les leucocytes totaux, les lymphocytes totaux et le pourcentage des lymphocytes par rapport à la population leucocytaire totale (Tableau VIa). Pour RV 106, ces moyennes sont 2.3, 1.47, et 64, respectivement, pour les mêmes paramètres (tableau VIa).

Pour les souris Ntg contrôles, les moyennes obtenues sont 3.09, 2.47, et 78 respectivement pour les leucocytes totaux, les lymphocytes totaux et le pourcentage de lymphocytes (tableau VIa). Toutes ces valeurs sont nettement plus élevées que les données obtenues pour les souris transgéniques. Dans ces souris contrôles les résultats montrent que la population lymphocytaire est majoritaire. Ceci est conforme

aux données biologiques sanguines des souris chez qui les lymphocytes constituent 70 à 90% de la population leucocytaire.

Tel que présenté dans le tableau VIa, les souris Tg avant tout traitement ont montré, pour ces trois paramètres leucocytaires, des valeurs inférieures par rapport aux souris Ntg contrôles. La différence entre les moyennes de ces paramètres est statistiquement significative pour les leucocytes totaux ($p=0.01$) et très significative pour les lymphocytes totaux ($p=0.0006$) ainsi que pour les pourcentages de lymphocytes ($p=0.0001$).

Cette expérience a été répétée en utilisant les mêmes conditions de prélèvement, mais les décomptes leucocytaires ont été réalisés avec un compteur de leucocytes spécialement calibré pour le sang de souris (Abbott Cell-Dyn Coulter, modèle 3500. Abbott Diagnostics Division, 1993, Mississauga, Ontario, Faculté de Médecine vétérinaire, U de Montréal). Avec cet appareil, il nous a été possible d'avoir aussi les valeurs pour les neutrophiles, ce qui n'a pas été le cas avec l'équipement disponible au laboratoire.

Dans cette deuxième expérience nous avons utilisé, 4 souris RV-105, 4 RV-106 et 4 souris Ntg. Ce deuxième décompte en coulter (souris) confirme la leucopénie et lymphopénie déjà observées lors du premier décompte. Il révèle par contre une neutrophilie plus importante chez les Tg par rapport aux Ntg. Ce dernier paramètre n'était pas évalué avec le premier coulter. Donc en plus de la leucopénie et lymphopénie il y a une neutrophilie plus importante mais qui ne corrige la leucopénie (tableau VIb). Toutes ces observations ont été confirmées par des décomptes effectués manuellement.

Cependant, les valeurs sanguines de souris Tg et Ntg dans cette deuxième expérience sont apparues plus basses. Cette différence dans les décomptes obtenus pourrait être associée à la performance différente des appareils utilisés, étant donné que le deuxième appareil était plus moderne et avait la fonction de différencier les neutrophiles. Un laps du temps prolongé entre la prise du sang et l'analyse peut altérer les résultats hématologiques (Gaunt, S. D., 2004). Un autre facteur en jeu pourrait être le laps de temps entre le prélèvement et le décompte cellulaire. Dans la première expérience, le laps du temps a été d'environ 30 minutes à 1 h alors que

dans la deuxième expérience cela a été de 2 h. Cependant, la différence d'une heure entre ces deux expériences, à elle seule, ne peut expliquer la différence entre les résultats obtenus pour les deux décomptes qui, d'ailleurs, démontrent la même tendance. Les caractéristiques individuelles de chaque souris peuvent aussi contribuer aux différences observées.

Tableau VIa. Décompte des leucocytes sanguins chez les souris Tg et Ntg non traitées âgées de trois mois

Lignée	Leucocytes totaux $\times 10^3/\mu$	Lymphocytes totaux $\times 10^3/\mu$ l	Lymphocytes %
RV-105			
1	1.62	1.0	62
2	3.36	2.0	59
3	0.82	0.4	49
4	0.64	0.4	62
5	0.92	0.4	43
6	1.39	1.0	72
7	1.54	0.6	39
8	1.19	0.6	50
9	2.69	0.9	33
10	1.28	0.8	62
moy	1.54	0.81	53
Dstd	0.85	0.48	12
RV-106			
1	1.78	1.3	73
2	1.83	1.3	71
3	3.63	2.3	63
4	2.16	1.5	69
5	4.01	2.5	62
6	1.22	0.7	57
7	1.61	1.1	68
8	2.14	1.1	51
moy	2.3	1.47	64
Dstd.	0.99	0.62	7
Ntg			
1	4.11	3.95	96
2	1.39	1.1	79
3	1.52	1.3	85
4	1.45	0.9	62
5	3.12	2.0	64
6	4.97	3.3	66
7	4.92	4.2	85
8	4.29	3.7	86
9	2.48	2.1	85
10	4.24	3.7	87
11	2.27	1.6	70
12	2.33	1.8	77
Moy	3.09	2.47	78
Dstd	1.36	1.21	11

Tableau VIb. Valeurs des leucocytes sanguins chez les souris âgées de six mois Tg et Ntg intactes (aucun traitement)

Lignée	Leucocytes	Lymphocytes		Neutrophiles	
	totaux x10 ³ /μl	totaux x10 ³ /μ	%	totaux x10 ³ /μl	%
RV-105					
1	3.09	0.32	10.5	2.46	79.9
2	0.932	0.256	27.5	0.539	57.8
3	0.960	0.198	20.6	0.630	65.6
4	1.08	0.274	25.3	0.602	55.7
Moy	1.5	0.263	21	1.06	70.0
Dstd	1.05	0.05		0.94	
RV-106					
1	1.95	1.01	51.7	0.837	42.9
2	2.36	1.11	47.0	1.02	43.1
3	1.24	0.496	40.0	0.615	49.5
4	1.36	0.363	26.7	0.887	65.3
Moy	1.72	0.744	41.3	0.839	48.8
Dstd.	0.52	0.37		0.16	
Ntg					
1	4.5	4.06	88.5	0.477	10.4
2	1.48	1.04	70.2	0.364	24.6
3	1.54	1.15	74.8	0.364	23.7
4	1.05	0.765	73.0	0.216	20.6
Moy	2.14	1.75	76.6	0.355	16.6
Dstd	1.58	1.54		0.11	

III.iv.i.ii. Effets du traitement à la Dex

Tel que décrit dans la section «Matériel et méthodes» cette étude a été effectuée sur 6 souris de chacune des lignées RV-105, RV-106 et Ntg contrôle. Toutes ces souris étaient âgées de 70 jours et avaient un poids de 28-30 gr. Elles ont toutes reçu une injection de 125mg de Dex par voie intrapéritonéale. Vingt-quatre heures après l'injection elles ont été sacrifiées et leur sang, rate, thymus, foie et reins ont été prélevés selon les méthodes déjà décrites pour faire les leucogrammes et l'évaluation histopathologique des organes prélevés.

A) Leucogrammes de souris traitées à la dexaméthasone (Dex)

Les leucogrammes établis sur les échantillons sanguins prélevés 24 heures après l'injection de Dex, ont montré une diminution du nombre de leucocytes totaux, de lymphocytes totaux, et également du pourcentage lymphocytaire chez les animaux transgéniques et non transgéniques (tableau VII) sauf pour les leucocytes totaux de RV-105. Cette augmentation de leucocytes totaux chez les souris RV-105, peut être associée à la mise en circulation des neutrophiles par leur détachement des cellules endothéliales induit par la dexaméthasone (Gaunt, S. D., 2004).

Malgré les variations observées, les différences entre les animaux transgéniques et non transgéniques concernant les leucocytes totaux ($p>0.9$) et lymphocytes totaux ($p>0.2$) sont statistiquement non significatives. Seuls les résultats entre les pourcentages lymphocytaires de souris Tg et Ntg montrent une différence statistiquement significative ($p<0.007$).

L'ensemble de ces données démontre que les différences observées dans les populations leucocytaires et lymphocytaires dans le sang ne sont pas vraiment pertinentes (statistiquement non significatives).

Tableau VII. Valeurs des leucocytes sanguins après le traitement avec dexaméthasone

Lignée	Leucocytes totaux $\times 10^3/\mu\text{l}$	Lymphocytes totaux $\times 10^3/\mu\text{l}$	%
RV-105			
1	0.66	0.4	60
2	1.19	0.6	50
3	1.68	0.6	36
4	1.88	0.9	48
5	3.54	0.9	25
6	1.39	0.9	65
Moyenne	1.72	0.72	47
Dstd.	0.98	0.21	14
RV -106			
1	1.72	1.2	70
2	1.18	0.7	59
3	2.29	0.9	39
4	1.39	1.0	72
5	1.32	0.9	68
6	2.81	2.2	78
Moyenne	1.78	1.15	64
Dstd.	0.64	0.54	14
Ntg			
1	3.46	2.0	58
2	1.39	1.1	79
3	4.3	3.1	72
4	1.15	0.9	78
5	0.64	0.5	78
6	1.03	0.7	68
Moyenne	1.99	1.38	72
Dstd.	1.5	1.0	8

B) Évaluation histopathologique de la rate, du thymus du foie et de reins chez les souris traitées à la Dex

Vingt-quatre heures après l'injection à la Dex, toutes les souris ont été sacrifiées et nous avons effectué l'examen histopathologique des organes lymphoïdes (rate et thymus), du foie et des reins des souris Ntg et des souris Tg. L'examen des différents organes investigués a permis de faire les observations suivantes:

1) L'examen des reins et du foie n'a pas révélé d'altérations pathologiques apparentes.

2) Au niveau de la rate de quelques souris Tg, nous avons noté une déplétion lymphoïde dans les pulpes rouge et blanche. Cependant, cette déplétion lymphoïde est très légère à légère dans les rates de 4/6 souris Tg RV-105 et de 3/6 RV-106 comparativement à ce qui a été observé dans les souris Ntg contrôles 0/6. Cette déplétion est caractérisée par une diminution du nombre et de la taille des follicules et par une régression des manchons lymphoïdes périartériolaires (MLPA) (figure 10 B). Cette régression de MLPA a été présente seulement dans 1/6 RV-105 et 1/6 RV-106 (tableau VIII). Ces follicules ne contiennent ni centres germinatifs ni zone marginale (figure 10 B). Cependant, il y a une grande quantité de neutrophiles disséminés dans la pulpe rouge. Chez les souris Ntg, par contre, les rates n'ont pas démontré de déplétion lymphoïde évidente. Les follicules étaient plus nombreux et plus volumineux que ceux des souris Tg. Quelques follicules présentaient de petits centres germinatifs et certains d'entre eux avaient des zones marginales (figure 10 A). Les neutrophiles dans la pulpe rouge étaient moins nombreux que chez les souris Tg.

La réaction au traitement à la Dex a donc provoqué des modifications histologiques légères chez les souris transgéniques. Ces changements ont été évidents chez 4/6 RV-105 et 3/6 souris RV-106 alors qu'aucune souris contrôle ne semble vraiment atteinte. Les follicules de la rate chez les souris sont composés de lymphocytes B ; par contre, les lymphocytes dans les manchons périvasculaires de la rate sont de lymphocytes T matures. Les effets apoptotiques de la Dex concernent les lymphocytes T immatures. Pour cette raison, les souris Ntg n'ont pas développé les effets immunodépresseurs de

la Dex dans la rate. Par contre, chez les souris Tg, plus de la moitié des animaux ont manifesté de façon légère des effets immunodépressifs causés par la Dex.

3) L'examen histopathologique des thymus des souris Tg a démontré une déplétion lymphoïde sévère du cortex chez toutes les souris Tg (tableau VIII); cette déplétion lymphoïde était moins marquée au niveau de la zone médullaire (figure 10 D). En plus de la déplétion lymphoïde, le cortex thymique a démontré une très grande quantité de cellules rétrécies, très fortement colorées au HPS et d'apparence apoptotique (figure 10 D; encadré). Quelques cellules épithéliales du thymus ont démontré un cytoplasme vacuolé signalant une dégénérescence hydropique. De plus, nous avons observé la présence de petites structures kystiques dans la zone médullaire (figure 10 D). Le thymus de toutes les souris Ntg a présenté une déplétion lymphoïde légère dans le cortex (tableau VIII) et encore plus légère dans la zone médullaire (figure 10 A). Les figures apoptotiques étaient moins nombreuses (figure 10 C encadré). Quelques cellules épithéliales thymiques ont démontré également un cytoplasme vacuolé.

Pour démontrer l'activité apoptotique dans cet organe, nous avons traité les coupes de thymus par la technique "POD". Cette technique identifie par immunohistochimie les cellules mortes par apoptose. Dans l'apoptose, l'ADN génomique est fragmenté en fragments de 50-300 kilobases et postérieurement en fragments de 180-200 paires de bases (Bortner, C. D. *et al.*, 1995). Dans cette technique ces fragments sont couplés avec d'autres fragments complémentaires (sondes) marqués avec la peroxydase (horse-radish peroxidase HRP) et finalement la réaction est révélée avec le tétrahydrochlorure du diaminobenzidine (DAB).

Cette dernière approche a mis en évidence de nombreuses cellules positivement colorées (marquage brun foncé), confirmant ainsi leur caractère apoptotique (figures 10 E et F).

Les données obtenues par l'examen histopathologique de la rate et du thymus après le traitement à la Dex démontrent que:

a) Au niveau de la rate: i) plusieurs des souris Tg (50%) ont développé une déplétion lymphoïde légère qui n'est pas retrouvée chez les souris contrôles. ii) Ce

pourcentage de souris Tg affectées par le traitement à la Dex est à peu près similaire à celui retrouvé parmi les souris Tg avec atteinte lymphoproliférative. iii) Cette déplétion légère suggère qu'une sous population lymphocytaire pourrait être plus susceptible au traitement par la Dex chez les souris Tg. Cette sous population serait soit moins susceptible soit moins représentée chez les souris Ntg contrôles.

b) Au niveau du thymus, le traitement à la Dex a induit une déplétion lymphoïde plus sévère, surtout au niveau du cortex. La présence d'un grand nombre de cellules apoptotiques signale une susceptibilité accrue à l'apoptose de lymphocytes du cortex thymique des souris Tg comparativement aux souris Ntg.

Tableau VIII. Histopathologie de la rate et du thymus après le traitement avec dexaméthasone

Lignée	Rate diminution du nombre et de la taille des follicules	MLPA petits et dépeuplés	Thymus Déplétion du cortex
RV-105			
1	-	-	+++
2	-	-	+++
3	-/+	++	+++
4	-/+	-	+++
5	+	-	+++
6	+	-	+++
Total de souris Affectées	2/6	1/6	6/6
RV-106			
1	-	-	+++
2	+	+	+++
3	+	-	+++
4	+	-/+	+++
5	-	-/+	+++
6	-	-/+	+++
Total de souris Affectées	3/6	1/6	6/6
Ntg			
1	-	-	++
2	-	-	+
3	-	-	++
4	-	-	+
5	-	-	+
6	-	-	+
Total de souris Affectées	0/6	0/6	6/6

Notes: - Négatif
 -/+ Très léger
 + Léger
 ++ Modéré
 +++ Très sévère

Fig. 10. Effets du traitement avec la dexaméthasone dans la rate et thymus de souris Ntg et Tg. A, B, C et D: coloration au HPS, E et F: coloration au POD.

A): rate de souris Ntg montrant la présence de plusieurs follicules (f) (200x).

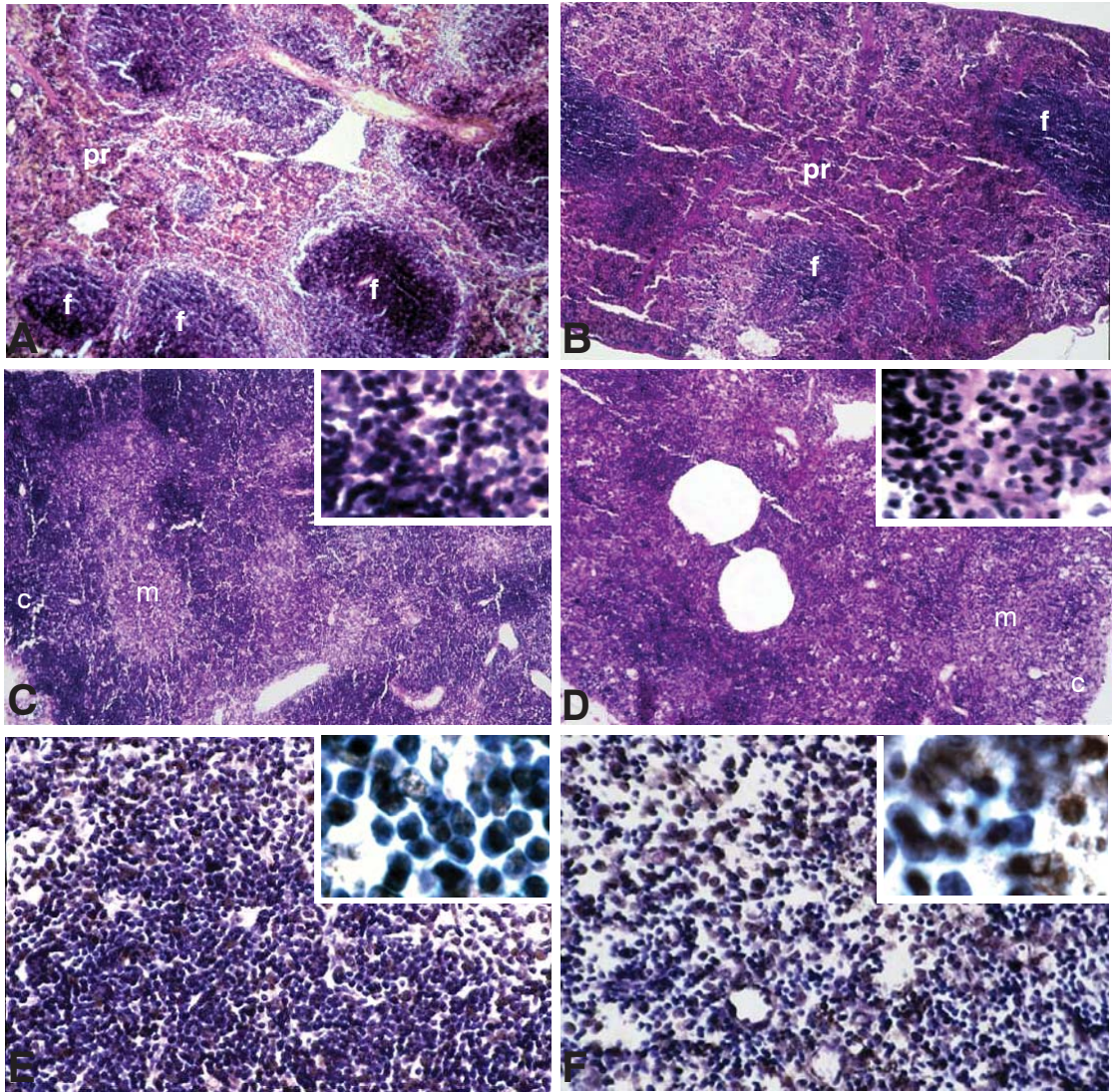
B): rate de souris Tg, démontrant la diminution du nombre et de la taille des follicules (f) (200x).

C): thymus de souris Ntg avec la zone corticale (c) et la zone médullaire (m) (200x). Encadré : lymphocytes colorés en bleu d'apparence normal.

D): thymus de souris Tg démontrant la déplétion lymphoïde marquée du cortex (c) et de la médullaire (m) (200x). Encadré : présence de plusieurs cellules à noyau très foncé suggérant une apparence d'apoptose.

E) et F): immunodétection des cellules apoptotiques en couleur noir dans le cortex des thymus des souris Ntg (E, 800x) et des souris Tg (F, 800x).

Les encadrés dans E et F montrent les détails cellulaires, dans E une apparence normale de lymphocytes avec marquage d'apoptose et dans F lymphocytes avec morphologie nucléaire irrégulière et marquage positif d'apoptose (2500x).



III.iv.ii. Traitement avec les LPS

Ici, nous avons examiné la réponse aux LPS de leucocytes et de lymphocytes du sang, du thymus et de la rate des souris Tg et Ntg. Nous avons également évalué les effets du LPS au site d'injection pour déterminer si les souris allaient développer une réaction de Schwartzman.

Pour cette étude, nous avons utilisé au total 74 souris, dont 24 RV-105, 24 RV-106 et 26 Ntg, toutes âgées de 70 jours. Toutes ces souris ont reçu une injection sous-cutanée de LPS de *Serratia marcescens* à raison de 5 µg/30gr de poids de l'animal.

Vingt quatre heures après cette première injection, 6 animaux (2 RV-105, 2 RV 106, 2 Ntg) ont été sacrifiées avec une surdose de Somnotol (pentobarbital sodique) et les 68 autres souris ont reçu une deuxième injection de LPS par voie intrapéritonéale à raison de 3.3 mg/kg de poids de l'animal. Deux souris de chaque lignée ont été sacrifiées 25h30, 27h, 30h, 36h et 48h après la première injection. Les douze souris restantes dans chacune des lignées ont été sacrifiées 72h heures après la première injection.

Les numérations des leucocytes sanguines ont été effectuées à partir d'un prélèvement de 500µl de sang par ponction cardiaque avec addition d'anticoagulant (citrate de sodium 3.8%) avant le sacrifice des animaux. Toutes les numérations ont été réalisées au Coulter disponible au laboratoire.

Pour tous les animaux inclus dans cette expérience, nous avons également effectué un examen anatomopathologique complet avant le prélèvement des tissus d'intérêt (poumon, foie, rate, rein, thymus et peau) pour l'évaluation histopathologique et immunohistochimique.

Cliniquement, tous les animaux Tg et Ntg traités aux LPS ont présenté un pelage hirsute, une faiblesse généralisée avec difficulté de se déplacer, les yeux foncés caractéristiques de la déshydratation.

À la nécropsie, nous avons observé une réaction de Schwartzman d'environ 1 cm² chez 20/23 animaux Tg RV-105, 10/20 RV-106 et 3/25 Ntg. Cette réaction se manifeste par une zone hémorragique sous-cutanée dans le site de la première injection de LPS. Dans la cavité abdominale, les péritoines viscéraux et pariétaux

étaient légèrement œdémateux avec une accumulation de liquide dans les tissus qui donne une apparence lustrée et juteuse. Ils étaient aussi congestionnés par accumulation du sang dans les vaisseaux sanguins. Quelques animaux Tg et Ntg ont démontré une légère splénomégalie (d'environ 2 cm). Aucune autre altération pathologique n'a été décelée dans les autres organes (coeur, poumon, rein, cerveau et foie). Parmi les souris traitées, sept sont décédées durant l'expérience entre 36 h et 48 h (1 RV-105, 4 RV-106 et 2 Ntg). Ces animaux ont montré des signes cliniques et des lésions anatomopathologiques compatibles avec un choc endotoxique. Cliniquement, ils présentaient un pelage hirsute, une faiblesse généralisée avec difficulté à se déplacer et une déshydratation. À la nécropsie, ces animaux ont montré une congestion marquée généralisée avec les péritoines viscéraux et pariétaux congestionnés et œdémateux, une dilatation cardiaque gauche et une zone hémorragique sous-cutanée d'environ 1 cm², au site de la première injection de LPS.

A) Valeurs des leucocytes sanguins chez les souris Ntg et Tg RV-105 et RV-106

1) Souris Ntg

a) Valeurs des leucocytes sanguins des souris Ntg traitées et non traitées aux LPS.

Par comparaison avec les numérations leucocytaires avant tout traitement (tableaux VIa et VIb), les souris Ntg ont développé une leucopénie en deux phases : la première a été observée dès vingt-quatre heures après la première injection de LPS et la deuxième, encore plus sévère, a été observée après la deuxième injection de LPS et qui a duré jusqu'à quarante-huit heures après le premier traitement, en passant d'une valeur moyenne de référence de 2.14 à 3.09×10^3 leucocytes/ μl . de sang (tableaux VIa et VIb) à des numérations variant entre 1.25×10^3 après vingt-quatre heures et de 0.43 à 1.7×10^3 leucocyte/ μl . entre vingt-cinq heures trente minutes et quarante-huit heures après le premier traitement (tableau IX). À trente heures après ce premier traitement, les souris ont amorcé une augmentation légère, mais constante jusqu'à atteindre une valeur leucocytaire de $2.13 \times 10^3/\mu\text{l}$ à 72 heures. Ces moyennes leucocytaires ont

presque atteint les valeurs de référence. Les différences des numérations leucocytaires enregistrées entre les souris Ntg non traitées et les souris Ntg traitées sont statistiquement significatives seulement pour la durée du traitement entre 25h30 et 27h ($p < 0.05$) postinjection. Ces différences s'expliquent par une diminution importante de leucocytes circulants causée par la deuxième dose de LPS chez les souris.

b) Valeurs des lymphocytes sanguins des souris Ntg traitées et non traitées.

Par comparaison aux valeurs lymphocytaires avant tout traitement aux LPS (Tableaux VIa et VIb) les lymphocytes totaux ont montré aussi une diminution dès vingt-quatre et jusqu'à soixante-douze heures en passant d'une valeur moyenne normale de 1.75 à 2.47×10^3 lymphocytes/ μl de sang (tableaux VIa et VIb) à des moyennes variant entre 1.2 et 0.15×10^3 lymphocytes/ μl (tableau IX). Le niveau le plus bas de lymphocytes, soit 0.15 à 0.40×10^3 lymphocytes/ μl de sang, a été observé entre vingt-cinq heures trente et trente-six heures postinjection. Cette diminution est statistiquement significative par rapport aux valeurs lymphocytaires chez les souris Ntg non traitées ($p < 0.05$) (tableaux VI, VIa et IX). Ces données démontrent que les plus fortes diminutions de lymphocytes se présentent après la deuxième dose de LPS. La diminution de leucocytes totaux est donc probablement reliée à la diminution marquée de lymphocytes. Ceci n'est pas surprenant puisque, chez la souris normale, les lymphocytes constituent la population majoritaire (70-90%) des leucocytes circulants.

c) En terme de pourcentage des lymphocytes sanguins dans les souris Ntg traitées et non traitées, ce paramètre est également diminué dès vingt-quatre heures et jusqu'à soixante-douze heures post-traitement, passant d'une valeur moyenne normale de 76.6 à 78% de lymphocytes dans le sang (tableaux VIa et VIb) à des valeurs variant entre 65 et 24% (tableau IX). La différence observée entre les souris Ntg traitées et non traitées est statistiquement significative ($p < 0.05$) (tableau IX). Ces résultats montrent une forte diminution du pourcentage de lymphocytes circulants et qui n'est pas remonté aux valeurs de référence même à soixante-dix heures post-traitement. Tous les résultats ici confirment que la diminution du pourcentage de lymphocytes n'est pas due à une augmentation en nombre d'autres populations leucocytaires

comme les neutrophiles qui, en augmentant leur nombre, pourrait simuler une diminution de lymphocytes dans le sang circulant.

2) Souris RV-105

a) Valeurs des leucocytes sanguins des souris RV-105 traitées et non traitées.

Les leucocytes sanguins totaux de souris Tg RV-105 ont diminué dès vingt-quatre heures après le traitement avec les LPS en passant d'une valeur moyenne normale de 1.5×10^3 leucocytes/ μl . de sang (tableaux VIa et VIb) à une moyenne de 0.86×10^3 leucocytes/ μl (tableau IX). Malgré la différence pour ces temps de traitements, elle n'est pas statistiquement significative. Cette diminution est demeurée constante jusqu'à vingt-sept heures. À trente, trente-six et quarante-huit heures post-traitement, les numérations montrent une augmentation du nombre de leucocytes dont les valeurs moyennes atteignent 1.38, 1.18 et à 1.44×10^3 leucocyte/ μl , respectivement (tableau IX) et se sont rapprochés des valeurs de référence des souris RV-105 non traitées. À soixante-douze heures postinjection, nous avons observé une deuxième phase d'augmentation des leucocytes avec une valeur moyenne de $2.37 \times 10^3/\mu\text{l}$ des leucocytes. Ce nombre dépasse les valeurs de référence des souris RV-105 non traitées (tableaux VIa, VIb et IX). Ces résultats démontrent un comportement leucocytaire semblable à celui de souris Ntg traitées : une chute leucocytaire dans les premières heures post-traitement (24h à 27h) qui n'est pas statistiquement significative. Après, il y a une récupération du nombre de leucocytes entre trente et quarante-huit heures et finalement une forte élévation du nombre de leucocytes à soixante-douze heures. Cette augmentation de leucocytes est associée à une augmentation probablement de neutrophiles, étant donné que le nombre de lymphocytes et le pourcentage de lymphocytes ne sont pas très élevés et les résultats qui suivent confirment cette observation. Malgré ces variations leucocytaires dans le temps, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre le groupe de souris RV-105 traitées et non traitées ($p > 0.05$).

b) Décompte des lymphocytes sanguins des souris RV-105 traitées et non traitées.

Le nombre de lymphocytes des souris RV-105 traitées a commencé à diminuer dès 24h post-injection, mais la baisse des lymphocytes est plus marquée à vingt-cinq heures trente et 27h tout comme chez les souris Ntg traitées aux LPS. Cependant, les moyennes lymphocytaires obtenues sont demeurées à l'intérieur des valeurs limites des souris RV-105 non traitées ($0.26-0.81 \times 10^3/\mu\text{l}$) (tableaux VIa et VIb). À soixante-douze heures post-traitements, il y a une augmentation des lymphocytes à $0.71 \times 10^3/\mu\text{l}$, ce nombre étant très proche des valeurs trouvées pour les RV-105 non traitées (tableaux VIa, VIb et IX).

Ces résultats démontrent que les lymphocytes diminuent dans les premières heures de traitement (24 à 48) mais ils augmentent seulement à soixante-douze heures post-traitements tout en demeurant à l'intérieur des limites normales et avec un comportement lymphocytaire semblable aux souris Ntg traitées. L'augmentation de lymphocytes totaux qui survient à soixante-douze heures n'est pas déterminante pour expliquer l'augmentation importante de leucocytes totaux, donc d'autres populations leucocytaires comme les neutrophiles ont pu contribuer à cette augmentation.

Malgré les variations du nombre de lymphocytes sanguins, les analyses statistiques n'ont pas démontré de différences significatives entre le groupe de souris RV-105 non traitées et les groupes de souris RV-105 traitées ($p > 0.05$).

c) Pourcentages lymphocytaires sanguins des souris RV-105 traitées et non traitées.

Les pourcentages lymphocytaires, obtenus à partir des numérations leucocytaires et lymphocytaires totales, restent durant toute l'expérience dans les limites des pourcentages lymphocytaires de référence, soit entre 21 et 53% (tableaux VIa, VIb et IX). Cependant, à quarante-huit et jusqu'à soixante-douze heures, ces pourcentages diminuent de façon marquée (28 et 29%) par rapport aux valeurs du début de l'expérience, mais ces pourcentages demeurent dans les limites de référence des souris RV-105 non traitées. La différence entre les pourcentages lymphocytaires de référence des souris non traitées et ceux des souris traitées n'est pas statistiquement significative ($p > 0.05$). Ce pourcentage des lymphocytes sanguins confirme le fait que d'autres sous populations leucocytaires ont augmenté avec le temps, car la population

lymphocytaire à 72 heures est demeurée égale à celle des souris non traitées (tableaux VIa et IX).

3) Souris RV-106

a) Valeurs des leucocytes sanguins des souris RV-106 traitées et non traitées.

Les souris de la lignée RV-106 traitées aux LPS ont montré une diminution des leucocytes totaux dans les premières 24 à 30 heures après le traitement aux LPS passant d'une valeur moyenne normale située entre 1.72 à 2.3×10^3 leucocytes/ μl . de sang (tableaux VIa et VIb) à des moyennes variant entre 0.71 et 1.01×10^3 leucocyte/ μl . (tableau IX). Après trente-six heures, la population leucocytaire amorce une remontée (2.42×10^3 leucocytes/ μl) et même dépasse légèrement les valeurs de référence des souris RV-106 non traitées (tableaux VIa, VIb et IX). À quarante-huit heures, les leucocytes totaux diminuent de nouveau (0.95×10^3 leucocytes/ μl) et à soixante-douze heures ils augmentent de façon importante (7.27×10^3 leucocytes/ μl), produisant une leucocytose marquée par rapport aux valeurs de souris non traitées (tableaux VIa, VIb et IX).

Ces résultats démontrent qu'il y a une chute leucocytaire dans les premières heures post-traitements, qui est suivie d'une augmentation du nombre de leucocytes à trente-six heures. Une autre chute leucocytaire est observée à quarante-huit heures et elle est suivie d'une leucocytose marquée à soixante-douze heures. Les variations leucocytaires observées entre vingt-quatre et quarante-huit heures ne sont pas statistiquement significatives par rapport aux valeurs de référence pour cette lignée transgénique ($p > 0.05$). Par contre, soixante-douze heures après le traitement aux LPS les souris ont développé une leucocytose très marquée qui est statistiquement significative ($p < 0.05$). Les variations dans le nombre de leucocytes et l'augmentation de leucocytes à soixante-douze heures sont principalement associées à l'augmentation probable de neutrophiles, étant donné que le nombre de lymphocytes et le pourcentage de lymphocytes ne sont pas très élevés pour expliquer la forte leucocytose et les résultats suivants confirment cette observation.

b) Valeurs des lymphocytes sanguins des souris RV-106 traitées et non traitées aux LPS.

Les numérations lymphocytaires des RV-106 traitées aux LPS ont montré une diminution entre vingt-quatre et quarante-huit heures après le traitement, passant ainsi d'une valeur moyenne normale située entre 0.744 et 1.47×10^3 lymphocytes/ μl . de sang (tableaux VIa et VIb) à des moyennes variant entre 0.25 et 0.95×10^3 lymphocytes/ μl . (tableau IX). Cette diminution est plus marquée à vingt-quatre et quarante-huit heures post-traitement (0.35×10^3 et 0.25×10^3 lymphocytes/ μl respectivement). Pour ces deux valeurs, la différence est statistiquement significative par rapport aux valeurs des RV-106 non traitées ($p < 0.05$). Par contre, pour le nombre de lymphocytes à vingt-cinq heures trente et trente-six heures nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative entre les souris traitées et non traitées ($p > 0.05$).

À soixante-douze heures, la numération montre une nette augmentation du nombre de lymphocytes (2.27×10^3 lymphocytes/ μl) qui dépasse les valeurs de référence (tableaux VIa, VIb et IX). La différence entre les valeurs lymphocytaires des souris RV-106 non traitées et des souris RV-106 traitées est statistiquement significative ($p < 0.05$).

Ces résultats démontrent que les souris traitées ont développé deux baisses de lymphocytes; une à vingt-quatre heures (après la première dose de LPS) et une à quarante-huit heures (vingt-quatre heures après la deuxième injection de LPS). Après cette dernière chute lymphocytaire, les souris ont développé une leucocytose très sévère ($7.27 \times 10^3/\mu\text{l}$), composée d'une lymphocytose ($2.27 \times 10^3/\mu\text{l}$) et d'une neutrophilie très prononcée d'environ $5 \times 10^3/\mu\text{l}$. La population leucocytaire du sang est composée principalement par des lymphocytes et par des neutrophiles alors avec un total de $7.27 \times 10^3/\mu\text{l}$ de leucocytes moins $2.7 \times 10^3/\mu\text{l}$ de lymphocytes, cela donne un total de neutrophiles de $5 \times 10^3/\mu\text{l}$.

c) Pourcentages lymphocytaires sanguins des souris RV-106 traitées et non traitées.

Chez les RV-106 traitées, le pourcentage de lymphocytes est demeuré dans les limites des valeurs normales des souris RV-106 non traitées durant les premières vingt-quatre heures et jusqu'à trente heures après le traitement. À trente-six heures,

quarante-huit et soixante-douze heures, les pourcentages ont atteint les niveaux les plus bas (39, 25 et 31% respectivement) (tableau IX).

Les différences enregistrées pour ces pourcentages entre les souris RV-106 traitées et non traitées, à vingt-cinq heures trente et jusqu'à soixante-douze heures, sont statistiquement significatives ($p < 0.05$) (tableaux VI, VIa et IX). Ces différences plus accusées observées ici sont dues à une augmentation d'autres sous populations leucocytaires (neutrophiles) qui font que le pourcentage de lymphocytes diminue par rapport à la population totale de leucocytes.

B) Comparaison statistique entre les valeurs leucocytaires dans le temps chez les souris Tg et Ntg traitées aux LPS

1) Leucocytes totaux

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les leucocytes totaux des souris Tg et Ntg, de vingt-quatre jusqu'à quarante-huit heures après les traitements aux LPS; seulement après soixante-douze heures les souris RV-106 ont développé une leucocytose statistiquement significative ($p < 0.05$) (figure 11a). Cette leucocytose a été expliquée dans les résultats précédents.

2) Lymphocytes totaux

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les lymphocytes totaux de souris Tg et Ntg dès vingt-quatre jusqu'à soixante-douze heures après les traitements aux LPS ($p > 0.05$) (figure 11b).

3) Pourcentages lymphocytaires

Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre les pourcentages lymphocytaires des souris Tg (RV-105 et RV-106) et Ntg entre vingt-quatre et trente heures après les traitements avec LPS. Par contre, à partir de trente-six heures, les souris Ntg ont développé une augmentation du pourcentage lymphocytaire qui est statistiquement significative ($p < 0.05$) (figure 11c).

C) Comparaison et interprétation de valeurs des leucocytes sanguins entre les souris Tg et Ntg traitées avec LPS

Lorsqu'on analyse les résultats par lignées, on observe qu'au début du traitement, toutes les souris RV-105, RV-106 et Ntg développent une diminution de leucocytes totaux. Chez les souris Tg, le nombre de lymphocytes demeure dans l'écart de référence. Cette observation suggère qu'il y a eu une diminution probablement de neutrophiles qui contribuerait à cette leucopénie. Étant donné qu'au début de traitement les LPS augmentent l'adhésion des neutrophiles à la surface endothéliale, cela diminue la quantité de neutrophiles circulants (Gaunt, S. D., 2004). Par contre, la leucopénie chez les souris Ntg est accompagnée d'une diminution de lymphocytes.

À soixante-douze heures, toutes les souris développent une augmentation de leucocytes avec une augmentation légère de lymphocytes totaux, mais le nombre de ces cellules reste dans les limites de référence pour les souris RV-105 et Ntg (figure 11 a et b). Cependant les souris RV-106 développent une leucocytose très sévère, avec une lymphocytose plus marquée (figure 11 a et b). Chez toutes les souris Tg et Ntg, cette augmentation leucocytaire est causée probablement par une augmentation du nombre des neutrophiles (figure 11c). Les LPS au début induisent une neutropénie et postérieurement, une neutrophilie en induisant la libération des neutrophiles de la moelle osseuse (Gaunt, S. D., 2004).

Les LPS chez les souris Ntg, ont causé une diminution marquée du pourcentage lymphocytaire très tôt à vingt-cinq heures; à trente heures ce pourcentage commence à monter jusqu'au niveau le plus élevé qui est atteint à soixante-douze heures post injection. Cependant avec les souris transgéniques Tg, le pourcentage lymphocytaire diminue sévèrement jusqu'à quarante-huit heures et demeure encore très bas à soixante-douze heures. Ces observations suggèrent que la réponse immunitaire est décalée et retardée chez les souris Tg.

Fig. 11 Cinétique dans le temps de leucocytes (A), lymphocytes (B) et le pourcentage lymphocytaire (C) après le traitement avec LPS.

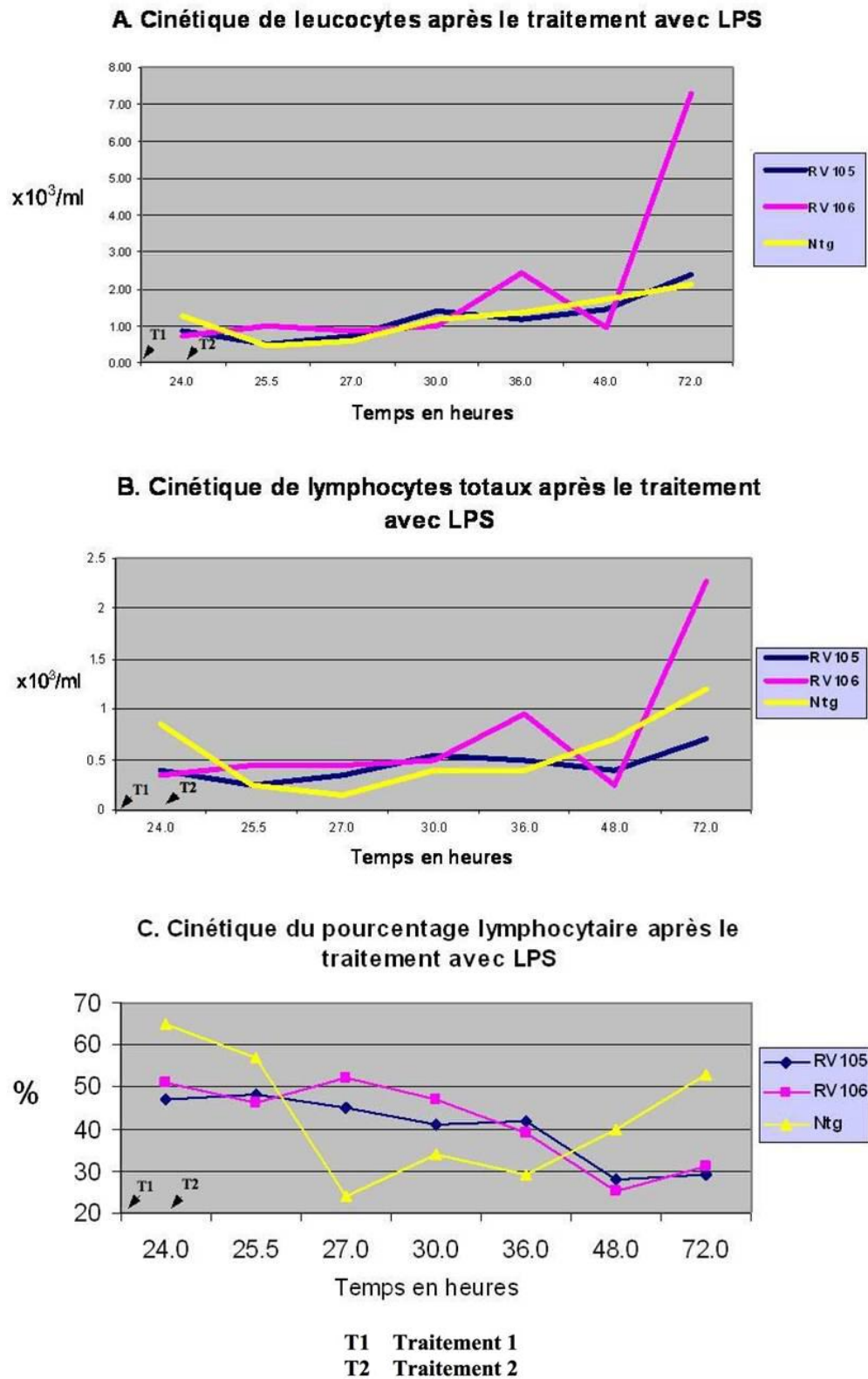


Tableau IX. Valeurs de leucocytes sanguins après le traitement avec L.P.S. cinétique dans le temps

Temps heures	Leucocytes totaux			Lymphocytes totaux			Lymphocytes pourcentage		
	RV-105	RV-106	Ntg	RV-105	RV-106	Ntg	RV-105	RV-106	Ntg
24:00	0.95	0.50	1.82	0.5	0.3	1.3	52	60	71
	0.78	0.92	0.68	0.3	0.4	0.4	38	43	59
moyenne	0.86	0.71	1.25	0.4	0.35	0.85	45	51	65
Dstd	0.12	0.29	0.80	0.14	0.07	0.63	4	12	8
25:30	0.43	0.74	0.54	0.2	0.4	0.3	46	54	55
	0.6	1.28	0.33	0.3	0.5	0.2	50	39	60
moyenne	0.515	1.01	0.43	0.25	0.45	0.25	48	46	57
Dstd	0.12	0.38	0.15	0.07	0.07	0.07	3	10	3
27:00	0.56	0.77	0.69	0.2	0.4	0.2	36	52	29
	0.92	0.95	0.51	0.5	0.5	0.1	54	52	19
moyenne	0.74	0.86	0.6	0.35	0.45	0.15	45	52	24
Dstd	0.25	0.12	0.12	0.21	0.07	0.07	13	0	7
30:00	1.91	1.03	1.44	0.7	0.6	0.5	36	58	35
	0.86	0.93	0.87	0.4	0.4	0.3	46	37	34
moyenne	1.38	0.98	1.15	0.55	0.5	0.4	41	47	34
Dstd	0.74	0.07	0.40	0.21	0.14	0.14	7	15	0.7
36:00	1.67	1.91	1.56	0.7	0.8	0.5	42	42	32
	0.70	2.94	1.10	0.3	1.1	0.3	43	37	27
moyenne	1.18	2.42	1.33	0.5	0.95	0.4	42	39	29
Dstd	0.68	0.73	0.32	0.28	0.21	0.14	0.7	3	3
48:00	1.02	1.05	1.91	0.3	0.3	0.8	29	28	42
	1.86	0.85	1.56	0.5	0.2	0.6	2	23	38
moyenne	1.44	0.95	1.7	0.4	0.25	0.7	28	25	40
Dstd	0.59	0.14	0.24	0.14	0.07	0.14	1	3	3
72:00	2.27	13.32	2.02	0.5	3.8	1.0	22	28	49
	4.39	5.05	4.21	1.9	1.6	3.0	43	32	71
	1.05	2.8	0.92	0.4	0.9	0.4	38	32	43
	2.94	7.56	2.23	0.6	2.1	1.1	20	28	49
	1.26	12.78	1.69	0.4	5.0	0.8	32	39	47
	2.3	5.95	2.27	0.5	1.2	1.2	22	20	53
		3.43	1.57		1.3	0.9		38	57
moyenne	2.37	7.27	2.13	0.71	2.27	1.2	29	31	53
Dstd	1.21	4.25	1.02	0.58	1.54	0.83	9	6	9

D) Examen histopathologique de la rate après traitement aux LPS

Pour cette étude nous avons utilisé les rates et thymus des 74 souris selon le protocole expérimental déjà décrit dans la section II.v.ii dans Matériel et Méthodes.

Pour tous les animaux inclus dans cette expérience, nous avons effectué un examen anatomopathologique complet avant de prélever la rate et le thymus pour l'évaluation histopathologique et immunohistochimique. Il y a eu sept animaux qui sont décédés durant l'expérience (1 RV-105, 4 RV-106 et 2 Ntg), ces animaux ont montré des signes cliniques et des lésions anatomopathologiques compatibles avec un choc endotoxique.

Effets histologiques observés dans la rate

Après les traitements avec LPS nous avons observé des altérations histopathologiques à différents degrés de sévérité au niveau de la population lymphocytaire, les follicules et les pulpes blanche et rouge.

a) Pulpe rouge

Chez les souris Ntg, une déplétion sévère de la pulpe rouge a été observée dès vingt-quatre heures post-traitement. Elle est caractérisée par une diminution des cellules histioplasmocytaires, une disparition des mégacaryocytes et des cellules érythropoïétiques. Cependant, entre vingt-sept et quarante-huit heures, ces souris démontrent un repeuplement cellulaire de la pulpe rouge (tableau X). Ce repeuplement touche les cellules de type histioplasmocytaire, granulocytaire, érythropoïétiques et mégacaryocytaire. À soixante-douze heures, tous les animaux présentent une pulpe rouge reconstituée (tableau X) avec un aspect normal.

Chez les souris Tg RV-105 et RV-106, à vingt-quatre heures après le traitement aux LPS, la rate a présenté une déplétion lymphoïde marquée dans la pulpe rouge (tableau X). Cette déplétion s'est manifestée dès vingt-quatre et jusqu'à quarante-huit heures post-traitement (tableau X); elle est caractérisée par une diminution des cellules

histioplasmocytaires et une disparition des mégacaryocytes et des cellules érythropoïétiques. Cependant, un très faible repeuplement de cette pulpe a débuté à vingt-sept heures post-traitement chez les souris RV-105 et à trente heures chez les souris RV-106 (tableau X). Ce repeuplement de la pulpe rouge est apparu un peu plus marqué entre trente-six et quarante-huit heures après le traitement au LPS chez les souris RV-105, mais il est resté juste perceptible chez les souris RV-106 (tableau X). À soixante-douze heures, la plupart des animaux Tg (RV-105 et RV-106) ont développé un repeuplement marqué de la pulpe rouge; cependant quelques souris RV-105 (4/11=1/3) et RV-106 (2/8=1/4) ont maintenu une pulpe rouge peu repeuplée avec une déplétion lymphocytaire persistante plus ou moins sévère de la pulpe blanche (tableau X).

b) Pulpe blanche

Aucune souris Ntg n'a développé de déplétion lymphoïde de la pulpe blanche (figure 12.1A). Bien au contraire, toutes les souris Ntg ont développé une hyperplasie évolutive lymphoïde de la pulpe blanche passant de légère à vingt-quatre heures, à modérée à vingt-cinq heures trente, et devenant de plus en plus sévère entre vingt-sept et soixante-douze heures (tableau X), (figures 12.1 à 12.3).

Chez les souris Tg RV-105 et RV-106, entre vingt-cinq heures trente jusqu'à trente-six heures après les traitements aux LPS, nous avons noté une déplétion lymphoïde modérée à sévère de la pulpe blanche (tableau X). Cette déplétion lymphoïde est caractérisée par une diminution du nombre et de la taille des follicules et par une disparition des lymphocytes autour des travées spléniques (figure 12.1 B). Entre quarante-huit et soixante-douze heures, la majorité des souris Tg ont développé une hyperplasie lymphoïde modérée à sévère. Cependant, 4/11 souris RV-105 et 1/8 souris RV-106 ont maintenu une déplétion lymphoïde modérée à sévère (tableau X), (figures 12.1 à 12.3).

La comparaison de résultats dans la cinétique d'histopathologie de la rate entre les souris Tg et Ntg traitées aux LPS, démontre que les souris transgéniques ont montré un repeuplement cellulaire moins efficace ou retardé de la pulpe rouge; cette altération est plus évidente entre trente-six et quarante-huit heures, mais elle peut être

encore observée chez quelques souris Tg à soixante-douze heures (figures 12.1 à 12.3).

La pulpe blanche a démontré une déplétion lymphoïde modérée à sévère à vingt-cinq heures trente, à trente-six heures et chez quelques souris même à soixante-douze heures. Cette déplétion lymphoïde suggère qu'il pourrait y avoir soit une destruction et/ou une redistribution de cellules lymphoïdes spléniques dans d'autres compartiments tissus et/ou sang. De plus le retard dans le repeuplement pourrait amplifier la déplétion lymphoïde splénique (figures 12.1 à 12.3).

Tels que présentés dans le tableau X, les observations recueillies suggèrent les conclusions suivantes:

- i) Il y a peu de différence entre les souris Tg et Ntg au niveau de la pulpe rouge que ce soit pour la déplétion ou le repeuplement.
- ii) Il y a une déplétion forte lymphoïde chez les souris Tg qui n'est pas retrouvée chez les souris Ntg. La faible densité lymphoïde reste significative à tous les temps considérés et même si certaines Tg repeuplent la pulpe blanche, cela n'atteint pas le niveau observé chez des souris Ntg.
- iii) Les lymphocytes des souris Tg semblent montrer une sensibilité accrue au traitement par les LPS, comparativement à ceux des souris contrôles NTg.

Fig. 12.1. Rates de souris Ntg et Tg traitées aux LPS, vingt-sept heures après le traitement. Coloration aux HPS: A: rate de souris Ntg: présence des grands follicules volumineux (f) (200x). L'encadré à droite montre les détails histopathologiques d'un follicule splénique bien peuplé de lymphocytes (2000x). B: rate de souris Tg avec forte déplétion lymphoïde marquée par des petits follicules (f). L'encadré à droite montre les détails histopathologiques d'un petit follicule splénique moins peuplé de lymphocytes (2000x).

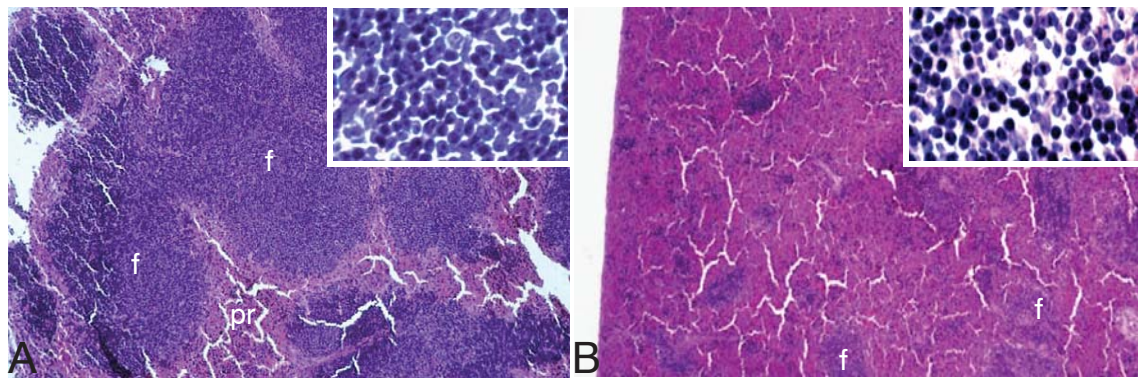


Fig. 12.2. Rates de souris Ntg et Tg traitées aux LPS, quarante-huit heures après le traitement. Coloration HPS: A: rate de souris Ntg, montrant la présence des grands follicules volumineux (f) (200x). L'encadré à droite illustre les détails histopathologiques d'un follicule splénique. À ce fort grossissement (1600x), il n'y a pas de différence évidente avec les souris Tg. B: rate de souris Tg montrant des follicules de taille petite à moyenne (f) (200x). L'encadré droit: détails histopathologiques à fort grossissement (1600x) d'un follicule splénique plus petit, mais sans différences évidentes avec les souris NTg. C et D: montrent les détails histopathologiques de la pulpe rouge (pr) splénique, souris Ntg avec beaucoup d'érythrocytes (C) (500x) et souris Tg avec une déplétion cellulaire (D) (500x).

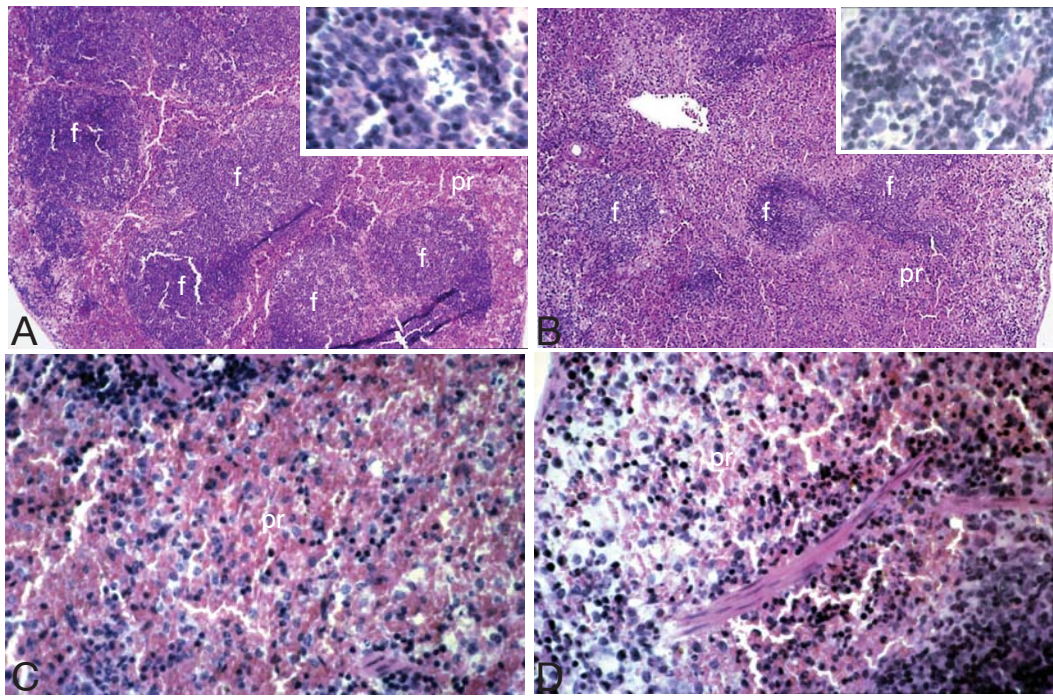
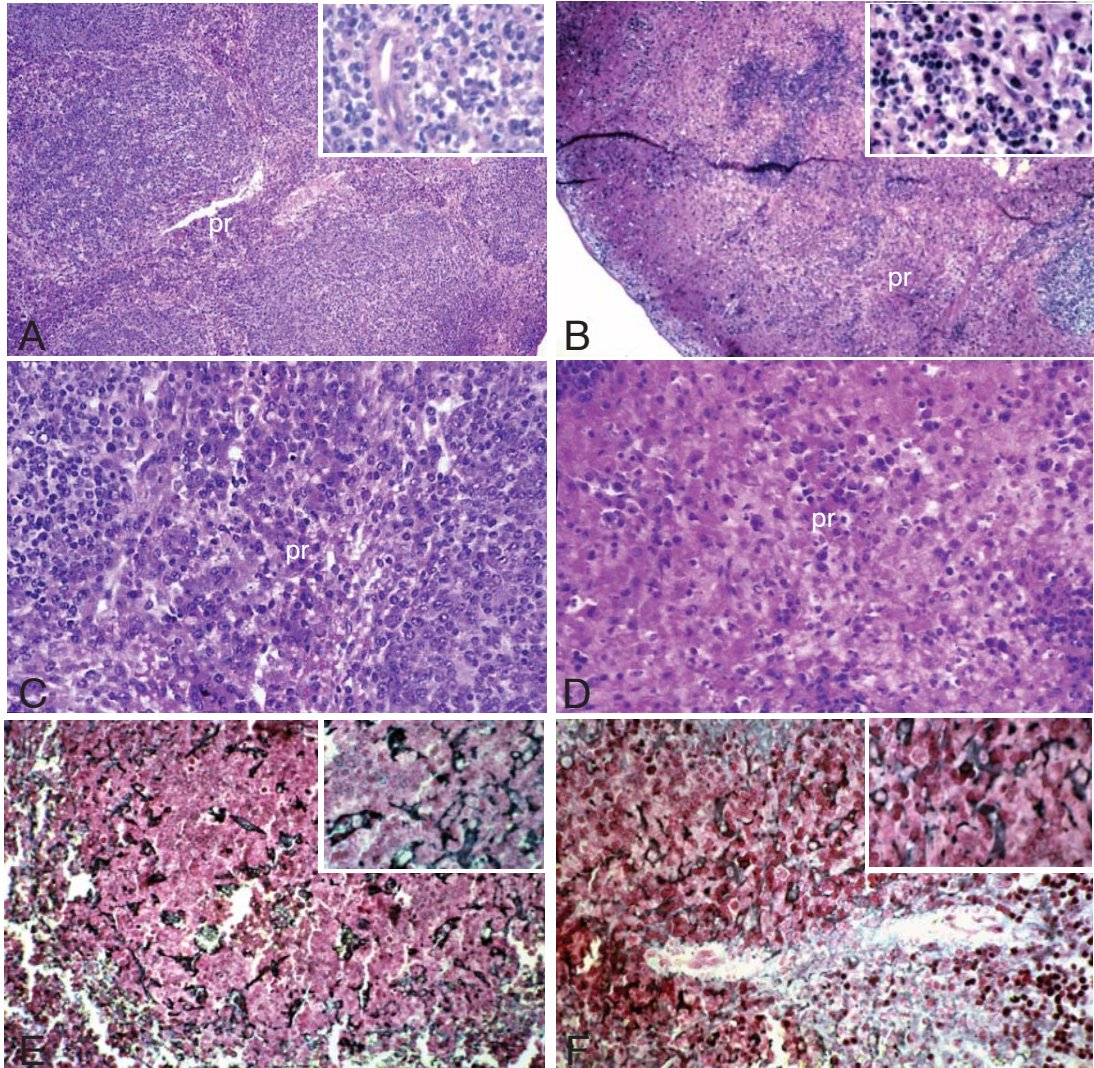


Fig. 12.3. Rates de souris Ntg et Tg traitées aux LPS, soixante-douze heures après le traitement, A, B, C, et D colorations à l'HPS: A, rate de souris Ntg: présence des grands follicules volumineux (f) (200x). L'encadré droit montre les détails histopathologiques d'un follicule splénique bien peuplé de lymphocytes (1600x). B, rate de souris Tg: présence d'une déplétion lymphoïde sévère avec quelques rares petits follicules (f) (200x). L'encadré droit montre les détails histopathologiques d'un follicule splénique moins peuplé de lymphocytes (1600x). C et D: montrent les détails histopathologiques de la pulpe rouge splénique (pr), souris Ntg avec une pulpe rouge réduite par l'expansion de follicules (C) (500x) et souris Tg avec une déplétion cellulaire très sévère (D) (500x). E et F, argentation de Marshall modifiée : détails histopathologiques de l'organisation de cellules métallophiliques folliculaires de rates de souris Ntg avec une distribution homogène de cellules métallophiliques (en noir) dans les centres germinatifs folliculaires (E) (2000x) et Tg avec des cellules très fortement colorées (en noir) et désorganisées (F) (2000x).



E) Examen histopathologique du thymus après traitement aux LPS

L'examen histopathologique du thymus suite au traitement par les LPS nous a amenés à noter deux altérations principales: 1) la déplétion lymphoïde du cortex et 2) l'augmentation du nombre de petites cellules denses fortement colorées d'aspect apoptotique.

Chez les souris Ntg, la déplétion lymphoïde est apparue avant d'observer l'aspect apoptotique ; elle est très légère dès 25:30 hrs mais devient sévère à soixante-douze heures. Cependant, l'apoptose ne devient modérée à sévère que plus tard, entre trente et quarante-huit heures (tableaux XI). Ces résultats suggèrent qu'au début, probablement il y a eu une redistribution des lymphocytes du thymus et après, la mort cellulaire par apoptose a empiré la déplétion lymphoïde.

Chez les souris Tg RV-105 et RV-106, contrairement aux souris Ntg, l'apoptose est présente avant la déplétion lymphoïde. L'apoptose est déjà observée à 25:30hrs, alors que la déplétion lymphoïde se présente de façon très légère à trente heures, modérée à trente-six heures et devient sévère à quarante-huit heures. Ces résultats suggèrent que l'apoptose est la principale cause de la déplétion lymphoïde chez les souris Tg (tableau XI).

L'ensemble de ces observations sur le thymus à différents temps d'exposition aux LPS démontre qu'il y a une susceptibilité accrue à l'apoptose de lymphocytes T immatures de souris Tg quand ils sont stimulés par la voie des LPS.

Tableau XI. Cinétique histopathologique du thymus après le traitement avec lipopolysaccharides

Temp Heures	Déplétion lymphoïde			Apoptose		
	Tg RV-105	Tg RV- 106	Ntg	Tg RV-105	Tg RV-106	Ntg
24:00	-	-	-	-	-	-/+
	-/+	-/+	-	-	-	-/+
25:30	-	-	-/+	-/+	-/+	-
	-	-	-/+	-/+	-/+	-
27:00	-	-	-/+	+	++	-
	-	-	-/+	+	++	-
30:00	-/+	-/+	+++	+++	+++	+++
	-/+	-/+	+	+++	+++	+/-
36:00	++	++	++	+++	+++	++
	++	++	++	+++	+++	+++
48:00	+++	+++	++	+++	+++	++
	+++	+++	-/+	+++	+++	++
			-/+		++	
72:00	+++	+++	+++	-	-	-
	+++	+++	+++	-	-	-
	+++	+++	+++	-	-	-
	+++	+++	++	-	-	-
	+++	++	+++	-	-	-
	+++	+++	+	-	+	-
	+++	++	+++	+++	-	-
	+++	+++	+++	-	-	++
	+++		+++	-		-
			+++			-

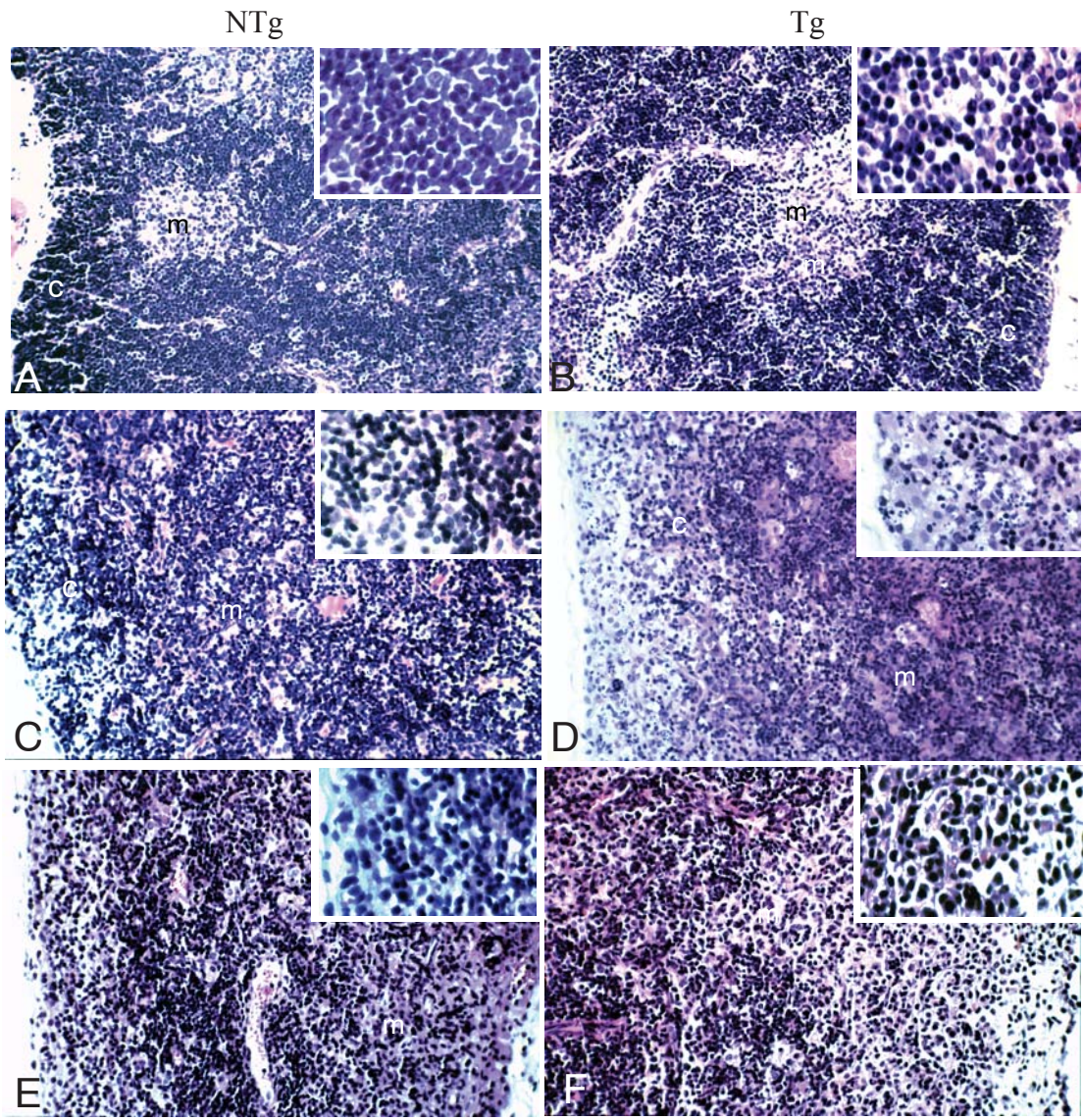
Notes: - Négatif
 -/+ Très léger
 + Léger
 ++ Modéré
 +++ Sévère

Fig 12.4. Thymus de souris Ntg et Tg traitées aux LPS, coloration HPS.

i) Vingt-sept heures après le traitement. A et B: thymus de souris Ntg (A) peuplé avec une grande quantité de lymphocytes, et thymus de souris Tg (B) légèrement moins peuplé de lymphocytes (c=cortex, m=médullaire) (500x). Les encadrés à droite montrent les détails histopathologiques des thymus qui, cette période de temps, ne montrent pas de différences évidentes (2000x).

ii) Quarante-huit heures après le traitement : les souris Ntg (C) montrent une forte déplétion lymphoïde chez par rapport à la période précédente. Les thymus de souris Tg (D) montrent une déplétion plus sévère que celle de souris Ntg. (c=cortex, m=médullaire) (500x). Les encadrés à droite: montrent les détails histopathologiques de la déplétion lymphoïde du thymus, laquelle est plus évidente chez les souris Tg (1600x).

Thymus de souris Ntg et Tg traitées aux LPS, soixante-douze heures après le traitement démontrant un évident repeuplement lymphocytaire par rapport au temps précédent, coloration au HPS: E et F, thymus de souris Ntg avec un léger repeuplement (E) et de souris Tg avec un repeuplement de lymphocytes légèrement moins fort que celui de souris Ntg (F), c=cortex, m=médullaire. Les encadrés à droite montrent les détails histopathologiques du thymus.



F) Immunohistochimie de la rate chez les souris traitées aux LPS après soixante-douze heures

Étant donné que les modifications entraînées par les LPS étaient plus évidentes sur les rates à soixante douze heures, nous avons choisi d'effectuer des colorations immunohistochimiques pour déterminer quelles populations cellulaires étaient les plus affectées. Pour cela nous avons utilisé les anticorps spécifiques suivants: Mac-3/84 pour les macrophages), anti-B220 pour les lymphocytes B et anti-CD4 et anti-CD8 pour les lymphocytes T CD4 et CD8 respectivement. La réaction d'immunoperoxydase a été effectuée dans les mêmes conditions, sur des coupes de rates congelées provenant des souris Tg (RV-105 et RV-106) et des souris Ntg traitées et non traitées aux LPS.

Avec les anti-B220, toutes les souris, Tg et Ntg, ont démontré un immunomarquage similaire périfolliculaire dans la zone du manteau folliculaire. Toutes les souris Tg et Ntg ont démontré une diminution de la quantité de cellules marquées par l'anticorps anti-B220 à soixante-douze heures post-traitement, mais cette diminution est plus forte chez les souris Tg (figures 12.5.1 A à D).

L'immunomarquage par l'anticorps Mac-3/84 pour les macrophages activés a démontré un petit nombre de cellules positives chez les souris Tg non traitées. Par contre, aucune cellule positive n'a été décelée chez les souris Ntg non traitées. Après le traitement avec LPS, il y a eu apparemment une légère augmentation du nombre de cellules positives chez toutes les souris Tg et Ntg traitées (figures 12.5.2 A à D).

L'immunomarquage avec l'anti-CD4 a permis de déceler seulement quelques amas de cellules fortement marquées chez toutes les souris Tg et Ntg non traitées, avec une réaction plus intense chez les souris Tg (figures 12.5.3 A et B). Après le traitement avec les LPS il y a eu une diminution du nombre de cellules marquées par l'anti-CD4 chez les souris Ntg et Tg (figures 12.5.3 C et D).

L'immunomarquage avec l'anti-CD8 a permis de déceler très peu de marquage positif chez toutes les souris Tg et Ntg non traitées ou traitées (figures 12.5.4 A à D).

Finalement, tous les résultats de réactions immunohistochimiques après les traitements aux LPS ont démontré chez les souris Ntg et Tg une diminution des sous

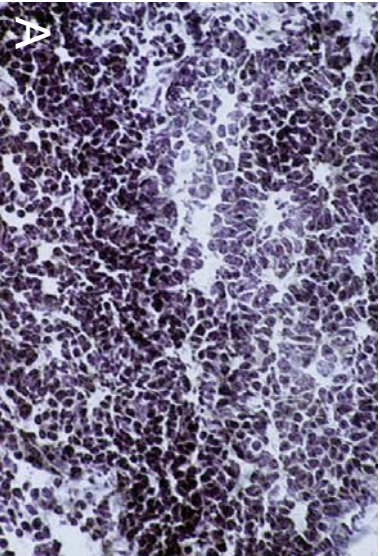
populations lymphocytaires B et T, cette diminution étant plus sévère chez les souris Tg. Les macrophages activés ont augmenté chez les souris Ntg et Tg, mais l'augmentation est plus évidente chez les souris Tg ceci est dû au fait que les macrophages sont activés par les LPS. Le nombre réduit de lymphocytes CD8 n'a pas permis d'observer de différences entre les souris Tg et les contrôles NTg.

Ces réactions d'immunohistochimie ne sont pas très représentatives car le traitement aux LPS a causé une très forte destruction de cellules qui composent les organes lymphoïdes et nous n'avons pu prendre en photographie que quelques rares amas de cellules qui restent dans les tissus.

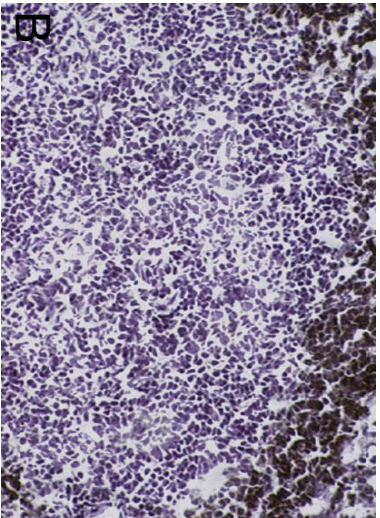
Fig. 12.5.1 Immunodétection de B220 dans des rates de souris Ntg et Tg non traitées et traitées aux LPS, soixante-douze heures après le traitement: (A) rate de souris Ntg non traitée (600x). (B) rate de souris Tg non traitée (500x). (C) rate de souris Ntg traitée aux LPS (600x) et (D) rate de souris Tg traitée aux LPS (600x).

Anti-B220

Ntg



Tg



Souris non
traitées

Souris traitées
aux LPS

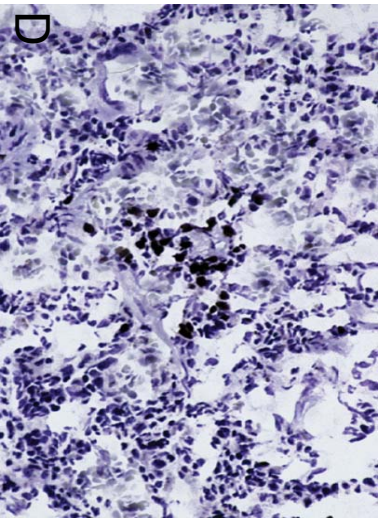
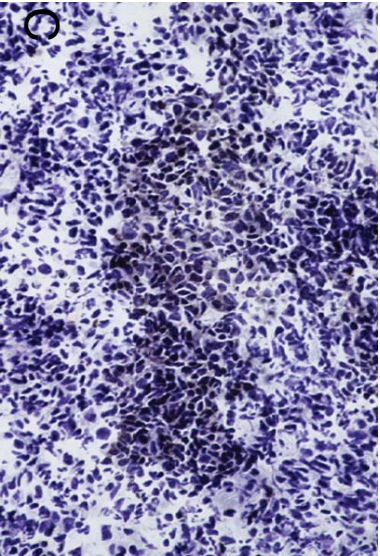
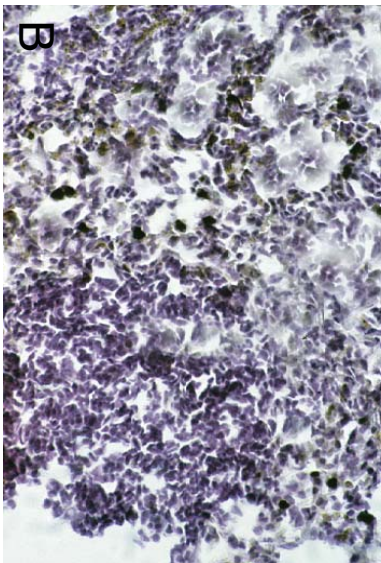
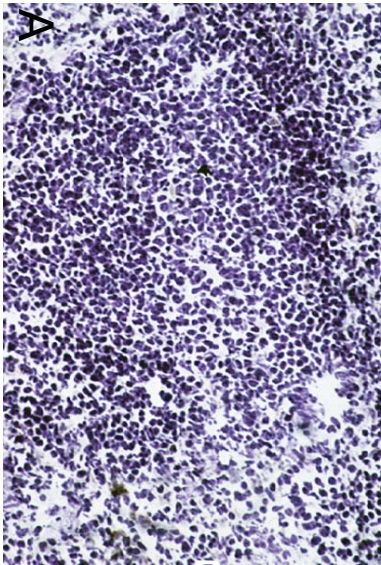


Fig. 12.5.2 Immunodétection de Mac-3 dans des rates de souris Ntg et Tg non traitées et traitées aux LPS, soixante-douze heures après le traitement: (A) rate de souris Ntg non traitée (600x). (B) rate de souris Tg non traitée (700x). (C) rate de souris Ntg traitée aux LPS (700x) et (D) rate de souris Tg traitée aux LPS (800x).

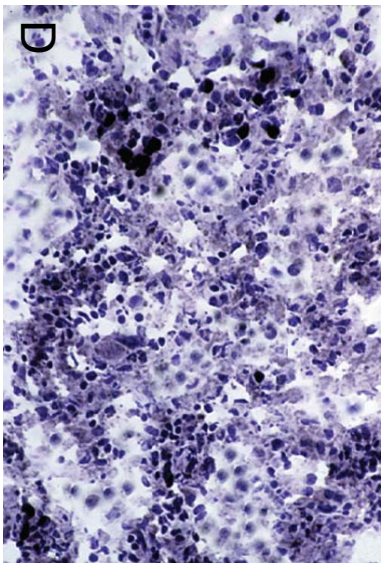
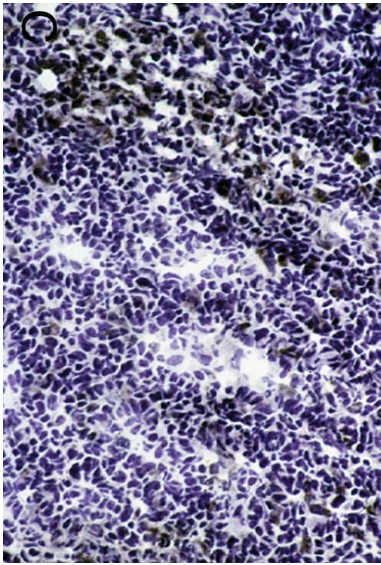
Ntg

Anti-Mac 3

Tg



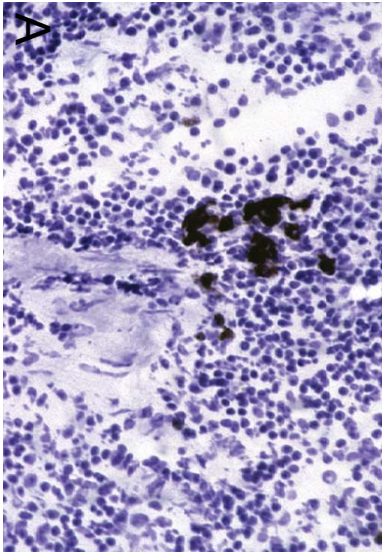
Souris non
traitées



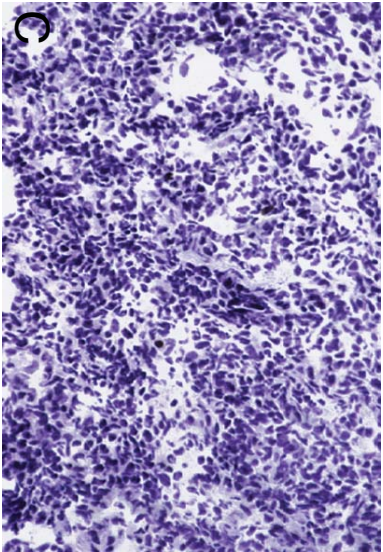
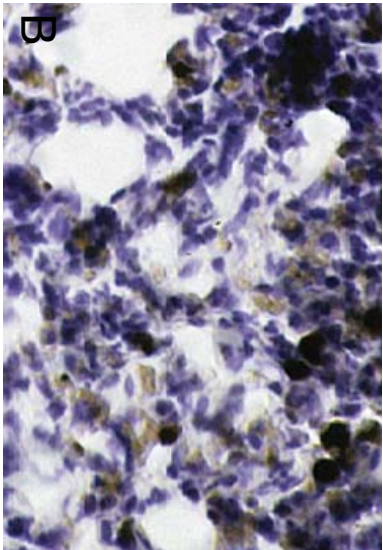
Souris traitées
aux LPS

Fig. 12.5.3 Immunodétection de CD4 dans des rates de souris Ntg et Tg non traitées et traitées aux LPS, soixante-douze heures après le traitement: (A) rate de souris Ntg non traitée (700x). (B) rate de souris Tg non traitée (800x). (C) rate de souris Ntg traitée aux LPS (600x) et (D) rate de souris Tg traitée aux LPS (600x).

Anti-CD4



Souris non
traitées



Souris traitées
aux LPS

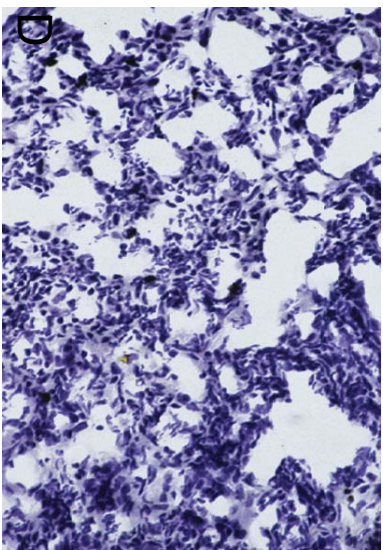
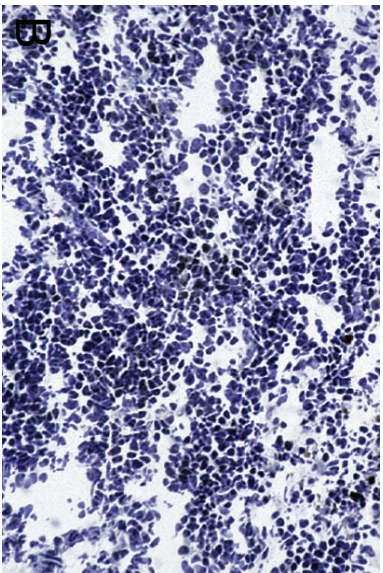
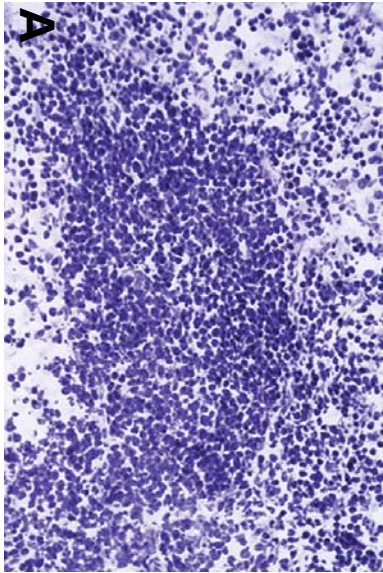


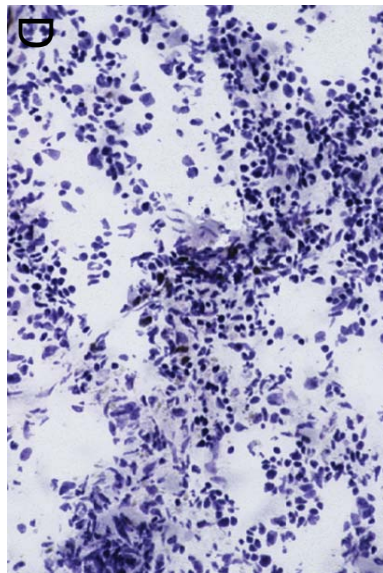
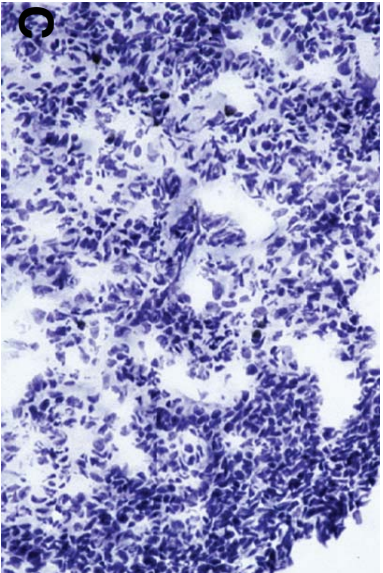
Fig. 12.5.4 Immunodétection de CD8 dans des rates de souris Ntg et Tg non traitées et traitées aux LPS, soixante-douze heures après le traitement: (A) rate de souris Ntg non traitée (600x). (B) rate de souris Tg non traitée (600x). (C) rate de souris Ntg traitée aux LPS (600x) et (D) rate de souris Tg traitée aux LPS (600x).

Ntg Anti-CD8 Tg

Souris non
traitées



Souris traitées
aux LPS



G) Réaction cutanée de Schwartzman et histopathologie de la peau à soixante-douze heures post-traitement avec LPS

Dans cette partie, nous avons examiné les effets de LPS dans la peau des souris Tg et Ntg.

Pour cette expérience nous avons utilisé un total de 74 souris, 24 RV-105, 24 RV-106 et 26 Ntg, toutes âgées de 70 jours. Toutes ces souris ont reçu une injection sous-cutanée de LPS de *Serratia marcescens* à raison de 5 µg/30gr de poids.

Vingt-quatre heures post injection, 6 animaux (2 RV-105, 2 RV 106, 2 Ntg) ont été sacrifiés avec une surdose de Somnotol (pentobarbital sodique) et les 68 autres ont reçu une deuxième injection de LPS par voie intrapéritonéale à raison de 3.3 mg/kg de poids de l'animal. Deux souris de chaque lignée ont été sacrifiées 25h30, 27h, 30h, 36h et 48h après la première injection. Les douze souris restantes dans chacune des lignées ont été sacrifiées 72 heures après la première injection.

Nous avons examiné macroscopiquement dans le tissu sous-cutané, au site de l'injection de la première dose de LPS, la présence ou l'absence de la réaction cutanée de Schwartzman, caractérisée par une zone hémorragique d'environ 1 cm de diamètre (figure 12.6 A). À l'examen histopathologique, cette réaction cutanée présente des dommages vasculaires (vasculites, thromboses et hémorragies) et des infiltrations inflammatoires par des macrophages et des neutrophiles (figure 12.6 B).

La fréquence de cette lésion a été plus élevée chez les groupes de souris Tg principalement la lignée RV-105 (20/23), RV-106 (10/20), et moins fréquente chez le groupe de souris Ntg (3/25) (tableau XII).

De vingt-quatre à vingt-cinq heures trente les souris Tg (RV-105 2/4 et RV-106 1/3) ont présenté une réaction légèrement positive, mais aucune souris Ntg n'en a présenté (tableau XII).

Dès vingt-sept à quarante-huit heures les souris Tg RV-105 (8/8) et RV-106 (5/8) ont montré une réaction positive. Chez les RV-105, la lésion était légère 5/8 souris, modérée chez 2/8 souris et sévère chez 1/8 souris. Chez les souris Tg RV-106, 2/8 souris étaient sans lésion, 1/8 souris très légèrement perceptible, 1/8 avec lésion

légère, 2/8 avec lésion modérée et 2/8 avec lésion sévère. Chez les souris Ntg seulement 2/9 souris ont développé une lésion légère (tableau XII).

À soixante-douze heures, les souris Tg RV-105 (10/11) et RV-106 (4/8) ont montré une réaction positive. Chez les onze souris RV-105 incluses dans cette expérience, la lésion était très légèrement perceptible chez 1/11, légère 1/11, modérée 3/11 et sévère 6/11. Chez les souris Tg RV-106 examinées, 2/8 étaient sans lésion, 2/8 avec lésion très légèrement perceptible, 2/8 avec lésion modérée et 2/8 avec lésion sévère. Chez les souris Ntg seulement 1/12 souris a développé une lésion modérée et 2/12 une lésion légèrement perceptible (tableau XII).

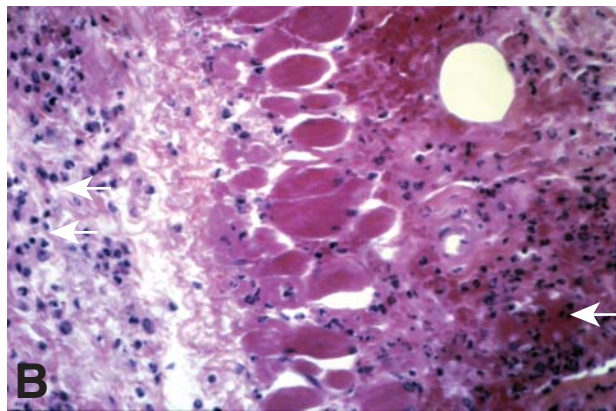
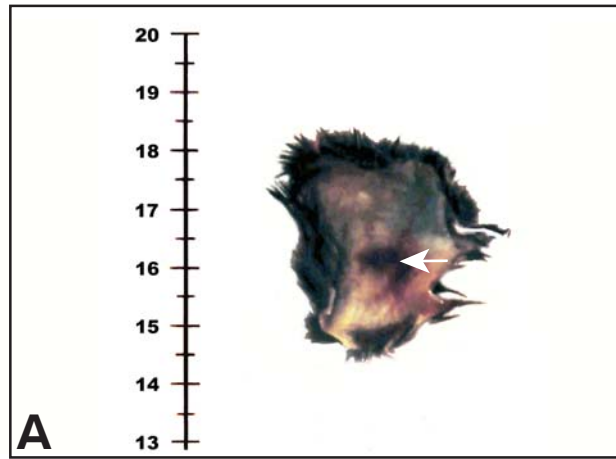
Ces résultats démontrent que ce sont les souris Tg de deux lignées qui ont fortement réagi aux LPS, particulièrement les souris de la lignée RV-105.

Tableau XII. Fréquence et intensité de la réaction cutanée de Schwartzman dans la cinétique avec lipopolysaccharides

Temps Heures	Intensité de la lésion cutanée		
	RV-105	RV-106	Ntg
24:00	+	-	-
	-	+	-
25:30	-	-	-/+
	++	-/+	-/+
27:00	+	++	+
	+	+++	-
30:00	+++	+	-
	++	+++	-
36:00	+	++	+
	+	-	-/+
48:00	++	-/+	-
	+	-	-
72:00	+++	-/+	-
	+	-	-
	+++	++	-
	++	-/+	-
	++	++	-
	+++	+++	++
	+++	-	-/+
	+++	+++	-
	+++		
	-/+		-
++		-	
		-	
	20/23 (87%)	10/20 (50%)	3/25 (12%)

Notes: - négatif
 -/+ très léger
 + léger
 ++ modéré
 +++ sévère

Fig. 12.6. Aspect macroscopique A et B histopathologique de la réaction de Schwartzman de la peau de souris Tg traitée aux LPS. A: zone hémorragique sous-cutanée (flèche). B: thrombose (flèche à droite) et infiltration de cellules inflammatoires (flèches à gauche), coloration au HPS (500x).



III.v. Résultats de l'induction de l'hypersensibilité de type retardée avec l'albumine bovine sérique (ABS)

Dans la pratique clinique, la perte de la réponse à la réaction d'hypersensibilité retardée est une indication d'une fonction déficiente des cellules T, aussi appelée "anergie" (Abbas, A. K. *et al.*, 2003c). Le développement de la réaction d'hypersensibilité retardée est reliée à la réponse des lymphocytes T CD4, principalement les Th1 (Abbas, A. K. *et al.*, 2003c). Ce type de réaction d'hypersensibilité se développe en général contre tous les antigènes protéiques, quand ceux-ci sont introduits en faible quantité dans la peau. Les cellules présentatrices d'antigènes prennent alors ces antigènes et migrent dans les ganglions lymphatiques pour les présenter aux lymphocytes T auxiliaire (Leenaars, M. *et al.*, 1997).

Les lymphocytes des patients infectés par le VIH perdent leur capacité de réagir aux mitogènes et aux stimulations par anticorps et superantigènes. Cette absence de réponse peut être expliquée en partie par l'induction de l'apoptose de ces cellules en réponse aux stimuli (Oyaizu, N. *et al.*, 1995; Wattré, P. *et al.*, 1996).

Chez les patients infectés par le VIH, il y a aussi une altération de l'immunité à médiation cellulaire qui diminue les réactions d'hypersensibilité retardée fortement liée à une anergie et au déficit immunitaire (Recommendations of the Advisory Committee for elimination of tuberculosis, MMWR., 1990; Flament-Saillour, M. *et al.*, 1997).

Pour examiner *in vivo* la fonction du système immunitaire et pour évaluer la fonction des lymphocytes T après une stimulation antigénique chez les souris Tg en comparaison avec les souris Ntg, nous avons utilisé le protocole déjà décrit dans la section II.vi dans Matériel et Méthodes.

III.v.i. Mesures de la tuméfaction des pattes de souris Tg et Ntg

Les souris Tg, 2/5 souris de la lignée RV-105 et 1/6 souris de la lignée RV-106, ont développé une tuméfaction marquée du coussinet plantaire vingt-quatre heures après l'injection de séroalbumine bovine (BSA) (tableau XIII).

La même tuméfaction marquée a été observée chez trois autres souris RV-105 et trois autres RV-106 quarante huit heures après injection. Le reste des souris Tg incluses dans ce protocole (2 souris RV-105, 3 RV-106) n'a développé qu'une faible tuméfaction même à 48h après l'induction (tableau XIII).

Chez les souris Ntg, quatre sur cinq ont démontré une forte tuméfaction du coussinet plantaire à vingt-quatre heures après l'injection de BSA. Ces quatre souris ont développé un dégonflement évident des coussinets plantaires à quarante-huit heures. La seule souris Ntg qui avait développé une tuméfaction légère à 24h, a développé une tuméfaction marquée à 48h (tableau XIII).

L'analyse statistique a démontré que les moyennes des mesures des coussinets plantaires chez les souris Tg RV-105 (3.89) et RV-106 (4.28) à zéro heure et à vingt-quatre heures chez les RV-105 (4.678) et RV-106 (4.8) ne sont pas statistiquement significatives ($p > 0.05$), mais à quarante-huit heures les moyennes des mesures chez les souris RV-105 (4.86) et RV-106 (5.03) deviennent statistiquement significatives chez les souris Tg ($p < 0.05$) (tableau XIII).

Chez les souris Ntg, la moyenne des mesures, à zéro heure (4.17) et à vingt-quatre heures (5.298) est également statistiquement significative ($p < 0.05$), mais la moyenne à 48 heures (4.466) devient statistiquement non significative ($p > 0.05$) (tableau XIII).

La comparaison statistique des moyennes des différences des mesures à zéro et vingt-quatre heures entre les souris RV-106 (0.52) et Ntg (1.13) a démontré une différence statistiquement significative. Il y a également une différence statistiquement significative à zéro et quarante-huit heures entre les souris RV-105 (0.974) et les Ntg (0.294).

Ces résultats de la dermoréaction démontrent que la majorité des souris transgéniques (Tg) ont développé la réaction d'hypersensibilité retardée manifestée par la tuméfaction. Cependant, la réaction atteint son maximum à quarante-huit heures alors

que la majorité des souris Ntg l'atteignent déjà après vingt-quatre heures. Ces résultats mettent en évidence un retard de vingt-quatre heures dans le développement de la réaction d'hypersensibilité retardée chez les souris Tg, comparativement aux souris Ntg.

Tableau XIII. Sévérité de la réaction cutanée d'hypersensibilité retardée induite par l'immunisation avec l'albumine bovine, mesurée en millimètres

Lignée	Mesure 1 0 heures	Mesure 2 24 heures pi	Différence entre 0 et 24 h pi	Mesure 3 48 heures pi	Différence entre 0 et 48 h pi
RV-105					
1	4.37	4.93	0.56	4.59	0.22
2	4.71	5.04	0.33	5.25	0.54
3	2.98	4.15	1.17	4.6	1.62
4	3.24	4.67	1.43	4.52	1.28
5	4.16	4.6	0.44	5.37	1.21
Moyenne	3.89*	4.678	0.786	4.86*	0.974**
Dstd	0.746	0.346	0.4850	0.408	0.5752
RV-106					
1	4.28	4.88	0.6	5.4	1.12
2	3.76	4.64	0.88	4.5	0.74
3	4.84	5.29	0.45	5.09	0.25
4	4.02	4.53	0.51	4.31	0.29
5	3.67	4.22	0.55	5.22	1.55
6	5.1	5.23	0.13	5.7	0.6
Moyenne	4.28*	4.8	0.52**	5.03*	0.758
Dstd.	0.58	0.41	0.2424	0.53	0.5021
Ntg					
1	3.83	4.34	0.51	4.6	0.77
2	4.58	6.19	1.61	4.78	0.20
3	4.75	5.92	1.17	5.1	0.35
4	3.92	4.73	0.81	4.02	0.10
5	3.78	5.31	1.53	3.83	0.05
Moyenne	4.17*	5.298*	1.13**	4.466	0.294**
Dstd	0.45	0.778	0.4687	0.530	0.2897

* $P < 0.05$ comparaison à l'intérieur de chaque lignée.

** $P < 0.05$ comparaison entre les trois groupes de souris.

III.v.ii. Histopathologie de la réaction d'hypersensibilité retardée dans les coussinets plantaires

Cette analyse a été effectuée sur les coussinets plantaires excisés, fixés, sectionnés et examinés à la coloration HPS.

Chez les souris transgéniques RV-105, à quarante-huit heures post-induction, quatre souris sur cinq ont présenté un peu d'oedème ainsi qu'une infiltration très légère composée de macrophages et de neutrophiles (figure 13 B). Seulement une souris a présenté une infiltration modérée de cellules inflammatoires, principalement de macrophages, de neutrophiles et de quelques cellules mononucléées (lymphocytes et plasmocytes). Nous avons également observé de la nécrose focale de quelques rares fibres musculaires.

Chez toutes les souris RV-106 (six), l'infiltration a été plutôt légère, et elle comportait des lymphocytes, des neutrophiles et des macrophages (figure 13 B).

Chez les souris Ntg contrôles, deux souris sur cinq ont présenté à 24h post-induction une infiltration plus marquée de cellules inflammatoires, principalement composée de macrophages, de neutrophiles et de quelques cellules mononucléées (lymphocytes et plasmocytes) ainsi que de la nécrose focale de quelques rares fibres musculaires. Les trois autres souris n'ont présenté qu'une infiltration légère à modérée par des macrophages et des neutrophiles (figure 13 A).

Ces résultats histopathologiques confirment que la tuméfaction chez les souris Tg est retardée par rapport aux souris Ntg qui ont déjà supprimé la tuméfaction. De plus, la faible infiltration par des cellules inflammatoires suggère que la phase finale effectrice de la réaction d'hypersensibilité retardée n'a pas encore été complétée. Par contre, l'infiltration plus importante de cellules inflammatoires chez les souris Ntg, suggère que ces animaux ont atteint la phase terminale de cette réaction d'hypersensibilité.

III.v.iii. Histopathologie de la rate et du thymus dans la réaction d'hypersensibilité retardée (DTH)

Ces deux organes ont été examinés pour évaluer la réaction immune suite à l'induction de l'hypersensibilité.

a). Au niveau de la rate, toutes les souris de la lignée RV-105 et cinq sur six souris de la lignée RV-106 ont présenté une diminution du nombre et de la taille des follicules. Nous avons observé dans ces follicules une zone marginale mal délimitée et dépeuplée, et certains ont présenté un petit centre germinatif (figure 13 D). À l'intérieur de ces follicules nous avons noté la présence de figures apoptotiques, principalement chez les souris de la lignée RV-106. Ces souris ont donc développé une déplétion lymphoïde.

Pour mettre en évidence les cellules argentophiles (dendritiques et macrophagiques folliculaires), nous avons utilisé la coloration (argentation) de Marshall, qui marque ces cellules en noir. Cette argention démontre que les cellules argentophiles sont nombreuses au centre du follicule et quelques-unes sont périfolliculaires (figure 13 J). La pulpe rouge chez ces mêmes souris a démontré une légère déplétion, avec une augmentation modérée du nombre de neutrophiles et de mégacaryocytes.

Dans les rates de souris Ntg nous avons par contre noté des follicules plus volumineux; chaque follicule contient un centre germinatif plus développé, une zone marginale hyperplasique et des manchons lymphoïdes périartériolaires (MLPA) évidents (figure 13 C). La présence de figures apoptotiques à l'intérieur des follicules n'a été observée qu'occasionnellement chez ces souris.

L'argention de Marshall démontre que les cellules argentophiles sont nombreuses et situées à la périphérie de follicules (figure 13 I).

La pulpe rouge de ces souris est demeurée bien peuplée et a démontré une population plus hétérogène.

b). Les thymus d'animaux Tg et Ntg n'ont pas développé de changements pathologiques notables ni dans le cortex ni dans la médullaire (figures 13 G et H), à l'exception des souris de la lignée RV-106 chez lesquelles nous avons observé la présence de quelques figures apoptotiques dans le cortex et la médullaire.

Les résultats d'histopathologie de la rate montrent, chez les souris Tg, la présence de follicules moins développés, aux centres germinatifs plus petits ou absents, ce qui suggère une activation immunitaire bien plus faible en comparaison avec les souris Ntg. En plus, cette activation du système immunitaire par la protéine antigénique "ABS" a entraîné une déplétion lymphoïde au lieu de l'hyperplasie lymphoïde réactionnelle normale comme celle observée chez les souris Ntg.

La présence de figures apoptotiques dans la rate et le thymus suggère également qu'il pourrait y avoir une perte lymphocytaire qui pourrait encore augmenter la sévérité de la déplétion lymphoïde.

L'ensemble des observations de cette expérience démontre que les souris Tg ont réussi à développer une intradermoréaction positive, mais cette réaction demeure toujours plus retardée et plus faible en comparaison avec les souris Ntg.

Fig. 13. Réaction d'hypersensibilité retardée.

i) Colorations à l'HPS.

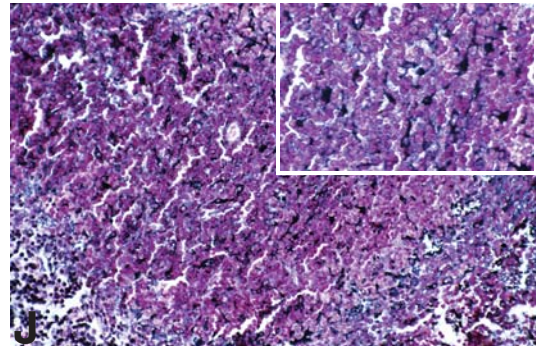
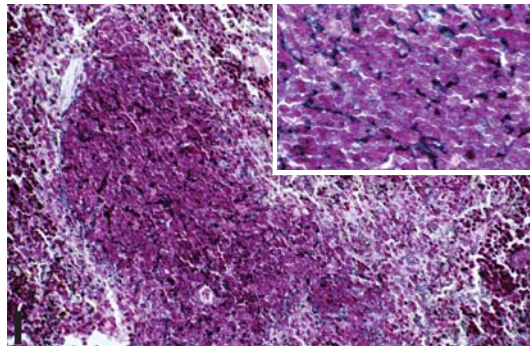
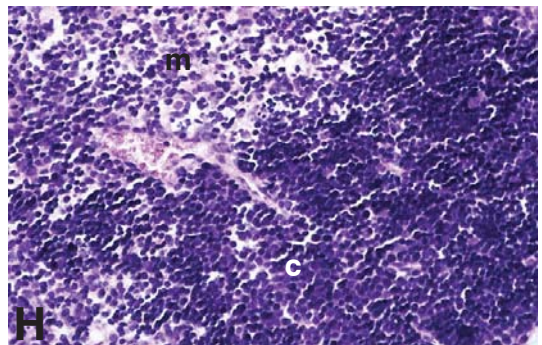
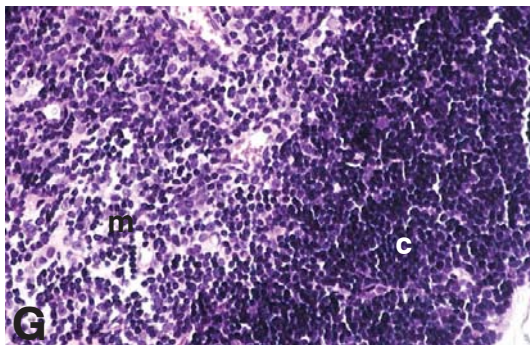
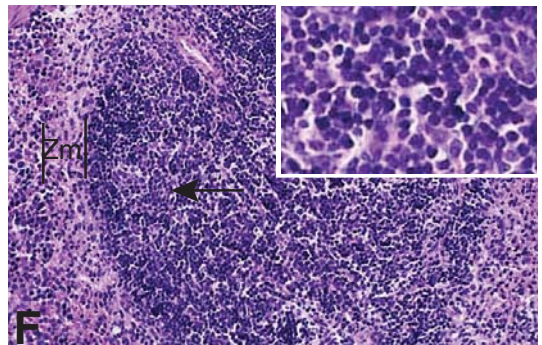
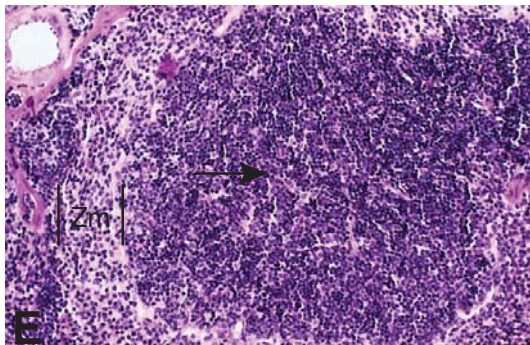
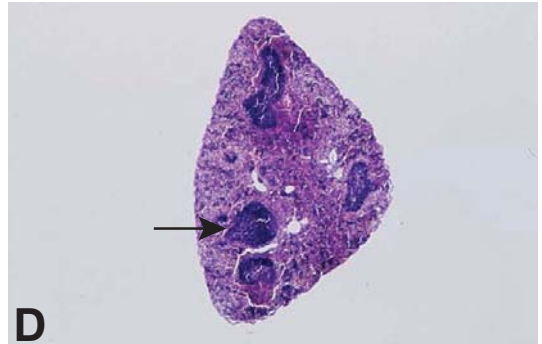
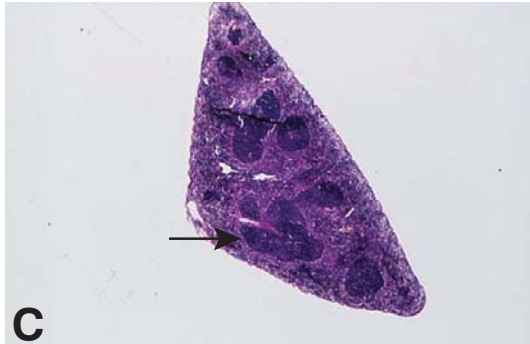
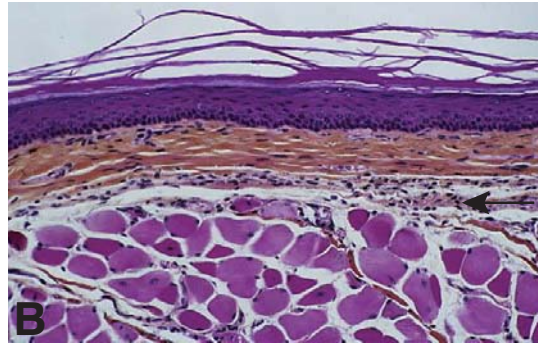
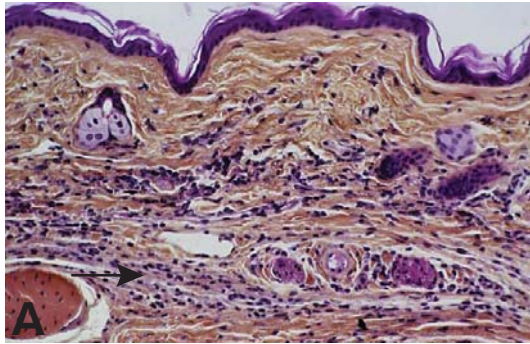
A et B, peau avec infiltration par des cellules inflammatoires (flèches) (500x). Souris Ntg (A) et souris Tg (B).

C et D, follicules spléniques (flèches) (50x). Souris Ntg avec plusieurs follicules (C) et souris Tg avec moins de follicules (D).

E et F, détail morphologique des follicules spléniques; zm: zone marginale, cg: centres germinatifs (flèches) (500x) (l'encadré droit 1600x) souris Ntg et Tg avec une apparence normale (F).

G et H, détail histopathologique du thymus; c: cortex, m: médullaire (800x) souris Ntg (G) et souris Tg (H).

ii) Colorations de Marshall. Détails morphologiques des follicules spléniques et distribution de cellules argentophiles en noir (500x). Souris Ntg (I) et souris Tg (J). I montre une distribution de ces cellules autour du follicule. J présente une distribution de ces cellules au centre du follicule. Les encadrés droits (1600x) montrent la morphologie étoilée des cellules argentophiles en noir.



IV. Discussion

Établissement des souris transgéniques et expression du transgène

Ce modèle de souris transgénique exprimant uniquement la protéine Vpu du VIH-1 a été développé pour connaître ses effets pathologiques dans un contexte de modèle *in vivo*. Ce modèle reste unique, étant donné que la majorité des modèles pour étudier les effets pathologiques des protéines du VIH-1 étaient des modèles de cellules transfectées avec d'autres protéines du virus ou des modèles de souris transgéniques portant le génome entier ou partiel du VIH-1 et qui exprimaient des protéines autres que Vpu (Terwilliger, E. F. *et al.*, 1989; Willey, R. L. *et al.*, 1992; Mosier, D. E. *et al.*, 1993 ; Miller, M. D. *et al.*, 1994 ; Santoro, T. *et al.*, 1994 ; Toggas, S. M. *et al.*, 1994 ; Jabbar, M. A. 1995 ; Su, L. *et al.*, 1995; Yao, X.J. *et al.*, 1995; Schwartz, O. *et al.*, 1996 ; Bruggeman, L. A. *et al.*, 1997; Kerkau, T. *et al.*, 1997; Hanna, Z. *et al.*, 1998; Ross, M. J. *et al.*, 2002).

Les résultats obtenus avec les différentes constructions transgéniques utilisées dans nos travaux ont permis de constater que la protéine Vpu, mise sous le contrôle d'un promoteur tissu spécifique fort tel que SL3-3 permettant de forts niveaux d'expression de la protéine, pouvait être cytotoxique. Ceci est suggéré par le fait que la construction SLvpu portant le gène vpu du HIV-1 sous le contrôle du promoteur SL3-3 n'a pas permis d'obtenir des animaux transgéniques alors que le transgène SLvpr nous a permis d'obtenir des fondateurs. Avec le transgène RSV-Vpu, nous avons établi quatre lignées de souris porteuses de vpu (RV-96, RV-105, RV-106 et RV-719). Nous pensons que le niveau d'expression de la protéine transgénique dans ces lignées n'est pas assez significatif pour entraîner la cytotoxicité et l'élimination probablement très précoce des embryons transgéniques. Ceci pourrait expliquer aussi la difficulté rencontrée pour visualiser cette protéine dans tous les tissus examinés par les approches immunohistologiques. Vpu n'a pu être détectée que par immunobuvardage des extraits protéiniques de fractions microsomales des tissus

analysés dans toutes les lignées Tg. Cela indique que Vpu est présente, mais à de très faibles niveaux (Lemaire C. *et al.*).

Dans notre modèle de souris Tg-vpu, Vpu ne se lie pas à la protéine BST-2 de souris. Par contre, il est possible que Vpu puisse se lier à la protéine β -TrCP2 de souris, homologue à l'h- β -TrCP (Butticaz, Ch. *et al.*, 2007). Mais on ne sait pas si Vpu- β -TrCP2 cible le récepteur CD4 de la souris pour le dégrader. Donc, on ne peut pas conclure que ce mécanisme pourrait contribuer à la dégradation de Vpu. Par contre deux voies de dégradation de Vpu, indépendantes de la voie de la β -TrCP, ont été récemment démontrées : i) quand Vpu est phosphorylée au résidu 61 de sérine, elle ne se lie pas à la β -TrCP et elle est donc dégradée au moment de l'arrêt du cycle cellulaire, au début de la mitose. ii) Vpu est reconnue comme un substrat pour une E3 ubiquitine ligase différente de la β -TrCP et est dirigée dans le protéasome pour sa dégradation (Estrabaud, E. *et al.*, 2007). La dégradation de Vpu par ces deux derniers mécanismes pourrait contribuer à la difficulté à démontrer sa présence dans notre modèle de souris Tg-vpu.

I. Évaluation clinique, anatomopathologique et histopathologique

A) Évaluation clinique et anatomopathologique

Les animaux Tg ne développent aucun signe clinique autre qu'une distension abdominale dont l'apparition et la gravité sont associées à l'importance de la splénomégalie qui ne se développe que tardivement entre 6 et 12 mois d'âge. Ceci pourrait s'expliquer par la faible expression de Vpu dans les tissus de ces souris Tg (Lemaire, Ch. et al., manuscrit). Nos résultats suggèrent que, contrairement aux souris normales âgées où la rate subit une involution, la souris vpu à âge égal ne démontre pas cette involution et la population lymphocytaire continue à proliférer, ce qui augmente la fréquence de la splénomégalie.

B) Évaluation histopathologique

L'évaluation histopathologique a mis en évidence le développement d'une lymphoprolifération pansystémique (poumons, reins, rate, foie) qui dans le cas de la rate, évolue en lymphome splénique. D'autres altérations tissulaires identifiées dans le foie des souris Ntg et Tg, sont des microfoyers de nécrose. Ces lésions hépatiques ressemblent à celles décrites chez les rats de laboratoire âgés normaux, chez lesquels ces microfoyers sont fréquents, mais non associés à des agents pathogènes (Eustis, S. L. *et al.*, 1990). Il est possible que ces microfoyers d'hépatite soient d'origine bactérienne, des bactéries provenant de l'intestin bien qu'il soit très rare de trouver des bactéries ou de l'inflammation suppurante dans ces microfoyers (Nold, J. B. *et al.*, 1996).

C) Analyse de la lymphoprolifération folliculaire de la rate

a) Fréquence de la lymphoprolifération folliculaire de la rate par groupe d'âge

Ces résultats histopathologiques démontrent que les hyperplasies folliculaires du groupe de souris âgées de 2 à 6 mois sont probablement le résultat d'une stimulation immunitaire très légère, peut-être induite par des antigènes de l'environnement ou par les effets de l'expression du transgène. À cet âge, il y a déjà un nombre croissant d'hyperplasies lymphoïdes chez les souris Tg, qui vont continuer à évoluer progressivement avec l'âge.

Dans le groupe de souris âgées de 7 à 12 mois, chez les souris Tg, la variation de la fréquence d'hyperplasie pourrait être expliquée du fait que certains des animaux développent une atrophie de la rate alors que les autres n'ont pas encore développé l'hyperplasie. Chez les souris Ntg, il y a encore des souris qui montrent une stimulation immunitaire, d'autres qui montrent un nombre de follicules normal et d'autres qui commencent à développer une atrophie de la rate. L'atrophie splénique peut se développer spontanément vers l'âge d'un an (Stefanski, S. A. *et al.*, 1990).

Cette involution normale de la rate pourrait expliquer la variabilité des résultats obtenus (tableau IIIb). Cette atrophie physiologique peut être associée à une diminution de production cytokines (IL-1 et IL-6) par les macrophages âgés (Chelvarajan, R. L. *et al.*, 2006).

Dans le groupe de souris âgées de 13 à 22 mois, les lymphoproliférations se développent exclusivement chez les souris Tg. Ces lymphoproliférations résultent probablement d'une stimulation immunitaire chronique ou persistante qui progresse avec l'âge des animaux Tg. Elles se manifestent chez ces souris par des hyperplasies pansystémiques et plus tardivement par de lymphomes spléniques. Cette stimulation est absente chez les souris Ntg qui, par conséquent, développent avec l'âge, une atrophie sénile de la rate (Stefanski, S. A. *et al.*, 1990) associée à une diminution de production d'IL-1 et d'IL-6 par les macrophages (Chelvarajan, R. L. *et al.*, 2006). Ces observations suggèrent que la dérégulation de ces cytokines impliquées dans l'atrophie physiologique de la rate chez les souris Ntg âgées seraient probablement impliquées dans les lymphoproliférations chez les souris Tg. Chez ces dernières, les niveaux de cytokines ne seraient pas affectés par cette diminution physiologique. De plus, nos résultats suggèrent que ces lymphoproliférations débutent assez précocement et continuent de progresser lentement jusqu'à un âge avancé et entraînent chez quelques animaux Tg des splénomégalias très sévères. Ces lymphoproliférations peuvent donc être caractérisées comme des lésions progressives, lentes et à manifestations cliniques et pathologiques tardives.

b) Caractéristiques histopathologiques

Les caractéristiques histopathologiques des lymphoproliférations spléniques dans les trois groupes d'âge suggèrent qu'il y a eu une progression de ces lymphoproliférations qui débutent par une hyperplasie folliculaire, avec conservation de l'architecture normale. L'hyperplasie s'aggrave et modifie progressivement l'architecture normale de la rate pour donner naissance à des lymphomes chez les souris Tg âgées. Les résultats d'immunohistochimie obtenus dans notre laboratoire

ont démontré que ces lymphoproliférations sont constituées d'une surproduction et d'une désorganisation des lymphocytes B (Lemaire, C. *et al.*, manuscrit) semblable à celle observée chez les patients infectés par le VIH-1 (Fauci, A. S., 1993; Oksenhendler, E., Lévy, Y., 1996; Lim, S. T., Levine, A. M. *et al.*, 2005). En plus, l'histochimie (imprégnation à l'argent) a démontré que les souris Tg développent, dans les MLPA des follicules de la rate, un réseau de cellules métalophiles (cellules dendritiques et macrophages), plus abondant et légèrement désorganisé par rapport aux souris contrôles.

La présence d'une augmentation du nombre de cellules métalophiles chez les souris Tg des trois catégories d'âge, suggère qu'elle pourrait être associée à l'activation du système immunitaire de façon chronique ou progressive. Ces cellules peuvent produire localement des cytokines (IL-6 ou IL-10) et activer le système immunitaire et participer au développement de lymphomes tel qu'observé au cours de l'infection par le VIH-1 (Fauci, A. S., 1993; Coze, C. M., 1994; Laroche, C. *et al.*, 1996). Ces mêmes cellules, en hybridation in situ, expriment les ARN messagers de vpu (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit).

Le vert de méthyle-pyronine a une forte affinité pour l'ARN ribosomal et marque intensément les cytoplasmes des cellules telles que les plasmocytes contenant des ribosomes impliqués dans la synthèse des anticorps (Burkitt, W., D., 1988). Puisque les cellules colorées dans la rate étaient de type lymphocytaire et plasmocytaire, cette coloration a démontré qu'il y a eu stimulation, multiplication puis différenciation des lymphocytes B et, par conséquent, augmentation de la synthèse des protéines (immunoglobulines). Cette forme d'activation semble de type non spécifique. La similitude de nos observations histopathologiques avec la maladie de Castleman et le modèle de souris à gène C/EBP- β inactivé suggère fortement qu'un dérèglement de production d'interleukine-6 pourrait être à l'origine de cette activation non spécifique du système immunitaire chez nos souris Tg. Dans ces deux modèles de souris (modèle à gène C/EBP- β inactivé et notre modèle), il y a eu une augmentation du nombre et de la taille des follicules, une perte progressive de l'architecture normale lymphoïde (lésion pré maligne) (Larroche, C. *et al.*, 1996), une atteinte glomérulaire

caractérisée par la présence de glomérules très volumineux et un épaissement de la substance mésangiale, qui peut être accompagnée d'une hyperplasie des cellules mésangiales (Brandt, S. J. *et al.*, 1990). Les lésions développées dans le modèle avec le gène C/EBP- β inactivé et notre modèle Tg évoquent des lésions similaires - soit un un Castleman-like où une augmentation de la production d'interleukine-6 serait à l'origine de ces lésions (Suematsu, S. *et al.*, 1989; Brandt, S. J. *et al.*, 1990).

L'immunodétection de l'IL-6 dans les cellules métallophiles réticulées de la rate et du rein des souris Tg atteintes de lymphoprolifération splénique démontrent que l'IL-6 est impliquée dans les lymphoproliférations de la rate chez les souris Tg et que ces cellules à cytoplasme réticulé (dendritiques et histiocytaires) dans les manchons lymphoïdes périartériolaires (MLPA) sont probablement la source locale principale de l'IL-6. De plus, ces mêmes cellules semblent exprimer les ARN messagers de vpu (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit) ; ceci suggère que dans ces cellules l'expression de Vpu pourrait être impliquée dans la dérégulation de l'IL-6. Les lésions rénales glomérulaires sont également associées aux effets de l'IL-6. L'IL-6 stimule le système immunitaire de façon non spécifique, en activant les lymphocytes B à se multiplier et à se différencier en cellules productrices des immunoglobulines (IgM, IgG et IgA). Dans les glomérules des souris Tg, on a démontré des dépôts d'immunoglobulines (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit), quelques rares cellules réticulées exprimant de l'IL-6 et qui semblent exprimer les ARN messagers de vpu (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit). Les dépôts des Igs dans les glomérules peuvent stimuler les leucocytes et les cellules dendritiques à produire des protéines d'inflammation (IL-6 et PDGF) et, de cette façon, amplifier la gravité des altérations glomérulaires (Horii, Y. *et al.*, 1989; Bruijn, J. A. *et al.*, 1998).

c) Mécanismes possibles de proliférations lymphoïdes chez le modèle de souris Tg

Malgré la mise en évidence de Vpu dans les extraits microsomaux de plusieurs organes de souris Tg, il n'a été possible de détecter que dans quelques types

cellulaires qui l'expriment. Ce sont les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD-8, les cellules réticulées dans les follicules lymphoïdes de la rate et des glomérules, des pneumocytes, des cellules épithéliales de l'épithélium bronchiolaire, des cellules endothéliales, et des cellules du muscle lisse des artérioles (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit). Mais les seules altérations histopathologiques observées sont l'hyperplasie lymphoïde pansystémique et splénique évolutive en lymphome et la glomérulonéphrite.

Ce modèle de souris Tg-vpu démontre clairement une association entre ces deux facteurs : l'expression de la protéine Vpu et la lymphoprolifération progressive, les deux dans la majorité des organes de souris. On a déjà décrit que Vpu utilise le système de l'ubiquitine-protéasome pour dégrader le récepteur CD4, le MHC-1 et utilise aussi le système endosomal et lysosomal pour dégrader la BST-2 (Estrabaud, E. *et al.*, 2007; Mitchell, R. S. *et al.*, 2009). Ces fonctions de Vpu sont réalisées grâce à l'interaction de cette dernière avec la β -TrCP. Cette interaction inhibe la fonction de la β -TrCP qui ne peut plus dégrader ses substrats comme la Cdc25A (cell division cycle protein 25A), l'I κ B (inhibitor kappa B), l'ATF4 (activating transcription factor 4), et la β -catenin (Estrabaud, E. *et al.*, 2007; Bour, S. *et al.*, 2001; Besnard-Guerin, C. *et al.*, 2004). Parmi ces substrats, la Cdc25A a la fonction d'activer à la kinase CDC2 dépendante de la cycline pour la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Quand il y a des dommages génétiques dans les cellules, la Cdc25A est dégradée pour empêcher ces cellules porteuses de lésions génétiques de rentrer en division cellulaire (Busino, L. *et al.*, 2004). Dans le modèle de souris Tg-vpu, Vpu pourrait reconnaître et lier la β -TrCP de souris étant donné la forte homologie qu'il y a entre la β -TrCP1 humaine et la β -TrCP2 de souris (Butticaz, Ch. *et al.*, 2007). Vpu pourrait intercepter la β -TrCP2 et la Cdc25A n'est donc pas dégradée et induit ainsi la progression du cycle cellulaire. Ce mécanisme direct ne peut pas être impliqué dans l'évolution de la lymphoprolifération de lymphocytes B que développe les souris Tg, car les lymphocytes B ne semblent pas exprimer Vpu.

D'autres mécanismes peuvent être évoqués pour rendre compte des lymphoproliférations à lymphocytes B : la surexpression d'IL-6 a été impliquée dans plusieurs pathologies chez des souris transgéniques qui la surexpriment. Parmi ces pathologies, citons par exemple une plasmocytose, une production d'autoanticorps, une dyscrasie polyclonale de plasmocytes (Suematsu, S. *et al.*, 1989). L'IL-6 est normalement produite par plusieurs types cellulaires tels les lymphocytes B, les macrophages, cellules dendritiques et endothéliales, fibroblastes, lymphocytes T activés (Abbas, A. K., *et al.*, 2010b). Le récepteur de l'IL-6 est composé d'une protéine «cytokine-binding» et une sous-unité «signal-transducing», les deux appartenant à la famille du récepteur de cytokines type 1 (Abbas, A. K. *et al.*, 2010b). Dans la voie principale de la signalisation de l'IL-6 est impliquée l'activation de jak1 et STAT3 (Abbas, A. K., *et al.*, 2010b). L'IL-6 a plusieurs fonctions : elle stimule la synthèse de protéines de phase aiguë par les hépatocytes, la production de neutrophiles par la moelle osseuse, la production de lymphocytes B et elle agit comme un facteur de croissance autocrine pour les plasmocytes néoplasiques, et promeut la production de l'IL-17 par les lymphocytes T (Abbas, A. K., *et al.*, 2010b). Plusieurs éléments potentiels de contrôle de la transcription ont été identifiés pour la région promotrice de l'IL-6, tels que les «glucocorticoid-responsive elements», les sites de liaison de l'AP-1, un c-fos «serum-responsive element» (SRE), un cAMP «responsive element», un site de liaison du C/EBP- β , et un site de liaison du NF- κ B et CD40 (Baccam, M. *et al.*, 1999; Isshiki, H. *et al.*, 1990; Ray, A. *et al.*, 1989; Libermann, T. A. *et al.*, 1990; Baccam, M. *et al.*, 2003). Mais ni ces éléments ni un site d'activation pouvant interagir avec Vpu n'a été démontré pour rendre compte de l'augmentation de l'expression de l'IL-6. Cependant dans notre modèle de souris Tg, l'expression de l'IL-6 et de Vpu observée dans les mêmes cellules (cellules réticulées), la similitude des lésions spléniques et rénales associées à la surproduction de IL-6 dans le modèle de souris à gène C/EBP- β inactivé et celles de la maladie de Castleman associée à la surproduction de IL-6 dans les cellules dendritiques amènent à penser que Vpu pourrait contribuer à augmenter IL-6 par une voie semblable à celle décrite pour les souris C/EBP- β négative. Dans les souris transgéniques Vpu, cette dernière pourrait séquestrer ou contribuer à dégrader un ou des facteurs impliqués

dans la régulation de IL-6 Il s'agirait ici d'un autre effet de Vpu qui reste à explorer et démontrer.

Ceci suggère aussi que la prolifération de lymphocytes B est induite de façon paracrine par l'IL-6 exprimée par les cellules réticulées, contrairement à la prolifération des plasmocytes néoplasiques qui, elle, est induite de façon autocrine par IL-6 produite par les lymphocytes B (Abbas, A. K. *et al.*, 2010b). Cette induction paracrine de la prolifération cellulaire pourrait expliquer l'évolution lente des lymphoproliférations.

Chez l'humain, l'IL-6 a aussi été détectée dans les cellules dendritiques des centres germinatifs dans la maladie de Castleman localisée de type plasmocytaire (Leger-Ravet, M. B. *et al.*, 1991; Larroche, C. *et al.*, 1996). Bien qu'il existe des similitudes entre les altérations histopathologiques et d'expression d'IL-6 du modèle Tg-vpu et de la maladie de Castleman associée au VIH-1, la source d'IL-6 est différente. L'herpesvirus-8, également impliqué dans cette maladie, a un gène qui code pour la protéine vIL-6 homologue à l'IL-6 cellulaire et c'est la vIL-6 qui serait à l'origine de la prolifération de lymphocytes B (Nicholas, J. *et al.*, 1997; Paulose-Murphy, M. *et al.*, 2001; Mylona, E. E. *et al.*, 2008).

Une hyperplasie lymphoïde peut être initiée par stimulation antigénique physiologique qui, elle est associée à des événements oncogénétiques additionnels tels que des translocations chromosomiques, peut mener à l'activation constitutive des voies de signalisation. Ces événements se produisent au cours de la progression de la maladie qui entraîne au bout du compte une lymphoprolifération indépendante de l'antigène. Pour plusieurs sous-types de lymphomes, l'initiation de la maladie semble être une conséquence de l'infection chronique et/ou de l'inflammation chronique (Kahl, B., Yang, D., 2008). Malgré une origine commune, il existe des caractéristiques cliniques et moléculaires distinctes des lymphomes provenant dans différents sites anatomiques (Kahl, B., Yang, D., 2008).

Dans le modèle Tg-vpu, les animaux ont été élevés dans un environnement très contrôlé (eau, nourriture, litière et cages stérilisés et l'air filtré), manipulé dans une

hotte bactériologique avec des gants et de masque, et libre de pathogène spécifique. Ils ont été régulièrement testés par sérologie pour des agents pathogènes. Dans ces conditions, il est possible d'éliminer des facteurs initiaux d'une maladie néoplasique comme l'infection et l'inflammation chroniques. Aucune souris Ntg utilisée dans le groupe contrôle n'a développé de lymphomes. Le seul facteur prédisposant chez les souris Tg est l'expression constitutive de la protéine Vpu. On a décrit précédemment un mécanisme possible où Vpu pourrait participer au développement des lymphoproliférations à cellules B par l'expression locale de l'IL-6 par des cellules réticulées situées dans les follicules lymphoïdes spléniques. Ce facteur évidemment ne peut être qu'initial. D'autres facteurs additionnels doivent intervenir pour le maintien, le développement et la progression du processus néoplasique. Chez les humains infectés par le VIH, les lymphomes à cellules B présentent fréquemment des réarrangements de bcl-6 (14%), de c-myc (79%), de p53 (37%) et de ras (15%) (Knowles, D. M., Dalla-Favera, R., 1994; Knowles, D. M., 1997). Dans le modèle de souris Tg-vpu, les facteurs oncogéniques possibles n'ont pas été déterminés.

La dégradation du complexe MHC-1 induite par Vpu par les voies déjà mentionnées peut aussi participer dans le développement de la lymphoprolifération et la perpétuation des cellules tumorales chez les humains et chez les souris Tg-vpu. Étant donné qu'une des premières stratégies mise en œuvre par le système immunitaire pour contrôler la prolifération des cellules tumorales fait intervenir les lymphocytes T CD8 qui éliminent ces cellules en reconnaissant des antigènes modifiés présentés avec le MHC-1. Or si les cellules tumorales n'expriment pas le complexe MHC-1, les lymphocytes T CD8 ne les tuent pas et le système immunitaire devra utiliser d'autres stratégies pour éliminer les cellules tumorales (Abbas, A. K. *et al.*, 2010f).

C) Atteinte rénale

Les souris âgées peuvent développer spontanément un épaississement de la membrane basale glomérulaire et une expansion de la matrice mésangiale. Ces

lésions peuvent être causées par l'accumulation d'amyloïde ou par la sclérose glomérulaire. Certaines lignées de souris comme la BALB/c et la CAF1 peuvent développer ces altérations rénales dès l'âge de trois mois (Dunn, T. B., 1967).

Une autre cause d'expansion de la substance mésangiale comprend le dépôt de complexes immuns sur, dans ou sous la membrane basale. Le dépôt des Igs dans les glomérules peut stimuler les leucocytes et les cellules dendritiques à produire des protéines d'inflammation (IL-6 et PDGF) et ainsi, contribuer aux altérations glomérulaires telles que la prolifération de cellules mésangiales et l'augmentation de la production de la matrice mésangiale (Horii, Y. *et al.*, 1989; Bruijn, J. A. *et al.*, 1998; Alpers, C. E., 2005; Newman, S. J. *et al.*, 2007).

Horii et collaborateurs (1989) ont démontré, *in vitro*, que l'IL-6 induit la prolifération de cellules mésangiales chez les rats. Ils ont aussi démontré que les effets prolifératifs de cette cytokine sont plus puissants que les effets du PDGF et de l'IL-1 sur la prolifération de cellules mésangiales de rats. De plus, ils ont démontré que chez les patients atteints d'une glomérulonéphrite mésangioproliférative, il y avait une association entre la sévérité de la maladie et la quantité d'IL-6 sécrétée dans l'urine. De plus, le modèle de souris de la maladie de Castleman-like (C/EBP- β inactivé) développe une pathologie rénale semblable à notre modèle Tg-vpu, caractérisée par une hypertrophie glomérulaire avec une expansion de la matrice mésangiale et une hyperplasie de cellules mésangiales. Tout ceci est associé à une surproduction d'IL-6 dans la moelle osseuse (Brandt, S. J. *et al.*, 1990).

La cause des altérations rénales chez les patients HIV est encore controversée. D'une part, les cellules rénales épithéliales pourraient être infectées par le VIH (Kimmel, P. L. *et al.*, 1993; Bruggeman, L. A. *et al.*, 1997); de l'autre, il a été démontré avec un modèle transgénique que l'expression du transgène VIH-1, sans les gènes gag et pol, dans les reins, produit des lésions semblables à l'HIVAN (Bruggeman, L. A. *et al.*, 1997). Enfin, une grande quantité et variété de cytokines (IL-1, IL-6, IFN- γ , bFGF, TGF- β , TNF- α et TNF- β) libérées par les cellules infectées par le VIH aurait une implication dans la pathologie rénale associée au VIH (Fauci, A. S. *et al.*, 1996; Bruggeman, L. A. *et al.*, 1997).

Étant donné que les souris peuvent développer spontanément des lésions rénales, nous avons déterminé la fréquence des altérations rénales présentes chez nos souris Ntg utilisées comme contrôles pour éviter fausser les résultats. Nos souris Ntg ont développé spontanément un épaissement de la membrane basale glomérulaire et de la matrice mésangiale chez 52% des animaux; par contre chez les souris Tg cette fréquence se situe entre 74% à 86% des animaux. Cette fréquence plus élevée suggère que l'expression de Vpu et d'IL-6 dans les cellules réticulées pourrait en être la cause.

Notre modèle Tg-vpu reproduit une des altérations de l'HIVAN, sans produire les lésions de cellules épithéliales des tubules rénaux, même si les souris expriment le transgène dans les glomérules. Nous avons pu identifier quelques cellules réticulées exprimant Vpu et IL-6 dans les reins, mais l'absence d'altérations dans l'épithélium tubulaire rénal suggère que ces cellules soit n'expriment pas Vpu ou alors elles sont peu réactionnelles à Vpu. L'hypertrophie glomérulaire avec l'hyperplasie des cellules mésangiales, l'épaississement des membranes basales glomérulaires (PAS positives), la présence des Igs (IgA, IgG et IgM) sur la membrane basale glomérulaire observées de façon granulaire à la microscopie fluorescente et électronique (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit), le développement de lymphoproliférations dans les reins et dans plusieurs tissus chez les souris Tg, sont des lésions pathologiques retrouvées dans le modèle de souris avec C/EBP- β inactivé. Ceci suggère que les altérations rénales, chez ces souris, sont associées à une stimulation du système immunitaire non spécifique (polyclonale) reliée à une dérégulation de cytokines telles l'IL-6. Ces observations suggèrent que Vpu pourrait induire une surproduction locale de l'IL-6 par la même voie de stimulation de cette cytokine dans le modèle avec C/EBP- β inactivé.

II) Altérations du leucogramme, de la réponse immune à la Dex, aux LPS et à l'hypersensibilité de type retardée et le rôle de Vpu

A) Leucogrammes chez les souris Tg et Ntg avant tout traitement

Les leucogrammes ont démontré clairement que les souris Tg (RV-105 et RV-106) développent une diminution de leucocytes, de lymphocytes et une inversion du ratio lymphocytes/neutrophiles par rapport aux souris Ntg.

La diminution de lymphocytes circulants chez les souris intactes Tg des lignées RV-105 et RV-106, suggère que ces souris développent une lymphopénie, probablement chronique, qui se manifeste dans le sang des jeunes animaux. Fait à noter, les résultats d'histopathologie de la rate, chez les souris de 3 mois, ne démontrent pas d'anomalies lymphoïdes (déplétion ou hyperplasie). D'autres résultats générés dans notre laboratoire (Lemaire, C. *et al.*, manuscrit) ont démontré, par cytofluorométrie des cellules de la rate, que des souris présentaient un nombre de lymphocytes B et T semblable aux souris Ntg du même âge. Avec le vieillissement, des différences deviennent évidentes surtout quand les animaux développent l'hyperplasie et le lymphome de la rate.

Ces résultats suggèrent qu'il y a une population de lymphocytes apparemment normale dans les organes lymphoïdes, mais avec une lymphopénie dans le sang. Ces deux observations suggèrent que la lymphopénie est due à une destruction de lymphocytes dans le sang, plutôt qu'à un manque de production ou à une destruction dans les organes lymphoïdes. Cette destruction lymphocytaire débute avant que les lymphoproliférations se manifestent, comme dans les cas du Sida avancé chez les patients. La lymphocytopenie peut être due au fait que ces cellules ont une période de vie plus courte que celle de souris Ntg. Cette période de vie raccourcie peut être due soit à une destruction accélérée ou par l'induction de l'apoptose durant la maturation cellulaire. Il est bien connu que, chez les patients infectés du VIH-1, les lymphocytes ont une période de vie plus courte, c'est-à-dire entre 1 et 2 jours (Perelson, A. S. *et al.*, 1996; Casella, C. R. *et al.*, 1999). L'infection par le virus peut causer directement

la destruction des cellules infectées. Le système immunitaire peut aussi détruire les cellules infectées et éliminer des cellules non désirées par la voie de Fas/Fas ligand (Nagata, S. *et al.*, 1995; Casella, C. R. *et al.*, 1999). En système in vitro, l'expression de vpu dans les lymphocytes T (Jurkat) peut les rendre plus susceptibles à l'apoptose induite par la voie de Fas. Cette susceptibilité apoptotique a été estimée à 18% de plus par rapport aux cellules contrôles "sans vpu" (Casella, C. R. *et al.*, 1999). Cette même tendance a été observée chez nos souris Tg qui, comparativement aux souris Ntg, présentent une différence dans la diminution du pourcentage de lymphocytes sanguins entre 14 et 25% dans une première étude et 35 et 55% dans une deuxième étude. Le rôle de Vpu dans cette diminution du pourcentage lymphocytaire n'est pas connu. Étant donné que Vpu n'est apparemment exprimée que dans les lymphocytes T CD8, ceci suggère un mécanisme indirect.

Une autre étude a démontré que l'expression de Vpu raccourcit la vie des lymphocytes en activant la voie de caspases (caspase-3) et en inhibant le NFκ-B, qui régule des protéines antiapoptotiques de la famille du Bcl-2 (Bcl-xL et A1/Bfl-1) ou des protéines du complexe du TNFR (TRAF1) (Akari, H. *et al.*, 2001).

Une fonction très controversée de Vpu est sa capacité de former des canaux ioniques dans les membranes cellulaires (Schubert, U. *et al.*, 1998; Casella, C. R. *et al.*, 1999). Cette propriété de Vpu pourrait être un des mécanismes rendant les cellules plus susceptibles à l'apoptose (Casella, C. R. *et al.*, 1999). Ces canaux ioniques membranaires pourraient produire des changements de concentrations ioniques dont une élévation de la concentration de potassium "K" dans les neurones ainsi qu'une diminution de la concentration de K dans les lymphocytes, induisant l'apoptose (Bortner, C. D. *et al.*, 1997; Casella, C. R. *et al.*, 1999).

Une autre fonction bien connue de Vpu est son implication dans la dégradation des protéines, comme CD4 et CMH-1, dans les protéasomes par l'intermédiaire de l'ubiquitine (Willey, R. L. *et al.*, 1992; Kerkau, Th. *et al.*, 1997; Schubert, U. *et al.*, 1998; Casella, C. R. *et al.*, 1999). Lorsque cette voie de dégradation est activée de façon inappropriée, elle induit une augmentation de la dégradation d'autres protéines, dégradation associée à plusieurs conditions pathologiques comme le diabète, la

cachexie associée au cancer et l'atrophie musculaire (Price, S. R. *et al.*, 1996; Barracos, V. E. *et al.*, 1995; Piedimonte, G. *et al.*, 1999). En plus, il a été démontré que la stimulation des lymphocytes sanguins, chez les patients infectés par le VIH, induit une augmentation de l'ubiquitination des protéines qui entraîne une diminution de la période de vie des nouvelles protéines synthétisées (Piedimonte, G. *et al.*, 1999). Cette augmentation de la destruction des protéines entraîne une perte de la coordination de la synthèse d'ADN et de la formation de la machinerie nécessaire pour la division cellulaire (Piedimonte, G. *et al.*, 1997; Piedimonte, G. *et al.*, 1999). Les lymphocytes affectés, qui perdent ce contrôle, sont conduits à l'apoptose durant la phase G1 du cycle cellulaire (Piedimonte, G. *et al.*, 1997; Piedimonte, G. *et al.*, 1999). Nous ne savons pas si ces mécanismes sont impliqués dans la perte lymphocytaire chez les souris Tg, étant donné que l'expression de Vpu semble restreinte aux lymphocytes T CD8. L'absence de détection de Vpu dans d'autres types cellulaires ou tissulaires pourrait être due soit à la non expression ou à un niveau d'expression si bas qu'elle ne peut être détectée.

L'augmentation de neutrophiles circulants chez les souris Tg pourrait être associée à l'activation non spécifique du système immunitaire et à une augmentation possible de l'IL-6, tel qu'observée chez les souris Tg plus âgées. L'IL-6 induit la prolifération et la différenciation des cellules souches granulocytes/macrophages (Suematsu, S. *et al.*, 1989; Han, Z. C. *et al.*, 1992; Han, Z. C. *et al.*, 1994). La neutrophilie et la lymphopénie sanguines expliqueraient donc le renversement de pourcentages lymphocytes/neutrophiles observés chez les souris Tg.

B) Traitement à la dexaméthazone

La comparaison des numérations leucocytaires et lymphocytaires sanguins, entre les souris traitées et non traitées, a démontré une diminution des valeurs leucocytaires et lymphocytaires chez toutes les souris traitées (Ntg et Tg), à l'exception des leucocytes totaux chez les souris RV-105 qui présentent une très légère augmentation

(tableau VII). Cette augmentation est probablement due à l'augmentation du nombre de neutrophiles circulants, induite par la Dex (Goodman, M. H., 1988; Kupps, T. R., 1989), étant donné que le pourcentage de cellules lymphocytaires n'a pas augmenté. Les souris Tg, après le traitement à la Dex, ont développé une diminution de leucocytes et de lymphocytes totaux circulants moins sévère que les souris Ntg traitées dans les mêmes conditions (tableau VII). Ces résultats suggèrent qu'une faible quantité seulement de lymphocytes circulants des souris Tg réagit aux effets apoptotiques de la Dex, mais ces résultats ne sont pas très révélateurs parce qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative. Par contre, les résultats d'histopathologie de la rate et du thymus démontrent le fait contraire : une population plus importante de lymphocytes chez les souris Tg apparaît plus susceptible à l'apoptose induite par la Dex.

Il faut mentionner que les lymphocytes du cortex thymique sont, en majorité, des lymphocytes immatures tandis que ceux dans la médullaire du thymus et dans le sang sont principalement des lymphocytes matures (Abbas, A. K. *et al.*, 2010a). Or, les effets apoptotiques de la Dex se manifestent principalement dans les lymphocytes immatures (Staples, J. E. *et al.*, 1998; Abbas, A. K. *et al.*, 2010a).

La Dex produit principalement l'apoptose des lymphocytes double positifs CD4+/CD8+. Ces cellules sont plus susceptibles que les cellules matures simples positives CD4+ ou CD8+, car au stade de maturation double positif, les lymphocytes CD4+/CD8+ n'expriment pas de Bcl-2, qui protège contre l'apoptose. Par contre, les cellules au stade simple positif CD4+ ou CD8+ expriment Bcl-2 qui les protège des effets apoptotiques induits par la Dex (Staples, J. E. *et al.*, 1998).

La déplétion lymphoïde de la rate et du thymus, plus sévère chez les souris Tg, démontre qu'il y a une susceptibilité augmentée à l'apoptose induite par la Dex, principalement dans la population lymphocytaire immature. Cette déplétion lymphoïde va entraîner des conséquences dans le sang plus tardivement, car une très grande quantité de lymphocytes de la rate et du thymus sont détruits et ne peuvent plus remplacer les lymphocytes circulants, entraînant un retard dans le repeuplement lymphocytaire du sang et une lymphopénie plus sévère et prolongée.

Cette augmentation de la susceptibilité à la mort lymphocytaire, chez les souris Tg, peut être associée au fait que les glucocorticoïdes peuvent induire l'apoptose des lymphocytes par les systèmes protéolytiques de protéasomes (Grimm, L. M. *et al.*, 1996). Il est possible aussi que la Dex active le promoteur RSV du transgène RV et induise l'expression de Vpu chez les souris Tg. Vpu active le système de protéolyse par la voie de l'ubiquitine qui va s'ajouter aux effets apoptotiques de la Dex et augmenter encore plus la dégradation des protéines dans les protéasomes. Cette dégradation augmentée pourrait détruire des protéines essentielles à la survie des lymphocytes.

C) Traitement avec les LPS

a) Valeurs des leucocytes sanguins chez les souris Tg RV-105 et RV-106 et Ntg après le traitement avec LPS

Il est connu que les LPS peuvent induire une lymphopénie et une neutropénie dans les premières heures après une injection chez des souris normales (Norimatsu, M. *et al.*, 1995; Castro, A. *et al.*, 1998; Lowell, C. A. *et al.*, 1998). Les lymphocytes et les neutrophiles composent majoritairement la population leucocytaire sanguine (Canadian Council on Animal Care, 1993). Une diminution dans une des deux populations leucocytaires entraîne alors une leucopénie.

En général, les différences entre les résultats obtenus dans les décomptes leucocytaires (leucocytes totaux, lymphocytes totaux et pourcentages de lymphocytes) aux temps choisis chez les souris Tg et Ntg ne sont pas statistiquement significatives, mais quelques résultats observés surtout chez les souris Tg-RV-106 démontrent une différence statistique qui est associée à la dynamique de sous populations leucocytaires de lymphocytes et de neutrophiles.

Les leucopénies observées dans les premières quarante-huit heures chez les souris traitées, Tg RV-105, Tg RV-106 et Ntg, suggèrent qu'il y a eu une diminution de lymphocytes et de neutrophiles. La diminution de neutrophiles (neutropénie) est probablement causée par une redistribution des neutrophiles dans les tissus (Movat, H. Z. *et al.*, 1987; Lowell, C. A. *et al.*, 1998) ou par une séquestration vasculaire due à l'expression des molécules d'adhérence (L-sélectine et de l'intégrine CD11b/CD18) qui augmente l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales (Frevet, C. W. *et al.*, 1994; Wagner, J. G. *et al.*, 1999). La lymphopénie observée, chez tous les animaux peut être causée par la production d'une grande quantité de corticostéroïdes endogènes durant l'endotoxémie. Ces corticostéroïdes peuvent, à leur tour, induire une apoptose massive des lymphocytes (Movat, H. Z. *et al.*, 1987; Lowell, C. A. *et al.*, 1998). Dans les leucopénies et les lymphopénies observées chez les souris Tg et Ntg, dans les premières quarante-huit heures, il est difficile d'établir le rôle de Vpu, étant donné qu'il n'y pas de différences statistiques significatives entre les groupes de souris.

À soixante-douze heures, nous avons remarqué que les souris Tg RV-105 et RV-106 ont développé une leucocytose composée principalement de neutrophiles qui, par les résultats du pourcentage de lymphocytes, du nombre total de lymphocytes et les observations histopathologiques de la rate confirment que l'augmentation marquée de la population leucocytaire est due aux neutrophiles. Durant l'endotoxémie il y a eu une production de plusieurs médiateurs (TNF- α , G-CSF, IL-1, PAF et catécholamines) pouvant induire la production de neutrophiles dans la moelle osseuse et entraîner une neutrophilie (Bozza, P. T. *et al.*, 1994; Altenburg, S. P. *et al.*, 1997). Cette neutrophilie est composée d'une population mixte de neutrophiles jeunes et matures. Les jeunes neutrophiles, ayant moins de facilité à adhérer aux vaisseaux sanguins et à infiltrer les tissus, sont en circulation et contribuent fortement à la neutrophilie (Lawrence, E. *et al.*, 1996; Wagner, J. G. *et al.*, 1999).

La neutrophilie développée chez les souris Tg pourrait s'expliquer par le fait que ces souris ont déjà une prédisposition à développer cette altération. En effet, avant tout traitement, ces animaux démontraient déjà une neutrophilie circulatoire par rapport

aux souris contrôles Ntg (tableau VIb). Cette neutrophilie pourrait être associée à une production constante de l'IL-6 qui en réagissant avec d'autres CSFs (Colony stimulating factors), induit la prolifération des cellules progénitrices hématopoïétiques et mégacaryocytiques (Coze, C. M., 1994).

b) Examen histopathologique de la rate après traitement aux LPS

L'histopathologie de la rate chez les souris Tg RV-105 et RV-106 démontre deux observations principales : 1) les souris Tg développent une déplétion marquée surtout de la pulpe blanche après les traitements aux LPS, qui n'est pas observée chez les souris NTg. 2) chez les souris Tg, le repeuplement lymphocytaire de la pulpe blanche se déroule lentement, alors que les souris Ntg développent une hyperplasie marquée assez rapide.

Cette déplétion lymphoïde de la pulpe blanche chez les souris Tg suggère qu'elle pourrait être associée à l'expression de Vpu dans tous les lymphocytes B et T de la rate et que le lent repeuplement lymphocytaire de la rate chez les souris Tg pourrait être simplement une conséquence de la forte déplétion lymphoïde initiale induite par les LPS. Les LPS sont des activateurs très puissants de l'inflammation pour les macrophages (Dinarello, C. A., 1996; Zhang, H. *et al.*, 1997; Paludan, S. R., 2000) et sont capables d'induire l'apoptose des lymphocytes T circulants et des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ de la rate, des ganglions lymphoïdes et du cortex thymique (Norimatsu, M. *et al.*, 1995; Castro, A. *et al.*, 1998). Une fois que les macrophages sont activés, ils produisent quelques cytokines comme TNF- α , IFN- γ , IL-1 et IL-6 (Dinarello, C. A., 1996; Zhang, H. *et al.*, 1997; Paludan, S. R., 2000). Le TNF- α par la voie de FADD entraîne l'apoptose avec l'activation de la caspase-8 (Darnay, B. G., Aggarwal, B. B. 1997; Paludan, S. R., 2000). La production d'autres cytokines parmi lesquelles l'IL-6 pourrait stimuler la prolifération de lymphocytes B et commencer le repeuplement de la rate, parce que leurs effets persistent plus longtemps dans le sang (Chelvarajan, R. L. *et al.*, 2006; Slofstra, S. H. *et al.*, 2006). Les LPS induisent les cellules dendritiques à devenir matures et à produire de grandes quantités de

cytokines telles que l'IL-6, l'IL-12 p40, l'IL12 p70 et TNF- α (Nakahara, T. *et al.*, 2004). Dans notre modèle de souris Tg, les cellules dendritiques et les lymphocytes T-CD8 expriment Vpu. Cependant, le mécanisme par lequel ces cellules pourraient être associées à la déplétion lymphoïde induite par les LPS reste indéterminé. Une autre possibilité à explorer pour expliquer cette déplétion lymphoïde serait de vérifier si les traitements aux LPS pourraient induire l'expression de Vpu dans d'autres cellules comme les lymphocytes B, étant donné que les LPS sont capables d'activer plusieurs facteurs de transcription et pourraient induire l'expression de Vpu dans les lymphocytes B (Willey, R. L. *et al.*, 1992; Kerkau, Th. *et al.*, 1997; Schubert, U. *et al.*, 1998; Casella, C. R. *et al.*, 1999; Akari, H., *et al.*, 2001).

c) Examen histopathologique du thymus après traitement aux LPS

À trente et jusqu'à quarante-huit heures, la quantité de cellules apoptotiques est plus élevée chez les souris Tg que chez les souris Ntg. Il est connu que les LPS peuvent induire une apoptose très sévère des lymphocytes du cortex thymique et moins sévère dans la rate et dans les structures lymphatiques (Norimatzu, M. *et al.*, 1995). Ces mêmes auteurs ont démontré que l'apoptose induite par les LPS dans les tissus lymphoïdes est due à une augmentation de la production endogène de cortisone. Les résultats histopathologiques du thymus, après les traitements aux LPS, démontrent une destruction cellulaire plus marquée chez les souris Tg. Ces résultats suggèrent que chez les souris Tg, les lymphocytes, principalement du cortex thymique (lymphocytes immatures double positifs CD4+/CD8+), seraient les plus susceptibles de développer l'apoptose (Staples, J. E. *et al.*, 1998; Abbas, A. K. *et al.*, 2010a). Aussi, il est possible qu'une augmentation de la transcription de Vpu induite par les LPS puisse augmenter l'activité apoptotique dans les lymphocytes exprimant Vpu (Willey, R. L. *et al.*, 1992; Kerkau, Th. *et al.*, 1997; Schubert, U. *et al.*, 1998; Casella, C. R. *et al.*, 1999; Akari, H., *et al.*, 2001).

d) Immunohistochimie de la rate chez les souris traitées aux LPS après soixante-douze heures

La diminution dans la quantité de l'immunomarquage pour le B220, CD4 et CD8 observée chez les souris Tg et Ntg traitées, par rapport aux tissus contrôles non traités, suggère une diminution de la population cellulaire et/ou une diminution de l'expression de ces protéines de surface. Il a été démontré par cytofluorométrie de la rate que, après un traitement aux LPS, les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et les lymphocytes B IgM⁺ de la rate et des structures lymphoïdes diminuent entre 24 et 36 heures après le traitement aux LPS, et cette diminution du nombre de ces cellules est due à l'apoptose (Castro, A. *et al.*, 1998).

De plus, les analyses histopathologiques de la rate démontrent qu'après soixante-douze heures, la majorité des souris Tg et la totalité des souris Ntg ont déjà repeuplé en grande partie la rate et ont en plus développé une hyperplasie lymphoïde folliculaire à cellules du type centroblastique et que les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et les lymphocytes B IgM⁺ de la rate et des structures lymphoïdes se transforment en cellules blastiques après le traitement avec LPS. Ces changements morphologiques de cellules pourraient modifier l'expression de quelques protéines de surface (Castro, A. *et al.*, 1998).

L'anticorps Mac-3/84 identifie principalement les macrophages activés (PharMingen International). La différence de l'immunomarquage entre les souris Tg et Ntg sans traitement confirme que chez les souris Tg, il y a une activation du système immunitaire, cette activation pourrait être associée à la production d'IL-6 observée exclusivement dans la rate de souris Tg. Après les traitements aux LPS, il y a eu une augmentation de cellules marquées chez les deux groupes de souris Tg et Ntg. L'augmentation de cellules marquées avec le Mac-3/84 est tout à fait normale, due à l'activation des macrophages par les LPS (Castro, A. *et al.*, 1998).

d) Réaction cutanée de Schwartzman et histopathologie de la peau à soixante-douze heures post-traitement avec LPS

Nous avons observé à l'histopathologie de la peau, que le nombre de cellules inflammatoires (neutrophiles et macrophages) est proportionnel à la sévérité de la réaction de Schwartzman et que la fréquence et la sévérité de cette réaction sont plus marquées chez les souris Tg. On observe que les souris Tg développent une neutrophilie sanguine marquée, soixante-douze heures après le traitement aux LPS, qui pourrait être impliquée dans la fréquence et la sévérité de la réaction de Schwartzman. Ces nombreux neutrophiles sont stimulés par des cytokines induites par les LPS, comme le TNF- α et l'IL-1 et peuvent induire une inflammation plus marquée. En effet, ces deux cytokines activent les neutrophiles à exprimer des molécules d'adhésion qui leur permettent d'adhérer aux cellules endothéliales, de produire et de libérer des ROS (reactive oxygen species) comme l'oxyde nitrique (NO) et le peroxyde d'hydrogène et, en plus, de libérer les enzymes (protéases) qui causent les lésions vasculaires et qui entraînent les lésions tissulaires (Cerasoli, F. *et al.*, 1990; Wagner, J. G. *et al.*, 1999). Ces radicaux (ROS) sont impliqués directement dans les dommages tissulaires induits par les LPS (Cerasoli, F. *et al.*, 1990; Wagner, J. G. *et al.*, 1999). En plus, la libération de peroxyde d'hydrogène par les neutrophiles stimule les macrophages et les cellules dendritiques à produire encore plus de TNF- α (Verhasselt, V., Vildé, J. L., 1991; Sredni-Kenigsbuch, D. *et al.*, 2000). Le TNF- α peut aussi induire des modifications des cellules endothéliales, entraînant une coagulation intravasculaire locale qui, à son tour, produira des lésions tissulaires nécroticohémorragiques (Piguet, P-F. *et al.*, 1993; Senaldi, G. *et al.*, 1998). Dans notre modèle de souris Tg-vpu, avant tout traitement, les souris montrent une lymphopénie avec une neutrophilie, une expression augmentée d'IL-6 dans la rate et une augmentation du nombre de macrophages activés. Ces observations suggèrent que le système immunitaire est déjà activé. Aussi après les traitements avec LPS il est attendu d'avoir une réaction plus forte que chez les souris Ntg.

D) L'induction de l'hypersensibilité de type retardée avec l'albumine bovine sérique (ABS)

La réaction d'hypersensibilité retardée expérimentale induite avec un antigène soluble a servi à évaluer la fonction des cellules T CD4 Th1. Quand la fonction de ces cellules est affaiblie ou anormale, il y a des conséquences dans la réaction d'hypersensibilité retardée (Kaufmann, S. H. E., 1999; Abbas, A. K. *et al.*, 2010c). Les résultats de cette expérience démontrent que les souris Tg conservent apparemment la fonction normale des lymphocytes T CD4. Par contre, cette réaction se développe plus lentement et plus faiblement que chez les souris contrôles. Il est possible que la lymphopénie sanguine que développent les souris Tg, avant tout traitement, puisse être impliquée dans le retard et la faiblesse de la réaction d'hypersensibilité retardée. Chez les patients infectés par le VIH, les réactions d'hypersensibilité retardées sont plus faibles ou absentes, surtout quand le nombre de lymphocytes CD4 est inférieur à 200/mm³ (Recommendations of the Advisory Commitee for elimination of tuberculosis, MMWR, 1990; Flament-Saillour, M. *et al.*, 1997). Autre cause d'anergie ou de faibles réponses aux réactions à la tuberculine chez les Sidéens est la dérégulation de cytokines comme l'IL-2 (Fauci, A. S., 1993).

Dans notre modèle Tg, cette cytokine n'a pas été évaluée. Les observations histopathologiques de la rate, chez les souris Tg, démontrent une activation du système immunitaire par l'antigène "ABS". Cette activation n'a induit qu'une faible réponse proliférative des cellules B des follicules et des centres germinatifs et il en résulte la présence de petits follicules contrairement aux souris contrôles qui développent des centres germinatifs et des follicules plus nombreux et plus volumineux. En plus de cette faible réponse folliculaire, il y a une déplétion lymphoïde de la rate avec présence d'un grand nombre des figures apoptotiques dans les follicules lymphoïdes spléniques et dans le thymus. Ces résultats histopathologiques de tissus lymphoïdes mettent en évidence deux altérations importantes : i) une faible réponse à l'ABS qu'induit une faible stimulation de la prolifération et de la différenciation de cellules B et ii) une déplétion lymphoïde avec

grand nombre de cellules apoptotiques principalement dans la rate. La faible réponse à l'antigène (ABS) peut être associée à la lymphopénie que les souris Tg développent avant tout traitement et qu'expliquerait le retard et la faiblesse de la réaction d'hypersensibilité retardée. Cela affecte aussi l'intensité de la stimulation de prolifération et différenciation lymphoïde observée surtout dans la rate.

Une faible stimulation des cellules B à proliférer et à se différencier peut entraver la formation des centres germinatifs et de la zone marginale, étant donné que la formation des centres germinatifs est aussi dépendante des cellules T, probablement par l'intermédiaire de l'interaction gp39-CD40, et que les individus sans cellules T ne développent pas de centres germinatifs. De plus, aucune cytokine n'a été reconnue comme étant essentielle à la formation des centres germinatifs (Abbas, A. K. *et al.*, 2010d). Cela peut expliquer la présence des petits follicules avec des petits centres germinatifs observés chez les souris Tg.

La déplétion lymphoïde dans les tissus lymphoïdes peut être associée à la perte de lymphocytes constatée par la présence de figures apoptotiques dans les follicules. Cette mort cellulaire pourrait être une conséquence de l'activation du système immunitaire entraînant la production de facteurs de croissance et de différenciation cellulaire qui pourraient induire l'expression de Vpu dans les lymphocytes B et T et les rendre susceptibles à l'apoptose (Willey, R. L. *et al.*, 1992; Kerkau, Th. *et al.*, 1997; Schubert, U. *et al.*, 1998; Casella, C. R. *et al.*, 1999; Akari, H., *et al.*, 2001). Une autre hypothèse pourrait être la perturbation du mécanisme de maturation de l'affinité qui est réalisée par les cellules dendritiques folliculaires en sélectionnant ou éliminant les lymphocytes B. Les cellules dendritiques folliculaires sélectionnent les cellules B qui présentent des immunoglobulines membranaires de haute affinité avec l'antigène, assurant la survie de ces cellules B. Lorsque les cellules B, après mutation somatique, ne reconnaissent plus l'antigène, elles meurent par apoptose et sont phagocytées par les macrophages des follicules. Ce mécanisme a lieu dans les centres germinatifs où les cellules B se divisent rapidement (Abbas, A. K. *et al.*, 2010d). L'expression de Vpu dans les cellules dendritiques pourrait être la cause de ce dérangement étant donné que Vpu peut induire la dégradation de MHC-1 dans les

cellules dendritiques folliculaires. Ces cellules n'expriment pas de MHC-II, alors une diminution d'expression de MHC-1 pourrait entraîner une diminution de présentation de l'antigène et lorsque les lymphocytes B ne reconnaissent pas les antigènes présentés par la cellule dendritique folliculaire ils meurent par apoptose (Abbas, A. K. *et al.*, 2010d).

E) Le fonctionnement du système immunitaire de souris Tg-vpu

De l'ensemble des résultats et constatations sur le fonctionnement du système immunitaire chez les souris Tg, nous avons quatre observations importantes sur le comportement immunologique des souris Tg-vpu. 1). Une leucopénie et lymphopénie (un nombre diminué de leucocytes et de lymphocytes dans le sang) chez les souris Tg avant tout traitement. 2). Une déplétion lymphoïde splénique et thymique très sévère causée par les traitements avec la Dex et aux LPS. 3). Une réponse exagérée de la réaction de Schwartzman et 4). Une faible et lente réaction d'hypersensibilité retardée.

a) Les leucogrammes de souris Tg-vpu avant tout traitement présentent un très faible nombre de leucocytes et de lymphocytes, avec un pourcentage de lymphocytes inversé par les neutrophiles par rapport aux souris Ntg. Ces observations nous amènent à considérer au moins deux possibilités : i) il n'y a pas une production adéquate de lymphocytes par la moelle osseuse. ii) les lymphocytes circulants ont une durée de vie raccourcie. La première possibilité ne correspond pas avec les résultats histopathologiques de la rate et du thymus où il y a une population lymphocytaire normale qui pourrait être moins nombreuse dans le cas d'une faible production. Dans la deuxième possibilité, les lymphocytes circulants pourraient avoir une période de vie plus courte, ce qui expliquerait la leucopénie et la lymphopénie observées. Cette diminution de lymphocytes matures circulants pourrait entraîner une demande de

lymphocytes dans les organes lymphoïdes. Cette demande accrue de lymphocytes pourrait induire une hyperplasie lymphoïde dans les organes lymphoïdes. En plus, la production d'IL-6 dans les follicules de la rate chez les souris Tg pourrait amplifier ce processus de production et de différenciation de lymphocytes, entraînant l'hyperplasie lymphoïde et la neutrophilie observées.

b). Chez les souris Tg, les lymphocytes B de la rate et les lymphocytes T du cortex et de la médullaire du thymus ont été plus sévèrement affectés que ceux de souris Ntg après les traitements avec la Dex et les LPS.

La différence dans les déplétions lymphoïdes de ces deux organes entre les souris Tg-vpu et Ntg, pourrait être expliquée par : i) la possibilité que chez les souris Tg-vpu, la population lymphocytaire soit constituée majoritairement par une sous-population de lymphocytes immatures. On sait que la dexaméthasone et les LPS ont des effets apoptotiques très forts sur les lymphocytes T et B immatures (Staples, J. E. *et al.*, 1998; Norman, J. *et al.*, 2003; Abbas, A. K. *et al.*, 2010a). Bien que cette hypothèse pourrait expliquer nos résultats, on ne peut pas affirmer que ce sont ces événements qui se produisent réellement, car on ne connaît pas les sous-populations lymphocytaires immatures chez les souris Tg-vpu. ii) l'autre possibilité est que les lymphocytes T et B soient plus susceptibles à l'apoptose par l'expression de Vpu. On avait déjà décrit que l'expression de vpu dans les lymphocytes T les rend plus susceptibles à l'apoptose, en activant plusieurs voies : Fas, des caspases (caspase-3) et en inhibant le NF κ -B, qui régule des protéines antiapoptotiques de la famille du Bcl-2 (Bcl-xL et A1/Bfl-1) ou des protéines du complexe du TNFR (TRAF1) (Casella, C. R. *et al.*, 1999; Akari, H. *et al.*, 2001). Les lymphocytes B sont aussi diminués par un taux élevé d'apoptose spontanée avec une expression anormal de Fas chez les patients infectés par le VIH-1 (Titanji, K. *et al.*, 2005). Dans le modèle de souris Tg-vpu, les seules cellules du système immunitaire qui apparemment expriment Vpu sont les lymphocytes T CD8 et les cellules dendritiques. Les lymphocytes B et CD4 ne semblent pas l'exprimer (Lemaire, Ch. *et al.*, manuscrit). Une hypothèse qui pourrait expliquer aussi l'apoptose de ces cellules est que cette dernière serait due au fait que les LPS peuvent activer ou réprimer plusieurs gènes et facteurs de

transcription et induire l'expression de Vpu, entraînant l'apoptose par les mécanismes précédemment décrits (Willey, R. L. *et al.*, 1992; Kerkau, Th. *et al.*, 1997; Schubert, U. *et al.*, 1998; Casella, C. R. *et al.*, 1999; Akari, H., *et al.*, 2001). La recherche de Vpu sur des cellules de souris Tg traitées aux LPS pourrait aider à répondre à cette question, mais jusqu'à maintenant les mécanismes par lesquels l'expression de Vpu dans ces cellules et dans plusieurs tissus de souris Tg induisent cette susceptibilité apoptotique des lymphocytes T et B ne sont pas connus.

c). Les souris Tg développent une réaction de Schwartzman plus sévère, avec plus de neutrophiles et de macrophages. Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que les souris Tg-vpu avant tout traitement, montrent une lymphopénie avec une neutrophilie, une expression augmentée d'IL-6 dans la rate et un nombre plus grand de macrophages activés dans la rate tels qu'observés par immunohistochimie. Ces observations démontrent que le système immunitaire était déjà activé, surtout les macrophages qui sont les médiateurs principaux dans cette réaction. Après les traitements avec LPS cette réaction est devenue plus sévère chez les souris Tg comparativement aux souris Ntg.

d). Les résultats obtenus avec l'induction de la réaction d'hypersensibilité retardée ont démontré également qu'avec une stimulation immunologique les organes lymphoïdes développent une déplétion lymphoïde avec apoptose. Elle pourrait être associée à l'expression de Vpu dans les cellules dendritiques par les mécanismes déjà décrits (Abbas, A. K. *et al.*, 2010d). La faible réponse à l'antigène et la faible stimulation de la prolifération et de la différenciation de cellules B pourraient être associées à la lymphopénie circulante initiale chez les souris avant tout traitement. Cette déplétion lymphoïde donne comme résultat une réaction d'hypersensibilité retardée plus faible que celle de la souris Ntg. Autre cause possible de cette faible réaction est une dérégulation de l'IL-2, mais cela n'a pas été évaluée.

V. Conclusions

Nous avons développé et caractérisé les souris transgéniques RSV/vpu du point de vue clinique et histopathologique et nous avons aussi tenté d'évaluer leur état immunofonctionnel. Ces souris développent spontanément, avec le temps, une hyperplasie lymphoïde pansystémique, une splénomégalie avec une hyperplasie lymphoïde folliculaire évoluant en lésions pré malignes et malignes (lymphomes folliculaires) qui présentent certaines similarités avec la maladie de Castleman et une glomérulonéphrite mésangioproliférative des reins qui rappelle certaines altérations de l'HIVAN chez les patients infectés par le VIH. Il est intéressant de rappeler ici que ces atteintes développées par ces souris évoquent la lymphoprolifération et les lymphomes rapportés chez environ 15 % des patients sidatiques. En plus, ces souris développent une lymphopénie et une neutrophilie circulante.

L'ensemble de ces altérations suggère que les souris transgéniques/vpu développent une activation chronique et non spécifique du système immunitaire. Une hyperplasie du réseau de cellules metallophiliques (dendritiques/macrophagiques) avec une dérégulation de l'IL-6 pourraient être impliquées dans cette activation immunitaire. La dérégulation de IL-6 pourrait impliquer un mécanisme de séquestration ou de dégradation d'un ou de facteurs associés à la régulation de IL-6. Ce serait là une nouvelle fonction de Vpu qui reste à démontrer et explorer.

Les évaluations du fonctionnement du système immunitaire de la rate et du thymus ont démontré que les effets apoptotiques, suite aux injections à la dexaméthasone et aux lipopolysaccharides, sont plus marqués chez les souris transgéniques, entraînant une déplétion lymphoïde et un lent repeuplement des cellules lymphoïdes des follicules et de la pulpe rouge splénique. Dans la pulpe rouge, ce repeuplement se fait principalement par des neutrophiles. Là aussi ce modèle illustre une des fonctions associées à Vpu, soit celle d'augmenter l'activité apoptotique dans les organes lymphoïdes. Comment Vpu induit cette sensibilité accrue à l'apoptose en absence de tout processus infectieux est un aspect qui mérite d'être plus investigué et qui aidera à mieux comprendre les fonctions de Vpu et la biologie du virus HIV-1.

L'évaluation de l'état immunofonctionnel suite aux traitements par la dexaméthasone ou le LPS a montré des différences marquées avec les contrôles non transgéniques. L'ensemble des résultats obtenus met en évidence chez les souris TG quelques altérations : une susceptibilité augmentée des lymphocytes des tissus lymphoïdes aux effets apoptotiques de la dexaméthasone et des lipopolysaccharides, une anomalie et un retard dans le repeuplement par les cellules lymphoïdes de la rate et du thymus, ainsi qu'une réaction inflammatoire (Schwartzman) exacerbée. En plus, ces souris présentent des anomalies dans la réaction d'hypersensibilité retardée induite expérimentalement. Ceci laisse suggérer que la présence de Vpu dans les souris transgéniques a altéré leur fonction immune. Il serait donc intéressant de déterminer les mécanismes impliqués qui pourraient expliquer cette différence enregistrée dans la réponse immune lors des traitements par la dexaméthasone, les LPS et aussi dans la réaction de l'hypersensibilité retardée.

Ce modèle transgénique porteur d'un gène unique du VIH-1 (vpu) reproduit plusieurs effets pathologiques associés au syndrome du SIDA. La disponibilité de plusieurs types cellulaires et tissulaires porteurs de Vpu pourra aider à mieux cerner les propriétés de cette protéine aux fonctions déjà reconnues multiples qui impliquent des interactions avec des facteurs cellulaires centraux pour la dégradation ou la séquestration protéinique. Ce modèle révèle que Vpu pourrait aussi directement ou indirectement influencer la régulation de certaines cytokines telle que IL-6 qui dans ce modèle semble être centrale dans le développement de la lymphoprolifération conduisant à une pathologie évocatrice de la maladie de Castleman. La recherche sur l'interaction entre Vpu et C/EBP- β dans ce modèle de souris pourraient déceler une nouvelle fonction de Vpu et contribuer à rendre compte de la lymphoprolifération observée chez ces souris et chez les patients infectés par le VIH.

VI Bibliographie

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. Transplantation Immunology. In: Cellular and molecular immunology. Ch.16. 6th ed. by W. B. Saunders Company. pp375-396, 2010a.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. Effector mechanisms of immune responses; Cytokines. In: Cellular and molecular immunology. Ch.12. 6th ed. by W. B. Saunders Company. p267-301, 2010b.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. Effector mechanisms of Cell-Mediated immunity. In: Cellular and molecular immunology. Ch.13. 6th ed. by W. B. Saunders Company. p303-320, 2010c.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. B cell activation and antibody production. In: Cellular and molecular immunology. Ch. 10. 6th ed. by W. B. Saunders Company. p215-241, 2010d.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. Transgenic Mice and Targeted gene Knockouts. In: Cellular and Molecular Immunology. Appendix III. Laboratory Techniques Commonly Used in Immunology. 6th ed. W. B. Saunders Company. p525-537, 2010e.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. Immunity to tumors. In: Cellular and molecular immunology. Ch.17. 6th ed. by W. B. Saunders Company. p397-417, 2010f.

Adler, S. G., Cohen, A. H., Glasscock, R. J. Secondary glomerular diseases (infectious diseases). In: The kidney. Ch.31, 5th ed. by Brenner, B. M. W. B. Saunders Company. 1547-1552, 1996.

Akari, H., Bour, S., Kao, S., Adachi, A., Strebel, K. The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor κ B-dependent expression of antiapoptotic factors. *J Exp Med.* 194(9):1299-311, 2001.

Akbar, A. N., Taams, L. S., Salmon, M., Vurmanovic-Stejic, M. The peripheral generation of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Immunology.* 109:319-325, 2003.

Alimonti, J. B., Ball, T. B., Fowke, K. R. Mechanisms of CD4⁺ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen Virol.* 84:1649-1661, 2003.

Alpers, C. E., McClure, J., Burstein, S. L. Human mesangial cells are resistant to productive infection by multiple strains of human immunodeficiency virus types 1 and 2. *Am J Kid Dis.* 19:126-130, 1992.

Alpers, C. E. The kidney. In: Robbins and Cotran's, *Pathologic Basis of Disease*. Ed. by V. Kumar, A. K. Abbas, N. Fausto, Elsevier Saunders. 7th ed. pp955-1021, 2005.

Altenburg, S. P., Martins, M. A., Silva, A. R., Cordeiro, R. S. B., Castro-Faria-Neto, H. C. LPS-induced blood neutrophilia is inhibited by α 1-adrenoreceptor antagonists: a role for catecholamines. *J of Leukocyte Biology.* 61:689-694, 1997.

Baccam, M., Bishop, G. A. Membrane-bound CD154, but not CD40-specific antibody, mediates NF- κ B-independent IL-6 production in B cells. *Eur J Immunol.* 29(12):3855-3866, 1999.

Baccam, M., Woo, S-Y., Vinson, Ch., Bishop, G. A. CD40-Mediated Transcriptional Regulation of the IL-6 Gene in B Lymphocytes: Involvement of NF- κ B, AP-1, and C/EBP. *J Immunol.* 170:3099-3108, 2003.

Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. Human chemokines: an update. *Annu Rev. Immunol.* 15:675-705, 1997.

Ballerini, P., Gaidano, G., Gong, J. Z., Tassi, V., Saglio, G., Knowles, D. M., Dalla-Favera, R. Multiple genetic lesions in acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma. *Blood.* 81:166-176, 1993.

Banks, W., Kastin, A., Akerstrom, V. HIV-1 protein gp120 crosses the blood-brain barrier: role of adsorptive endocytosis. *Life Sci.* 61:119-125, 1997.

Barracos, V. E., DeVivo, C., Hoyle, D. H., Goldberg, A. L. Activation of the ATP-ubiquitin proteasome pathway in skeletal muscle of cachectic rats bearing a hepatoma. *Am J Physiol.* 268:E996-E1006, 1995.

Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., Montagnier, L. Isolation of T lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 220:868-871, 1983.

Barré-Sinoussi, F. The early years of HIV-1 research: integrating clinical and basic research. *Nat Med.* 9:844-846, 2003.

Barillari G, Ensoli B. Angiogenic effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and its role in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Clin Microbiol Rev.* 15:310-326, 2002.

Bartz, S. R., Rogel, M. E., Emerman, M. Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. *J Virol.* 70:2324-2331, 1996.

Battaglia, P. A., Ponti, D., Naim, V., Venanzi, S., Psaila, R., Gigliani, F. The HIV-Tat protein induces chromosome number aberrations by affecting mitosis. *Cell Motil Cytoskel.* 61:129-136, 2005.

Bélec, L., Requena, M., Saïdi, H. Passage transmuqueux et dissemination virale. Dans: *Transmission sexuelle de l'infection par le VIH.* Par J. Libbey Eurotext. France. Ch III, pp111-217, 2007.

Benelli, R., Barbero, A., Ferrini, S., Scapini, P., Cassatella, M., Bussolino, F., Tacchetti, C., Noonan, D. M., Albin, A. Human immunodeficiency virus transactivator protein (Tat) stimulates chemotaxis, calcium mobilization, and activation of human polymorphonuclear leukocytes: implications for Tat-mediated pathogenesis. *J Infect Dis.* 182:1643-1651, 2000.

Benjamin, D., Knobloch, T. J., Dayton, M. A., Human B-cell interleukin-10: B cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10. *Blood.* 80:1289-1298, 1992.

Beral, V., Petterman, T., Berkelman, R., Jaffe, H. AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *Lancet.* 237:805-809, 1991.

Berges, B. K., Wheat, W. H., Palmer, B. E., Connick, E., Akkina, R. HIV-1 infection and CD4 T cell depletion in the humanized Rag2^{-/-}Il2^{-/-} (RAG-hu) mouse model. *Retrovirology.* 3:76. 1-14, 2006.

Bertini, R. S., Garantini, S., Delgado, R. et Ghezzi, P. Pharmacological activities of chlorpromazine involved in the tumor necrosis factor production in vivo in mice. *Immunol.* 79:217-219, 1993

Besnard-Guerin, C., Belaïdouni, N., Lassot, I., Segeal, E., Jobart, A., Marchal, C., Benarous, R. HIV-1 Vpu sequesters beta-transducin repeat-containing protein (betaTrCP) in the cytoplasm and provokes the accumulation of beta-catenin and other SCFbetaTrCP substrates. *J Biol Chem* 279: 788–795, 2004.

Bettaieb, A., Oksenhendler, E., Fromat, P., Duedari, N., Bierling, P. Presence of cross-reactive antibody between human immunodeficiency virus (HIV) and platelet glycoproteins in HIV-related immune thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1:162-169, 1989.

Biola, A., Pallardy, M. Mode d'action des glucocorticoïdes. *Presse Méd.* 29(4):215-223, 2000.

Blasig, C., Zietz, Ch., Haar, B., Neipel, F., Esser, S., Brockmeyer, N. H., Tschachler, E., Colombni, S., Ensoli, B., Stürzl, M. Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8. *J Virol*. 71(10):7963-7968, 1997.

Bonancini, M., Nussbaum, J., Ahwalia, J. C. Gastrointestinal, hepatic and pancreatic involvement with *Cryptococcus neoformans* in AIDS. *J Clin Gastroenterol*. 12:295-297, 1990.

Bonancini, M. Hepatobiliary complications in patients with HIV infection. *Am J Med*. 92:404-411, 1992.

Bortner, C. D., Oldenburg, N. B., Cidlowski, J. A. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*. 5:21, 1995.

Bortner, C. D., Hughes, Jr. F. M., Cidlowski, J. A. A primary role for K⁺ and Na⁺ efflux in the activation of apoptosis. *J Biol Chem*. 272:32436-32442, 1997.

Boue, F., Wallon, C., Goujard, C., Barré-Sinoussi, F., Galanaud, P., Delfraissy, J. F. HIV induces IL-6 production by human B lymphocytes. *L. Immunol.* 148:3761-3767, 1992.

Bour, S., Perrin, C., Akari, H., Strebel, K. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein inhibits NF-kappa B activation by interfering with beta TrCP-mediated degradation of Ikappa B. *J Biol Chem.* 276: 15920-15928, 2001.

Bourgoignie, J. J., Ortiz-Interian, C., Green, D. F., Roth, D. Race, a co-factor in HIV-1 associated nephropathy. *Transplant Proc.* 21:3899-3901, 1989.

Bower, M., Nelson, M., Young, A. M., Thirlwell, Newsom-Davis, Mandalia, S., Dhillon, T., Holmes, P., Gazzard, B. G., Stebbing, J. Immune reconstitution inflammatory syndrome associated with Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol.* 23: 5224-5228, 2005.

Bozza, P. T., Castro-Faria-Neto, H. C., Silva, A. R., Lorangeira, A. P., Silva, P. M. R., Martins, M. A., Cordeiro, R. S. B. Lipopolysaccharide induced pleural neutrophil accumulation depends on marrow neutrophils and platelet-activating factor. *Eur. J. Pharmacol.* 270:143-149, 1994.

Brandt, S. J., Bodine, D. M., Dunbar, C. E., Nienhuis, A. W. Dysregulated interleukin 6 expression produces a syndrome resembling Castleman's disease in mice. *Journal of Clinical Investigation.* 86:592-599, 1990.

Brenneman, D., Westbrook, G., Fitzgerlad, S., Ennist, D., Elkins, K., Ruff, M., Pert, C. Neuronal cell killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide. *Nature.* 335:639-642, 1988.

Brinster, R. L., Chen, H. Y., Trumbauer, M. E. Mouse oocytes transcribe injected *Xenopus* 5S RNA gene. *Science.* 211(4480):396-398, 1981.

Bruggeman, L. A., Dikman, S., Meng, Ch., Quaggin, S. E., Coffman, T. M., Klotman, P. E. Nephropathy in human immunodeficiency virus-1 transgenic mice is due to renal transgene expression. *J Clin Invest.* 100(1):84-92, 1997.

Bruijn, J. A., Heer, E., Hoedemaeker, P. J. Immune mechanisms in injury to glomeruli and tubulointerstitial tissue. In: *Monographs on pathology of laboratory animals. Urinary system.* Ed. by Jones, T. C., Hard, G. C., Mohr, U. 2nd ed. Springer. pp199-224, 1998.

Brun, S., Chaloin, L., Gay, B., Bernard, E., Devaux, C., Lionne, C., Chazal, N., Briant, L. Electrostatic repulsion between HIV-1 capsid proteins modulates hexamer plasticity and in vitro assembly. *Proteins.* 78(9):2144-56, 2010.

Brun-Vézinet, F., Deschamps, D., Simon, D. Diagnostic et suivi virologiques de l'infection par le VIH. *Médecine thérapeutique.* 2:25-31, 1996.

Budka, H. HIV-related dementia: pathology and possible pathogenesis. Dans: *The Neuropathology of HIV Infection.* Scaravilli, F., ed. London: Springer-Verlang, 171-185, 1993.

Buffet, C., Gagnepain, A., Hagege, H., Balian, P., Espinoza, P. Les infections à virus B et delta et à virus de l'immunodéficience humaine chez les toxicomanes. *Presse Med* 17:1533-1537, 1988.

Bukrinsky, M. I., Nottet, H. S., Schmidtayerova, H., Dubrovsky, L., Flanagan, C. R., Mullins, M. E., Lipton, S. A., Gendelman, H.E. Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected monocytes: implications for HIV-associated neurological disease. *J Exp Med.* 181(2):735-45, 1995.

Burkitt, W. D. Système immunitaire. Dans: Histopathologie fonctionnelle. Par Wheater, P. R., Burkitt, H. G. MEDSI/Mc Graw-Hill. 2nd ed. Ch.11, pp161-177, 1999.

Busino, L., Chiesa, M., Draetta, G. F., Donzelli, M. Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene*. 23, 2050–2056, 2004.

Butticaz, Ch., Michielin, O., Wyniger, J., Telenti, A., Rothenberger, S. Silencing of both β -TrCP1 and HOS (β -TrCP2) Is Required To Suppress Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vpu-Mediated CD4 Down-Modulation. *J Virol*. 81(3): 1502-1505, 2007.

Calnard-Oriol, P., Billard, F., Cathebras, P., Boucheron, S., Vasselon, C., Vital Durand, D., Levrat, R., Rousset, H. Hyperplasie angiofolliculaire de Castleman. À propos de six observations. *Sem. Hôp. Paris*. 67:201-206, 1991.

Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Edited by Olfert, E. D., Cross, B. M. et Mc William, A. A. 2nd ed., VI. pp173-174, 1993.

Cannon, M., Dollard, S. C., Smith, D. K., Klein, R. S., Schuman, P., Rich, J. D., Vlahov, D., Pellett, Ph. E. Blood-borne and sexual transmission of human herpesvirus 8 in women with or at risk for HIV infection. *N Engl J Med*. 344:637-643, 2001.

Carlo-Stella, C., Ganser, A., Hoelzer, D. Defective *in vitro* growth of the hematopoietic progenitor cells in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Invest*. 80:286-293, 1987.

Cartier, C., Hemonnot, B., Gay, B., Bardy, M., Sanciz, C., Devaux, C., Briant, L. Active cAMP-dependent Protein Kinase Incorporated within Highly Purified HIV-1 Particles Is Required for Viral Infectivity and Interacts with Viral Capsid Protein. *J. Biol. Chem.* 278:35211-3519, 2003.

Casado, G., Thomson, M.M., Sierra, M., Najera, R. Identification of a novel HIV-1 circulating ADG intersubtype recombinant form (CRF19_cpx) in Cuba. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 40:532-537, 2005.

Casella, C. R., Rapaport, E. L., Finkel, T. H. Vpu increases susceptibility of human immunodeficiency virus type 1-infected cells to Fas killing. *J Virol.* 73(1):92-100, 1999.

Castella, A., Croxson, T. S., Mildvan, D., Witt, D. H., Zalusky, R. The bone marrow in AIDS. *Am J Clin Pathol.* 84:425-432, 1985.

Castro, A., Bemer, V., Nóbrega, A., Coutinho, A., Truffa-Bachi, P. Administration to mouse of endotoxin from Gram-negative bacteria leads to activation and apoptosis of T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 28(2): 488-495, 1998.

Cayotta, A., Vuillier, F., Siciliano, J., Dighiero, G. Defective protein tyrosine phosphorylation and altered levels of p59^{fyn} and p56^{lck} in CD4 T cells from HIV-1 onfected patients. *Int Immunol.* 6:611-621, 1994.

Cerasoli, F., Jr., McKenna, P. J., Rosalia, D. L., Albertine, K. H., Peters, S. P., Gee, M. H. Superoxide anion release from blood and bone marrow neutrophils is altered by endotoxemia. *Circ Res.* 67:154-165, 1990.

Cesarman, E., Chang, Y., Moore, P. S. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences are present in AIDS-related body cavity based lymphomas. *N Engl J Med.* 332:1186-1191, 1995.

Champagne, P., Lavoie, P. M., Sékaly, R. P., Yachou, A. Infection par le VIH: importance des facteurs de l'hôte. *Méd Sci.* 14:142-147, 1998.

Chander, P. Sony, A., Suri, A., Bhagwat, R., Yoo, J., Treser, G. Renal ultrastructural markers in AIDS-associated nephropathy. *Am J Pathol.* 126:513-526, 1987.

Chehimi, J., Starr, S.E., Frank, I., **D'Andrea, A.**, Ma, X., MacGregor, R. R., Sennelier, J., Trinchieri, G. Impaired interleukin 12 production in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Exp Med.* 1;179(4):1361-6, 1994.

Chelvarajan, R. L., Liu, Y., Popa, D., Getchell, M. L., Getchell, T. V., Stromberg, A. J., Bondada, S. Molecular basis of age-associated cytokine dysregulation in LPS-stimulated macrophages. *Journal of Leukocyte Biology.* 79:1314-1327, 2006.

Chen, D., Wang, M., Zhou, S., Zhous, Q. HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the proapoptotic Bcl-2 relative Bim. *EMBO J.* 21:6801-6810, 2002.

Chirmule, N., Kalyanaraman, V. S., Lederman, S., Oyaizu, N., Yagura, H., Yellin, M. J., Chess, L., Pahwa, S. HIV-gp160-induced T cell-dependent B cell differentiation. *J Immunol.* 150:2478-2486, 1993.

Chowers, M. Y., Spina, C. A., Knowh, T. J., Fitch, N. J. S., Richman, D. D., Guatelli, J. C. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact *nef* gene. *J Virol.* 68:2906-2914, 1994.

Clark, R. B. The role of PPARs in inflammation and immunity. *J Leukoc Biol.* 71:388-400, 2002.

Clavel, F., Brun-Vezinet, F., Guetard, D., Chamaret, S., Laurent, A., Rozioux, C., Rey, M., Katlama, C., Rey, F., Champelinaud, J. L. LAV type II: a second retrovirus associated with AIDS in West Africa. *C. R. Séances Acad. Sci. III.* 302:485, 1986a.

Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauget, C., Katlama, C., Rozioux, C. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science.* 233:343-346, 1986b.

Clerici, M., Shearer, G. M. A Th1->Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today.* 14:107-111, 1993.

Cocchi, F., DeVico, A. L., Garzino-Demo, A., Arya, S. K., Gallo, R. C., Lusso, P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* 270:1811-1815, 1995.

Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montaigner, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P. Human immunodeficiency virus. *Science.* 232:697, 1986.

Cohen, A. H., Nast, C. C. HIV-associated nephropathy: A unique combined glomerular, tubular and interstitial lesion. *Mod Pathol.* 1:87-97, 1988.

Cohen, A. H., Sun, C. J., Shapshak, P., Imagawa, D. T. Demonstration of human immunodeficiency virus in renal epithelium in HIV-associated nephropathy. *Mod Pathol.* 2:125-128, 1989.

Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S.A., Walker, B. D., Baltimor, D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature.* 391:397-401, 1998.

Contreras, X., Bennasser, Y., Chazal, N., Moreau, M., Leclerc, C., Tkaczuk, J., Bahraoui, E. Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein induces an intracellular calcium increase in human monocytes that requires DHP receptors: involvement in TNF-alpha production. *Virology*. 332:316-328, 2005.

Cooper, G. M., Hausman, R. E. Distribución y transporte de proteínas. En: *La célula*. Cap. 10. 4^{ta}. Ed. por Ed. Marbán. España. pp. 385-432, 2008.

Corbin, A., Grigorov, B., Roingeard, Ph., Darlix, J-L., Muriaux, D. Une nouvelle vision de l'assemblage du VIH-1. *M/S*. 24:49-55, 2008.

Coze, C. M. Cytokines and growth factors. In: *Baillière's Clinical Haematology International Practice and Research*. Ed. par Brenner, M. K., Baillière Tindall. Toronto. pp1-16, 1994.

Cullen, B. R. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol Rev*. 56:375-394, 1992.

Cullen, B. R. RNA-sequence mediated gene regulation in HIV-1. *Infect Agents Dis*. 3:68-76, 1994.

Cullen, B. R. Role and mechanism of action of the APOBEC3 family of antiretroviral resistance factors. *J Virol*. 80(3):1067-1076, 2006.

Dadaglio, G., Leroux, A., Langlade-Demoyen, P., Bahraoui, E. M., Traincard, F., Fisher, R., Plata, F. Epitope recognition of conserved HIV envelope sequences by human cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 1;147(7):2302-9, 1991.

D'Agati, V., Suh, J., Carbone, L., Cheng, J-T., Appel, G. Pathology of HIV-associated nephropathy: a detailed morphologic and comparative study. *Kidney Int*. 35:1358-1370, 1989.

Darlix, J. L., Lapadat-Tapolsky, M., de Rocquigny, H., Roques, B. P. First glimpses at structure-function relationships of the nucleocapsid protein of retroviruses. *J. Mol. Biol.* 254:523-537, 1995.

Darnay, B. G., Aggarwal, B. B. Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. *J. Leukoc. Biol.* 61:559-566, 1997.

Dazza, M. C., Ekwilanga, M., Nende, M., Shamamba, K. B., Bitshi, P., Parskevis, D., Saragosti, S. Characterization of a novel *vpu*-harboring simian immunodeficiency virus from a Dent's Mona monkey (*Cercopithecus mona denti*). *J Virol.* 79:8560–8571, 2005.

Deguchi, M., Isobe, Y., Matsukawa, S., Yamaguchi, A., Nakagawara, G. Usefulness of metyrapone treatment to suppress cancer metastasis facilitated by surgical stress. *Surgery.* 123(4):440-449, 1998.

Diaz, J., Duc Dodon, M., Schaerer-Uthurralt, N., Simonin, D., Kindbeiter, K., Gazzolo, L., Madjar, J. Une Protéine du virus de l'herpes simplex active à la place de Rev et de Rex, le transport nucléocytoplasmique des messagers qui codent pour les glycoprotéines d'enveloppe des rétrovirus humains. *Med Sci.* 12:499-502, 1997.

Dierlamm, J., Pittaluga, S., Stul, M., Wlodarska, I., Michaux, L., Thomas, J., Verhoef, G., Verhest, A., Depardieu, C., Cassiman, J-J., Hagemeijer, A., De Wolf-Peeters, Ch., Van den Berghe, H. Bcl6 gene rearrangements also occur in marginal zone B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 98: 719-725, 1997.

Dinarello, C. A. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol.* 216-134, 1996.

Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smith, R. J., Samson, M., Peiper, M., Collman, R. G., Doms, R. W. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3 and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*. 85:1149-1158, 1996.

Dreyer, E., Kaiser, P., Offermann, J., Lipton, S. HIV-1 coat protein and neurotoxicity prevented by Ca⁺ channel antagonists. *Science*. 248:364-367, 1990.

Douek, D. C. Disrupting T-cell homeostasis: how HIV-1 infection causes disease. *AIDS Rev*. 5:172-177, 2003.

Duff, D. K. Thompson, S., Braye, St., Price, D., Loewenthal, M., Boyle, M. J. The cytokine milieu of HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma favours aggressive tumours. *AIDS*. Vol 14(1):92-94, 2000.

Dunn, T. B., 1967. Renal disease of the mouse: in *Pathology of laboratory rats and mice*. Ed. by Cothin, E et Roe, F. J. C., Blackwell Scientific Publications, Oxford et Edinburgh. Ch 6, pp149-179.

Emilie, D., Coumbaras, J., Raphael, M., Devergne, O., Delecluse, H. J., Gissebrecht, C., Michiels, J. F., Van Damme, J., Taga, T., Kishimoto, T., Crevon, M. C., Galanaud, P. Interleukin-6 production in high grade B lymphomas: correlation with the presence of malignant immunoblast in acquired immunodeficiency syndrome and human immunodeficiency virus negative patients. *Blood*. 80:498-504, 1992a.

Emilie, D., Touton, R., Raphael, M., Peuchmaur, M., Devergne, O., Rea, D., Coumbaras, J., Crevon, M. C., Edelma, L., Joab, I., Galanaud, P. *In vivo* production of interleukin-10 by malignant cells in AIDS lymphomas. *Eur J Immunol*. 22:2937-2942, 1992b.

Emilie, D., Fior, R., Llorente, L., Marfaing-Koka, A., Peuchmaur, M., Devergne, O., Jarrousse, B., Wijdenes, J., Boue, F., Galanaud, P. Cytokines from lymphoid organs of HIV-infected patients: production and role in the immune disequilibrium of the disease and the development of B lymphomas. *Immunol Rev.* 140:5-34, 1994.

Emilie, D., Galanaud, P. Cytokines, facteurs de croissance et infection par le VIH. *Médecine thérapeutique.* 2:hors série 42-48, 1996.

Emilie, D., Peuchmaur, M., Maillot, M. C., Crevon, M. C., Brousse, N., Delfraissy, J. F., Dormont, J., Galanaud, P. Production of interleukins in human immunodeficiency virus-1-replicating lymph nodes. *J Clin Invest.* 86(1):148-59, 1990.

Estrabaud, E., Le Rouzic, E., Lopez-Vergès, S., Morel, M., Belaïdouni, N., Benarous, R., Transy, C., Berlioz-Torrent, C., Margottin-Goguet, F. Regulated Degradation of the HIV-1 Vpu Protein through a bTrCP-Independent Pathway Limits the Release of Viral Particles. *PLoS Pathog.* 3(7):e104. 0995-1004, 2007.

Eustis, S. L., Boorman, G. A., Harada, T., Popp, J. A. Liver dans: Pathology of the Fisher Rat. Ed. by Boorman, G. A., Eustis, S. L., Elwell, M. R., Montgomery, Ch. A., Mackenzie, W. F. Academic Press Inc. Ca. USA. pp71-108, 1990.

Fauci, A. S. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implication for therapy. *Science.* 262:1011-1018, 1993.

Fauci, A. S., Pantaleo, G., Stanley, S., Weissman, D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med.* 124:654-663, 1996.

Felzien, L. K., Woffendien, C., Hottiger, M. O., Subbramanian, R. A., Cohen, E. A., Nabel, G. J. HIV transcriptional activation by the accessory protein, Vpr, is mediated by the p300 co-activator. *Pro Nat Acad Sci USA.* 95:5281-5286, 1998.

Finkel, T. H., Tudor-Williams, G., Banda, N.K., Cotton, M.F., Curiel, T., Monks, C., Baba, T.W., Ruprecht, R.M., Kupfer, A. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med.* 1(2):129-34, 1995.

Fior, R., Vita N, Raphael, M., Minty, A., Maillot, M. C., Crevon, M. C., Caput, D., Biberfeld, P., Ferrara, P., Galanaud, P. Interleukin-13 gene expression by malignant and EBV-transformed human B lymphocytes. *Eur Cytokine Netw.* 5(6):593-600, 1994.

Fiorelli, V., Gendelman, R., Samaniego, F., Markham, P. D., Ensoli, B. Cytokines from activated T cells induce normal endothelial cells to acquire the phenotypic and functional feature of Aids-Kaposi's Sarcoma spindle cells. *J Clin Invest.* 95:1723-1734, 1995.

Flament-Saillour, M., Perronne, Ch. Histoire naturelle de l'infection tuberculeuse et réaction cutanée tuberculinique. *Rev Mal Respir,* 14:5s27-5s32, 1997.

Franke, E. K., Yuan, H. E. H., Luban, J. Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature.* 372:359-361, 1994.

Frankel, A. D., Young, J. A. HIV-1: fifteen proteins and RNA. *Annu Rev Biochem.* 67:1-25, 1998.

Freter, C. E. Acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphomas. *J Nat Cancer Inst.* 10: 45-54, 1990.

Frevert, C. W., Warner, A. E., Kobzik, L. Defective pulmonary recruitment of neutrophils in a rat model of endotoxemia. *Am Respir Cell Mol Biol.* 11:716-723, 1994.

Frizzera, G. Castleman's disease and related disorders. *Semin Diagn Pathol.* 5:346-364, 1988.

Frizzera, G., Peterson, B. A., Bayrd, E. D., Goldman, A. A. A systemic lymphoproliferative disorder with morphologic features of Castleman's disease: clinical findings and clinicopathologic correlations in 15 patients. *J Clin Oncol.* 3:1202-1216, 1985.

Fujiki, Y., Fowler, S., Shio, H., Hubbard, A. L., Lazarow, P. B. Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: comparison with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. *J Cell Biol.* 93(1):103-10, 1982.

Gaidano, G., Lo Coco, F., Ye, B. H., Shibata, D., Levine, A. M., Knowles, D. M., Dalla-Favera, R. Rearrangements of the BCL-6 gene in acquired immunodeficiency syndrome-associated non-Hodgkin's lymphoma: association with diffuse large-cell subtype. *Blood.* 84:397-402, 1994.

Gaidano, G., Carbone, A. AIDS-related lymphomas: from pathogenesis to pathology. *Br J Haematol.* 90:235-243, 1995.

Gaidano, G., Pastore, C., Gloghini, A., Canzonieri, V., Capello, D., Franceschi, S., Saglio, G., Carbone, A. Genetic heterogeneity of AIDS-related small non-cleaved cell lymphoma. *Br J Haematol.* (98):726-732, 1997.

Gallo, R. C., Lusso, P. Chemokines and HIV infection. *Curr Opin Infect Dis.* 10:12-17, 1999.

Ganser, A. Abnormalities of hematopoiesis in the acquired syndrome. *Blut.* 56:49-53, 1988.

Ganser, A., Ottman, O. C., von Briessen, H., Völgers, B., Rübsamen-Waigmann, H., Hoeltzer, D. Changes in the haematopoietic progenitor cell compartment in the acquired immunodeficiency syndrome. *Res Virol.* 141:185-191, 1990.

Gao, F., Yue, L., Robertson, D. L., Hill, S. C., Hui, H., Bigger, R. K., Neequaye, A. E., Whelan, T. M., Ho, D. D., Shaw, G. M. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol.* 68:7433-7447, 1994.

Gao, J. J., Diesl, V., Wittmann, T., Morrison, D. C., Ryan, J. L., Vogel, S. N., Follettie, M. T. Regulation of gene expression in mouse macrophages stimulated with bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharide. *J Leukoc Biol.* 72, 1234-1245, 2002.

Garcia, J. V., Miller, A. D. Serine phosphorylation-independent down regulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature.* 350:508-511, 1991.

Gaunt, S. D. Laboratory Evaluation of Leukocytes. In: *Veterinary Clinical Pathology Secrets* by Cowell, R. L. Elsevier Mosby. pp33-38, 2004.

Gaynor, R., Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS.* 6:347-363, 1992.

Geny, C., Gherardi, R., Boudes, P., Lionnet, F., Cesaro, P., Gray, F. Multifocal multinucleated giant cell myelitis in an AIDS patient. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 17:157-162, 1991.

Gelbard, H. A., James, H. J., Sharer, L. R., Perry, S. W., Saito, Y., Kazee, A. M., Blumberg, B. M., Epstein, L.G. Apoptotic neurons in brains from paediatric patients with HIV-1 encephalitis and progressive encephalopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 21(3):208-17, 1995.

Gelbard, H. A., Nottet, H. S., Swindells, S., Jett, M., Dzenko, K. A., Genis, P., White, R., Wang, L., Choi, Y. B., Zhang, D. Platelet-activating factor: a candidate human immunodeficiency virus type 1-induced neurotoxin. *J Virol.* 68(7):4628-35, 1994.

Gilboa, E., Mitra, S. W., Goff, S., Baltimore, D. A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects. *Cell.* 18:93-100, 1979.

Giuseppe, F. SIDA en odontostomatologie. Éd. Masson, Paris. Ch.2. pp.3-4, 1990.

Glauser, M. P., Heumann, D., Baumgartner, J. D., Cohen, J. Pathogenesis and potential strategies for prevention and treatment of septic shock: an update. *Clin Infect Dis.* 18:s205-s216, 1994.

Glowa, J. R., Panlilio, L. V., Brenneman, D. E., Gores, I., Fridkin, H., Hill, M. D. Learning impairment following intracerebral administration of the HIV envelope protein gp120 or a VIP antagonist. *Brain Res.* 570:49-53, 1992.

Goh, W. C., Rogel, M. E., Kinsey, C. M. HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo. *Nat Med.* 4:65-71, 1998.

Goodman, M. H. Adrenal glands dans *Basic Medical Endocrinology*. Ravens Press, New York. Ch4, pp71-114, 1988.

Gougeon, M. L., Montagnier, L. Apoptosis in AIDS. *Science.* 260:1269-1270, 1993.

Graziosi, C., Pantaleo, G., Fauci, A. S. Comparative analysis of constitutive cytokine expression in peripheral blood and lymph nodes of HIV-infected individuals. *Res Immunol.* 145(8-9):602-7, 1994.

Gray, F., Geny, C., Lionnet, F., Dournon, E., Fenelon, G., Gherardi, R., Poirier, J. Étude neuropathologique de 135 cas adultes de Syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). *Ann Pathol.* 11(4):236-247, 1991.

Gray, F., Lescs, M. C., Keohane, C., Paraire, F., Marc, B., Durigon, M., Gherardi, R. Early brain changes in HIV infection: neuropathological study of 11 HIV seropositive, non-AIDS cases. *J Neuropathol Exp Neurol.* 51(2):177-85, 1992.

Gray, F., Mallat, M. Lésions du système nerveux central liées au virus de l'immunodéficience humaine. *Médecine Thérapeutique.* (2) hors série:49-59, 1996.

Grayson, W., Pantanowitz, L. Histological variants of cutaneous Kaposi sarcoma. *Diagn Pathol.* 3:31; 4, 2008.

Green, D. F., Resnick, L., Bourgoignie, J. J. HIV infects glomerular endothelial and mesangial but not epithelial cells in vitro. *Kidney Int.* 41:956-960, 1992.

Greenberg, M. E., Lafrate, A. J., Skowronski, J. The SH3 domain-binding surface and an acidic motif in HIV-1 Nef regulate trafficking of class I MHC complexes. *EMBO J.* 17:2777-2789, 1998.

Greenspan, D., Pindborg, J. J., Greenspan, J. S., Schiodt, M. Dans *Pathologie SIDA au cabinet dentaire.* Éditions DdP, Paris. Ch 1, pp9-11, 1987a.

Greenspan, D., Pindborg, J. J., Greenspan, J. S., Schiodt, M. Dans *Pathologie SIDA au cabinet dentaire.* Éditions DdP, Paris. Ch 4, p27-34, 1987b.

Grigorov, B., Arcanger, F., Roingeard, Ph., Darlix, J-L., Muriaux, D. Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines. *J Mol Biol.* 359: 848-862, 2006.

Grimm, L. M., Goldberg, A. L., Poirier, G. G., Schwartz, L. M., Osborne, B. A. Proteasome play an essential role in thymocyte apoptosis. *EMBO J.* 15:3835-3844, 1996.

Gürtler, L. G., Hauser, P. H., Eberle, J., von Brunn, A., Knapp, S., Zenkeng, L., Tsague, J. M., Kaptue, L. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J Virol.* 68:1581-1585, 1994.

Guyader, M., Emerman, M., Sonigo, P., Clavel, F., Montaigner, L., Alison, M. Genome organization and transactivation of human immunodeficiency virus type 2. *Nature.* 326:662-669, 1987.

Han, T. M., Naicker, S., Ramdial, P. K., A G Assounga, K. A. A cross-sectional study of HIV-seropositive patients with varying degrees of proteinuria in South Africa. *Kidney Int.* 69:2243-2250, 2006.

Han, Z. C., Bellucci, S., Wan, H. Y., Caen, J. P. New insights into the regulation of megakaryocytopoiesis by haematopoietic and fibroblastic growth factors and transforming growth factor beta 1. *Br J Haematol.* 81(1):1-5, 1992.

Han, Z. C., Caen, J. P. Cytokines acting on committed haematopoietic progenitors. In: *Baillière's Clinical Haematology International Practice and Research.* Ed. by Brenner, M. K., Baillière Tindall. Toronto. pp65-89, 1994.

Hanna, Z., Kay, D. G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S., Jolicoeur, P. Nef Harbors a Major Determinant of Pathogenicity for an AIDS-like Disease Induced by HIV-1 in Transgenic Mice. *Cell.* 95: 163-175, 1998.

Harousse, J. M., Kunsch, C., Hartle, H. T., Laughlin, M. A., Hoxie, J. A., Wigdahl, B., Gonzalez-Scarano, F. CD4-independent infection of human neural cells by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 63:2527-2533, 1989.

Harousse, J. M., Bhat, S., Spitalnik, S. L., Laughlin, M., Stefano, K., Silberberg, D. H., Gonzalez-Scarano, F. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science*. 253:320-323, 1991.

Hayman, M., Arbuthnott, G., Harkiss, G., Brace, H., Filippi, P., Philippon, V., Thomson, D., Vigne, R., Wright, A. Neurotoxicity of peptide analogues of the transactivating protein tat from Maedi-Visna virus and human immunodeficiency virus. *Neuroscience*. 53(1):1-6, 1993.

Hazenberg, M. D., Otto, S. A., van Benthem, B. H., Roos, M. T., Coutinho, R. A., Lange, J. M., Hamann, D., Prins, M., Miedema, F. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS*. 17:1881-1887, 2003.

He, J. L., Chen, Y. Z., Farzan, M., Choe, Ohagen, A., Gartner, S., Busciglio, J., Yang, X., Hofman, W., Newman, W., Mackay, C. R., Sodroski, J., Gabuzda, D. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature*. 385:645-649, 1996.

Hemonnot, B., Cartier, C., Gay, B., Rebuffat, S., Bardy, M., Devaux, C., Boyer, V., Briant, L. The Host Cell MAP Kinase ERK-2 Regulates Viral Assembly and Release by Phosphorylating the p6gag Protein of HIV-1. *J. Biol. Chem*. 279:(31):32426–32434, 2004.

Hengge, U. R., Ruzicka, T., Tyring, S. K., Stuschke, M., Roggendorf, M., Schwartz, R. A, Seeber, S. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: Epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. *Lancet Infect Dis*. 2(5):281–292, 2002.

Hesketh, R. Tumor suppressor genes. In: *The Oncogene Facts Book*. Academic Press, London, UK. pp313-322, 1995.

Heyes, M., Achmin, C., Wiley, C., Major, E., Saito, K., Markey, S. Human microglia convert L-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid. *Biochem J.* 320:595-597, 1996.

Hill, J. M., Nervis, R. F., Avido, R., Moody, T. W., Brenneman, D. E. HIV envelope protein-induced neuronal damage and retardation of behavioral development of rat neonates. *Brain Res.* 603:222-233, 1993.

Hiscott, J., Roulston, A., D'Addario, M., Lacoste, J., Cohen, L. La régulation de l'expression de VIH-1 et l'activation des gènes de cytokines. *Med Sci.* 8:346-351, 1992.

Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, As., Chen, W., Leonard, J. M., Markowitz, M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature.* 373:123-126, 1995.

Hodes, R. J. T-cell mediated regulation: help and suppression. In: Paul, W. E. *Fundamental Immunology.* New York: Reaven Press Ltd, pp587-620, 1989.

Horii, Y., Muraguchi, A., Iwano, M., Matsuda, T., Hirayama, T., Yamada, H., Fujii, Y., Dohi, K., Ishikawa, H., Ohmoto, Y., Yoshizaki, K., Hirano, T., Kishimoto, T. Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulitis. *The Journal of Immunology.* 143(12):3949-3955, 1989.

Hubert, P., Bismuth, G., Körner, M., Debré, P. HIV-1 glycoprotein gp120 disrupts CD4-p56^{lck}/CD3-TCR interactions and inhibits CD3 signaling. *Eur J Immunol.* 25:1417-1425, 1995.

Hubert, P., Barré-Sinoussi, F., Debré, P. Physiopathologie du déficit immunologique au cours de l'infection par le VIH. *Médecine thérapeutique* 2:32-41, 1996.

Humphreys, M. H. Human immunodeficiency virus-associated glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 48(2): 311-320, 1995.

Ishiyama, T., Nakamura, S., Akimoto, Y., Koike, M., Tomoyasu, S., Tsuruoka, N., Murata, Y., Sato, T., Wakabayashi, Y., Chiba, S. Immunodeficiency and IL-6 production by peripheral blood monocytes in multicentric Castleman's disease. *Br J Haematol.* 86(3): 483-9, 1994.

Israël, N., Hazan, U., Alcamì, J., Munier, A., Arenzana-Seisdedos, F., Bachelier, F., Israël, A., Virelizier, J. L. Tumor Necrosis Factor stimulates transcription of HIV-1 in human T lymphocytes, independently and synergically with mitogens. *J Immunol.* 143:3956-3960, 1989.

Isshiki, H., Akira, S., Tanabe, O., Nakajima, T., Shimamoto, T., Hirano, T., Kishimoto, T. Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. *Mol Cell Biol.* 10(6): 2757-2764, 1990.

Jabbar, M. A. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: roles in virus release and CD4 downregulation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 193:107-120, 1995.

James, W. D., Berger, T. G., Elston, D. M. *Andrew's diseases of the skin: Clinical dermatology.* 10th ed. Philadelphia. Saunders Elsevier. Ch.19. Viral diseases. pp367-420, 2005.

Jones, K. A. HIV transactivation and transcription control mechanisms. *The New Biologist* 1:127-135, 1989.

Jowett, J. B. M., Planelles, V., Poon, B., Shah, N. P., Chen, M. L., Chen, I. S. Y. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cycle. *J Virol.* 69:6304-6313, 1995.

Julien, J. P., Tretjakoff, I., Beaudet, L., Peterson, A. Expression and assembly of a human neurofilament protein in transgenic mice provide a novel neuronal marking system. *Genes Dev.* 1(10):1085-95, 1987.

Kahl, B., Yang, D. Marginal Zone Lymphomas: Management of Nodal, Splenic, and MALT NHL. *Hematology. Am Soc Hematol Educ Program.* 359-364, 2008.

Kanki, P. J. Barin, F., M'Boup, S., Allan, J. S., Romet-Lemonne, J. L., Marlink, R., McLane, M. F., Lee, T. H., Arbeille, B., Denis, F. New human T-lymphotropic retrovirus related to simian T-lymphotropic virus type III (STLV-IIIAGM). *Science.* 232:238, 1986.

Karpatkin, S., Nordi, M., Lenette, E. T., Byrne, B., Piesz, B. Anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody complexes on platelets of seropositive thrombocytopenic homosexuals and narcotic addicts. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 85:9763-9767, 1988.

Kataropoulou¹, A., Bovolenta, Ch., Belfiore, A., Trabatti¹, S., Garbelli, A., Porcellini, S., Lupo, R., Maga¹, G. Mutational analysis of the HIV-1 auxiliary protein Vif identifies independent domains important for the physical and functional interaction with HIV-1 reverse transcriptase. *Nucleic Acids Res.* 37 (11): 3660–3669, 2009.

Kathleen, C. F., Sheehan, K. C. F., Schreiber, R. D. The synergy and antagonism of interferon-g and TNF. In: *Tumor necrosis factors: The molecules and their emerging role in medicine.* By Beutler, B. Raven Press, LTD, New York. Ch.11. pp145-177, 1992.

Kaufmann, S. H. E. Immunity to intracellular Bacteria. In: *Fundamental Immunology*. Ed. by William, E. P. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 4th ed. Ch. 40, pp1335-1371, 1999.

Kaul, M., Lipton, M. S. Experimental and Potential Future Therapeutic Approaches for HIV-1 Associated Dementia Targeting Receptors for Chemokines, Glutamate and Erythropoietin. *Neurotox Res.* 8:167-186, 2005.

Keiburtz, K. D., Giang, D. W., Schiffer, R. B., Vakil, N. Abnormal vitamin B12 metabolism in human immunodeficiency virus infection. Association with neurological dysfunction. *Arch Neurol.* 48:312-314, 1991.

Kekow, J., Wachsman, W., McCutchan, J. A., Cronin, M., Carson, D. A., Lotz, M. Transforming growth factor- β and noncytopathic mechanisms of immunodeficiency in human immunodeficiency virus infection. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 87:8321-8325, 1990.

Keller, A. R., Hocheholzer, L., Castleman, B. Hyaline-vascular and plasma-cell types of giant lymph node hyperplasia of the mediastinum and other locations. *Cancer.* 29:670-683, 1972.

Kerkau, Th., Bacik, I., Bennink, JR., Yewdell, J. W., Hünig, T., Schimpl, A., Schubert, U. The Human Immunodeficiency Virus Type I (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J Exp Med.* 185:1295-1305, 1997.

Kesler, E., Beer, R. Multicentric giant lymph node hyperplasia clinically simulating angioimmunoblastic lymphadenopathy. Associated Kaposi's sarcoma in two of three cases. *Isr J Med Sci.* 19:230-234, 1983.

Ketzler, S., Weis, S., Haug, H., Budka, H. Loss of neurons in the frontal cortex in AIDS brains. *Acta Neuropathol.* 80:92-94, 1990.

Kim, B. O., Liu, Y., Ruan, Y., Xu, Z. C., Schantz, L., He, J. J. Neuropathologies in Transgenic Mice Expressing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Protein under the Regulation of the Astrocyte-Specific Glial Fibrillary Acidic Protein Promoter and Doxycycline. *Am J Pathol.* 162(5): 1693-1707, 2003.

Kimmel, P. L., Philips, T. M., Ferreira-Centeno, A., Farkas-Szallasi, T., Abraham, A. A., Garrett, C. T. HIV-associated immune-mediated renal disease. *Kidney Int.* 44(6): 1327-1340, 1993.

Kimmel, P. L., VedBrat, S. S., Pierce, P. F., Umana, W. O., Shepherd, L., Verme, D. A., Hirsch, R. P., Hellman, K. B. Prevalence of viremia in human immunodeficiency virus-infected patients with renal disease. *Arch Intern Med.* 155(15):1578-84, 1995.

Kimmel, P. L., Laura Barisoni, L., Kopp, J. B. Pathogenesis and Treatment of HIV-Associated Renal Diseases: Lessons from Clinical and Animal Studies, Molecular Pathologic Correlations, and Genetic Investigations. *Intern Med.* 139:214-226, 2003.

Kirschning, C. J., Unbehauen, A., Giedler, G., Hallatschek, W., Lamping, N., Pfeil, D., Schumann, R. R. The transcriptional activation pattern of lipopolysaccharide binding protein (LBP) involving transcription factors AP-1 and C/EBP- β . *Immunobiol.* 198:124-135, 1997.

Kirschning, C. J., Wesche, H., Ayres, T. M., Rothe, M. Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 188:2091-2097, 1998.

Kiwelu, I. E., Koulinska, I. N., Nkya, W. M., Shao, J., Kaíga, S., Essex, M. Identification of CRF_CD viruses among bar and hotel workers in Moshi, Northern Tanzania. *AIDS Res Hum Retrovirus*. 21:897-900, 2005.

Klein, G. Epstein-Barr virus strategy in normal and neoplastic B cells. *Cell*. 77:791-793, 1994.

Klotman, P. E., Rappaport, J., Ray, P., Kopp, J.B., Franks R., Bruggeman, L. A., Notkins, A. L. Transgenic models of HIV-1. *AIDS*. 9:313-324, 1995.

Knowles, D. M. Molecular pathology of acquired immunodeficiency syndrome-related non-Hodgkin's lymphoma. *Seminars in diagnostic Pathology*. 14(1): 67-82, 1997.

Knowles, D. M., Dalla-Favera, R. AIDS-associated malignant lymphoma. In: Broder, S., Merrigan, T. C., Bolognesi, D. *Text book of AIDS medicine*. Baltimore. MD., Williams, Wilkins. pp431-463, 1994.

Knowles, D. M., Inghirami, G., Ubriaco, A., Dalla-Favera, R. Molecular genetic analysis of three AIDS-associated neoplasms of uncertain lineage demonstrates their B-cell derivation and the possible pathogenetic role of the Epstein-Barr virus. *Blood*. 73(3):792-9, 1989.

Koide, N., Abe, K., narita, K., Kato, Y., Sugiyama, T., Yoshida, T., Yokochi, T. Expression of intracellular adhesion molecule (ICAM-1) on vascular endothelial cells and tubular cells in the generalized Shwartzman reaction as an experimental disseminated intravascular coagulation model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 18:67-74, 1997.

Koide, N., Narita, K., Kato, Y., Sugiyama, T., Chakravortty, D., Morikawa, A., Yoshida, T., Yokochi, T. Expression of fas and fas ligand on mouse renal tubular epithelial cells in the generalized Shwartzman reaction and its relationship to apoptosis. *Infection and Immunity*. 67(8):4112-4118, 1999.

Kopp, J. B., Klotman, M. E., Adler, S. H., Bruggeman, L. A., Dickie, P., Marinos, N. J., Eckhaus, M., Bryant, J. L., Notkins, A. L., Klotman, P. E. Progressive glomerulosclerosis and enhanced renal accumulations of basement membrane components in mice transgenic for HIV-1 genes. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 89:1577-1582, 1992.

Korber, B. T. M., Allen, E. E., Farmer, A. D., Myers, G. L. Heterogeneity of HIV-1 and HIV-2. *AIDS* 9 (suppl. A):S5-S18, 1995.

Krebs, F. C., Hogan, T. H., Quintero, S., Gartner, S., Wigdahl, B. Lentiviral LTR-directed expression, sequence variation, and disease pathogenesis. *Los Alamos National Laboratory HIV Sequence Compendium*, 29-70, 2001.

Kupps, T. R. Effects of glucocorticoids on lymphocyte function. In: *Anti-inflammatory steroid action, basic and clinical aspects*, by Schleimer, R. P., Claman, H. N. and Oronsky, A. L. Academic Press, Inc. San Diego California. Ch7. p132-150, 1989.

Lafortune, L., Nalbantoglu, J., Antel, J. Expression of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) mRNA in adult human astrocytes: comparison with adult microglia and fetal astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol*. 55:515-521, 1996.

Lambotte, O., Deiva, K., Tardieu, M. HIV-1 persistence, viral reservoir, and the central nervous system in the HAART era. *Brain Pathol*. 13 (1):95-103, 2003.

Lane, D. Antibodies: Immunizing animals and immunizing mice. In: A laboratory manual. By Lane, H. D. Cold Spring Harbor Laboratory. Ch5 and 6. pp92-167, 1988.

Larm, J., Cheung, N., Beart, P. Apoptosis induced via AMPA selective glutamate receptors in cultured murine cortical neurons. *J Neurochem.* 69:617-622, 1997.

Larroche, C., Cacoub, P., Godeau, P. La maladie de Castleman. *Rev Méd Interne.* 17:1003-1013, 1996.

Lawrence, E., Van Eeden, S., English, D., Hogg, J. C. Polymorphonuclear leukocyte (PMN) migration in streptococcal pneumonia: comparison of older PMN with those recently released from the marrow. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 14:217-224, 1996.

Lazarini, F., Seilhean, D., Rosenblum, O., Suarez, S., Conquy, L., Uchihara, T., Sazdovitch, V., Mokhtari, K., Maisonobe, T., Boussin, F., Katlama, C., Bricaire, F., Duyckaerts, C., Hauw, J-J. Human immunodeficiency virus type 1 DNA and RNA load in brains of demented and nondemented patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J neurobiol.* 3:299-303, 1997.

Lebrec, H., Kerdine, S., Gaspard, I., Pallardy, M. Séance thématique Principaux mécanismes cellulaires et moléculaires de l'induction d'une réaction allergique aux xénobiotiques. *Ann Pharm Fr.* 57(6):429-434, 1999.

Leenaars, M., Claassen, E., Boersma, W. J. A. Antigens and antigen presentation. In: immunology methods manual. By Lefkovits, I. Academic Press, USA. v2, Ch13.3. pp991-1001, 1997.

Le Gall, S., Heard, J. M., Schwartz, O. Analysis of Nef-induced MHC-I endocytosis. *Res Virol.* 148:43-47, 1997.

Le Gall, S., Erdtmann, L., Benichou, S., Berlioz-Torrent, C., Liu, L., Benarous, R., Heard, J. M., Schwartz, O. Nef interacts with the subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC-1 molecules. *Immunity*. 8:843-495, 1998.

Leger-Ravet, M. B., Peuchmaur, M., Devergne, O., Audouin, J., Raphael, M., Van Damme, J., Galanaud, P., Diebold, J., Emilie, D. Interleukin-6 gene expression in Castleman's disease. *Blood*. 78(11):2923-30, 1991.

Leiderman, I. Z., Greenberg, M. L., Adelsberg, B. R., Siegal, F. P. A Glycoprotein inhibitor of *in vitro* granulopoiesis associated with AIDS. *Blood*. 70:1267-1272, 1987.

Leidner, R. S., Aboulafia, D. M. Recrudescence Kaposi's Sarcoma After Initiation of HAART: A Manifestation of Immune Reconstitution Syndrome. *AIDS Patient Care STDS*. 19:635-644, 2005.

Lemaire, Ch., Fajardo, R., Cohen, E., Russo, P., Kessous, A. manuscript.

Levine, A. M. AIDS-related malignancies: the emerging epidemic. *J. Nat. Cancer Inst.* 85:1382-1397, 1993.

Lévy, F. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M., Oshiro, L. S. Isolation of lymphocytopathic retrovirus from San Francisco Patients with AIDS. *Science*. 225:840-842, 1984.

Lévy, J. A. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev.* 57:183-189, 1993.

Lévy, Y., Dubreuli-Lemaire, M. Physiopathologie du sarcome de Kaposi: Médecine Thérapeutique (2) hors série: 69-71, 1996.

Libermann, T. A., Baltimore, D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol.* 10(5):2327–2334, 1990.

Lim, S. T., Levine, A. M. Recent Advances in Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)-related Lymphoma. *CA Cancer J Clin.* 55:229-241, 2005.

Lipton, S. A, Sucher, N. J., Kaiser, P. K., Dreyer, E. B. Synergistic effects of HIV coat protein and NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Neuron.* 7:111-118, 1991.

Lipton, S. A. Requirements for macrophages in neuronal injury induced by HIV envelope protein gp120. *Neuroreport.* 3:913-915, 1992.

Lipton, S. A. Neuronal injury associated with HIV-1 and potential treatment with calcium-channel and NMDA antagonists. *Dev Neurosci.* 16:145-151, 1994.

Lipton, S. A., Yeh, M., Dreyer, E. Update on current models of HIV-related neuronal injury: platelet-activating factor, arachidonic acid and nitric oxide. *Adv Neuroimmunol.* 4:181-188, 1994.

Littman, D. R. Not enough sans Nef. *Current Biology.* 4:618-620, 1994.

Lodge, R. E., Darlix, J. L., Cohen, E. A. L'infection par le VIH: rôle des facteurs viraux. *Méd Sci.* 14:148- 154, 1998.

Louache, F., Vainchenker, W. Physiopathologie des anomalies hémathologiques de l'infection par le VIH. *Médecine Thérapeutique* (2) hors série: 60-68, 1996.

Loussert-Ajaka, I., Chaix, M. L., Korber, B., Letourneur, F., Gomas, E., Allen, E., Ly, T. D., Brun-Vezinet, F., Somon, F., Saragosti, S. Variability of human immunodeficiency virus type 1 group O strains isolated from Camerooniam patients living in France. *J Virol.* 69:5640-5649, 1995.

Lowell, C. A., Berton, G. Resistance to endotoxic shock and reduced neutrophil migration in mice deficient for the Src-family kinases Hck and Fgr. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:7580-7584, 1998.

Lowry, O. H., Rosebrough N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265-275, 1951.

Lyerly, H. K., Matthews, T. J., Langlois, A. J., Bolognesi, D. P., Weinhold, K. J. Human T-cell lymphotropic virus IIIB glycoprotein (gp120) bound to CD4 determinants on normal lymphocytes and expressed by infected cells serves as target for immune attack. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84:4601-4605, 1987.

Mackay, C. R. Chemokine: what chemokine is that? *Curr Biol*. 7:384-386, 1997.

Maddon, P. J., Dalgleish, A. G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A., Axel, R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell*. 47:333-348, 1986.

Mandelbrot, L., Tubiana, R., Matheron, S. Grosses et infection par le VIH. In: VIH. Par Girard, P-M., Katlama, Ch., Pialoux, G. Ed. 2007, par DOIN, France. Ch. 40, p501-523, 2007.

Maier, H., Budka, H., Lassmann, H., Pohl, P. Vacuolar myelopathy with multinucleated giant cells in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Light and electron microscopic distribution of human immunodeficiency virus (HIV) antigens. *Acta Neuropathol*. 78:497-503, 1989.

Mankowski, J., Flaherty, M., Spelman, J., Hauer, D., Didier, P., Martin, Amedee, A., Murphey-Corb, M., Kirstein, L., Munoz A., Clements, J., Zink, M. Pathogenesis of simian immunodeficiency virus encephalitis: viral determinants of neurovirulence. *J Virol*. 71:6055-6060, 1997.

Marshall, A. H. E. An outline of the cytology and pathology of the reticular tissue. Charles, C. Thomas Publisher, Springfield Illinois, USA. pp257-268, 1956.

Martin, J. M. E., Bell, B., Ruether, B. A. Giant lymph node hyperplasia (Castleman's disease) of hyaline vascular type. Clinical heterogeneity with immunohistologic uniformity. *Am J Clin Pathol.* 84 (4):439-446, 1985.

Martró, E., Esteve, A., Schulz, T. F., Sheldon, J., Gambús, G., Muñoz, R., Whitby, D., Casabona, J. Risk factors for human Herpesvirus 8 infection and AIDS-associated Kaposi's sarcoma among men who have sex with men in a European multicentre study. *Int J Cancer.* 120:1129-35, 2007.

Masliah, E., Achin, C. L., Ge, N., DeTeresa, R., Terry, R. D., Wley, C. A. Spectrum of human immunodeficiency virus-associated neocortical damage. *Ann Neurol.* 32:321-329, 1992.

Matloubian, M., Concepcion, R. J., Ahmed, R. CD4⁺ T cells are required to sustain CD8⁺ cytotoxic T cell responses during chronic viral infection. *J Virol.* 68:8056-8063, 1994.

May, M. J., Ghosh, S. Signal transduction through NF-κB. *Immunol Today.* 19:80-88, 1998.

Mayama, S., Cuevas, L. E., Sheldon, J., Omar, O. H., Smith, D. H., Okong, P., Silvel, B., Hart, C. A., Schulz, T. F. Prevalence and transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in Ugandan children and adolescents. *Int J Cancer.* 77:817-20, 1998.

McArtur, J. Neurologic manifestation of AIDS. *Med.* 66:407-437, 1987.

McConkey, D. J., Nicotera, P., Hartzell, P., Bellomo, G., Wyllie, A. H., Orrenius, S. Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation on cytosolic Ca²⁺ concentration. *Arch. Biochem. Biophys.* 269:365-370, 1989.

McMichael, A. J., Ogg, G., Wilson, J., Callan, M., Hambleton, S., Appay, V., Kelleher, T., Rowland-Jones, S. Memory CD8⁺ T cells in HIV infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 355:363-367, 2000.

McNatt, M. W., Zang, T., Hatzioannou, T., Bartlett, M., Fofana, I. B., Johnson, W. E., Neil, S. J. D., Bienias, P. D. Species-Specific activity of HIV-1 Vpu and positive selection of tetherin transmembrane domain variants. *PLoS Pathog* 5(2):1-12. e1000300, 2009.

Miedema, F. Immunological abnormalities in the natural history of HIV infection: mechanisms and clinical relevance. *Immunodeficiency Reviews.* 3:173-193, 1992.

Migliorati, G., Pagliacci, C., Moraca, R., Crocchio, F., Nicoletti, I., Riccardi, C. Glucocorticoid-induced apoptosis of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes. *Pharmacol. Res.* 26:26-27, 1992.

Miller, M. D., Warmerdam, M. T., Gaston, I., Greene, W. C., Feinberg, M. B. The human immunodeficiency virus type 1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med.* 179:101-113, 1994.

Miller, M. D., Feinberg, M. B., Greene, W. C. The HIV-1 nef gene acts as a positive viral infectivity factor. *Trends in Microbiology.* 2:294-297, 1994.

Miller, R. T., Mukai, K., Banks, P., Frizzera, G. Systemic lymphoproliferative disorder with morphologic features of Castleman's disease. *Arch Pathol Lab Med.* 108:626-630, 1984.

Mitchell, R. S., Katsura, Ch., Skasko, M. A., Fitzpatrick, K., Lau, D., Ruiz, A., Stephens, E. B., Margottin-Goguet, F., Benarous, R., Guatelli, J. C. Vpu Antagonizes BST-2-Mediated Restriction of HIV-1 Release via b-TrCP and Endo-Lysosomal Trafficking. *PLoS Pathog.* 5(5): e1000450. 1-16, 2009.

Mitola, S., Soldi, R., Zanon, I., Barra, L., Gutierrez, M. I., Berkhout, B., Giacca, M., Bussolino, F. Identification of specific molecular structures of human immunodeficiency virus type 1 Tat relevant for its biological effects on vascular endothelial cells. *J Virol.* 74(1):344-353, 2000.

Molina, J., Scadden, D., Bryrn, R., Dinarello, C., Groopman, J. Production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta by monocytic cells infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Invest.* 84:722-737, 1989.

Moll, M., Andersson, S. K., Smed-Sorensen, A., Sandberg, J. K. Inhibition of lipid antigen presentation in dendritic cells by HIV-1 Vpu interference with CD1d recycling from endosomal compartments. *Blood.* 116:1876-1884, 2010.

Mollace, V., Nottet, H. S. L. M., Clayette, P., Turco, M. C., Carolina Muscoli, C., Salvemini, D., Perno, C. F. Oxidative stress and neuroAIDS: triggers, modulators and novel antioxidants. *Trends Neurosci.* 24:411-416, 2001.

Monroe, J. G., Silverstein, L. E. HIV mediated B-lymphocyte activation and lymphomagenesis. *J Clin Immunol.* 15(2):61-68, 1995.

Morand-Joubert, L. Nouvelle surveillance biologique de l'infection par la VIH. *La Revue du Praticien (Paris).* 48:472-477, 1998.

Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Maclsaac, P. D., Torbett, B. E., Levy, J. A. Rapid loss of CD4+ T cells in human-PBL-SCID mice by noncytopathic HIV isolates. *Science.* 260:689-691, 1993.

Mosman, T. R. Cytokine pattern during the progression to AIDS. *Science*. 265:193-194, 1994.

Movat, H. Z., Burrowes, C. E. The local Shwartzman reaction: endotoxin-mediated inflammatory and thrombo-hemorrhagic lesions. In: Berry, L. J. ed., *Handbook of endotoxins*, vol 3. Elsevier Science Publisher, Amsterdam. The Netherlands. pp260-302, 1985.

Movat, H. Z., Cybulsky, M. I., Colditz, I. G., Chan, M. K., Dinarello, C. A. Acute inflammation in gram-negative infection: endotoxin, interleukin 1, tumor necrosis factor, and neutrophils. *Fed Proc*. 46(1):97-104. 1987.

Murakami T, Hino SI, Saito A, Imaizumi K. Endoplasmic reticulum stress response in dendrites of cultured primary neurons. *Neuroscience*. 146: 1–8, 2007.

Mylona, E. E., Baraboutis, I. G., Lekakis, L. J., Georgiou, O., Papastamopoulos, V., Skoutelis, A. Multicentric Castleman's Disease in HIV Infection: a Systematic Review of the Literature. *AIDS Rev*. 10:25-35, 2008.

Naderi, H. R., Tagliamonte, M., Tornesello, M. L., Ciccozzi, M., Rezza, G., Farid, R., Buonaguro, F. M., Buonaguro, L. Molecular and phylogenetic analysis of HIV-1 variants circulating among injecting drug users in Mashhad-Iran. *Infect Agent Cancer*. 1:4, 2006.

Nagata, S., Golstein, P. The fas death factor. *Science*. 267:1449-1462, 1995.

Nakahara, T., Uchi, H., Urabe, K., Chen, Q., Furue, M., Moroi, Y. *International Immunology*. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. 16(2):1701–1709, 2004.

Nath, A. Human immunodeficiency virus (HIV) proteins in neuropathogenesis of HIV dementia. *JID*. 186 (Suppl 2):S193-S198, 2002.

Nardi, M., Karpatkin, S. Antiidiotype antibody against platelet anti-GPIIIa contributes to the regulation of thrombocytopenia in HIV-1-ITP patients. *J Exp Med*. 191:2093-2100, 2000.

Nguyen, D. T., Diamond, L. W., Hansmann, M. L. Castleman's disease. Differences in follicular dendritic network in the hyaline vascular and plasma cell variants. *Histopathol*. 24:437-443, 1994.

Neil, S. J., Sandrine, V., Sundquist, W. I., Bieniasz, P. D. An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein. *Cell Host and Microbe*. 2:193-203, 2007.

Neil, S. J., Zang, T., Bieniasz, P. D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*. 451: 425-430, 2008.

Newman, S. J., Confer, A. W., Panciera, R. J. Urinary system. In: *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Ed. Mosby ELSEVIER, 4th. Ed. pp613-691, 2007.

Nicholas, J., Ruvolo, V. R., Burns, W. H., Sandford, G., Wan, X., Cuifo, D., Hendrickson, S. B., Guo, H-G., Hayward, G. S., Reitz, M. S. Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nature Medicine*. 3(3):287-292, 1997.

Nilsson, J., Boasso, A., Velilla, P. A., Zhang, R., Vaccari, M., Franchini, G., Shearer, G. M., Andersson, J., Chougnet, C. HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood*. 108:3808-17, 2006.

Nold, J. B., Parker, G. A. Diseases and neoplasms of the aging SD rat. 43rd. Annual Pathology of Laboratory Animals Course. AFIP. pp1-43, 1996.

Norimatzu, M., Ono, T., Aoki, A., Ohishi, K., Tamura, Y. In-vivo induction of apoptosis in murine lymphocytes by bacterial lipopolysaccharides. *Microbial Pathogenicity*. 43:251-257, 1995.

Norman, J. P., Perry, S. W., Kasischke, K. A., Volsky, D. J., Gelbard, H. A. HIV-1 trans activator of transcription protein elicits mitochondrial hyperpolarization and respiratory deficit, with dysregulation of complex IV and nicotinamide adenine dinucleotide homeostasis in cortical neurons. *J Immunol*. 178: 869–876, 2007.

Norman, J. P., Perry, S. W., Reynolds, H. M., Kiebala, M., De Mesy Bentley, K. L., Trejo, M., Volsky, D. J., Maggirwar, S. B., Dewhurst, S., Masliah, E., Gelbard, H. A. HIV-1 Tat Activates Neuronal Ryanodine Receptors with Rapid Induction of the Unfolded Protein Response and Mitochondrial Hyperpolarization. *PLoS ONE*. 3(11): p1-13, e3731, 2008.

Oksenhendler, E., Lévy, Y. Lymphomes non hodgkiniens associés au VIH. *Médecine thérapeutique* (2):72-84, 1996.

Okumura, A., Alce, T. Lubyova, B., Ezelle, H., Strebel, K., Pitha, P. M. HIV-1 accessory proteins VPR and Vif modulate antiviral response by targeting IRF-3 for degradation. *Virology*. 373(1): 85–97, 2008.

O'Regan, S., Russo, P., Lapinte, N., Rousseau, E. AIDS and the urinary tract. *J Acquired Immune Defic Syndr*. 3(3): 244-251, 1990.

Oyaizu, N., Pahwa, S. Role of apoptosis in HIV disease pathogenesis. *J Clin Immunol*. 15:217-231, 1995.

Paludan, S. R. Synergistic action of pro-inflammatory agents: cellular and molecular aspects. *Journal of Leukocyte Biology*. 67:18-25, 2000.

Pancyniak, E., Gomez, M. L., Gomez, L. M., Mulcahy, E. R., Jackson, M., Hout, D. R., Wisdom, B. J., Stephens, E. B. Identification of a region within the cytoplasmic domain of the subtype B Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) that is responsible for retention in the golgi complex and its absence in the Vpu protein from a subtype C HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 21(5):379-394, 2005.

Pantaleo, G., Graziosi, C., Fauci, A. S. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 328:327-335, 1993.

Pantaleo, G., Fauci, A. S. Apoptosis in HIV infection. *Nature Medicine*. 1:118-120, 1995.

Pauk, J., Huang, M-L., Brodie, S. J., Wald, A., Koelle, D. M., Schacker, T., Celum, C., Selke, S., Corey, L. Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med*. 343:1369-1377, 2000.

Paulose-Murphy, M., Ha, N-K., Xiang, Ch., Chen, Y., Gillim, L., Yarchoan, R., Meltzer, P., Bittner, M., Trent, J., Zeichner, S. Transcription Program of Human Herpesvirus 8 (Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus). *J Virol*. 75(10): 4843–4853, 2001.

Pelchen-Matthews A., Kramer, B., Marsh, M. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* 162: 443-55, 2003.

Perelson, A. S., Neuman, U., Markowitz, M., Leonard, J. M., Ho, D. D. Hiv-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span and viral generation time. *Science*. 271:1582-1586, 1996.

Persuy, P., Arnott, G., Fortier, B., Ajana, F., Blondel, M., Fourrier, F., Dewilde, A., Maniez-Montreuil, M. Guillain-Barré syndrome with favorable outcome in a case of recent human immunodeficiency virus infection. *Rev Neurol (Paris)*. 144(1):32-5, 1988.

Peterman, T. A., Drotman, D. P., Curran, J. W. Epidemiology of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Epidemiol Rev.* 7:1-21, 1985.

Peterson, B. A., Frizzera, G. Multicentric Castleman's disease. *Semin Oncol.* 20:636-647, 1993.

Peuchmaur, M., Scoazec, J.-Y., Gaulard, Ph., Solal-Céligny, Ph., Brousse, N. Étude analytique des différents types de lymphomes non Hodgkiniens. Aspects cliniques, morphologiques et immunohistochimiques. Dans: *Lymphomes non Hodgkiniens*. Par Solal-Céligny, Ph., Brousse, N., Reyes, F., Gisselbrecht, C., Coiffier, B. 2nd ed., Éditions Frison-Roche Paris, 103-151, 1991.

Philpott, S. M. HIV-1 coreceptor usage, transmission, and disease progression. *Curr HIV Res.* 1:217-227, 2003.

Piedimonte, G., Guetard, D., Magani, M., Corsi, D., Picerno, I., Spataro, P., Kramer, L., Montroni, M., Silvestri, G., Torres Roca, J. F., Montagnier, L. Oxidative protein damage and degradation in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis.* 176:655-664, 1997.

Piedimonte, G. Crinelli, R., Della Salda, L., Corsi, D., Pennisi, M. G., Kramer, L., Casabianca, A., Sarli, G., Bendinelli, M., Marcato, P. S., Magnani, M. Protein degradation and apoptotic death in lymphocytes during HIV infection: activation of the ubiquitin-proteasome proteolytic system. *Exp Cell Res.* 248:381-390, 1999.

Piguet, P-F., Vesin, C., Ryser, J-E., Senaldi, G., Grau, G. E., Tacchini-Cottier, F. An effector role for platelets in systemic and local lipopolysaccharide-induced toxicity in mice, mediated by a CD11a and CD54-dependent interaction with endothelium. *Infect Immun.* 61:4182-4187, 1993.

Plancoulaine, S., Abel, L., van Beveren, M., Trégouët, D. A., Joubert, M., Tortevoeye, P., de Thé, G., Gessain, A. Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population. *Lancet.* 356:1062-1065, 2000.

Plenat, F., Picard, E., Antunes, L., Vigneaud, J.-M., Marie, B., Chalabreysse, P. L'amplification des réactions immunologiques par dépôt catalytique aux sites de réaction de dérivés de la tyramine. *Ann Pathol.* 17:17-23, 1997.

Pluda, J. M., Venzon, D. J., Tosato, G., Lietzau, J., Wyvill, K., Nelson, D. L., Jaffe, E. S., Karp, J. E., Broder, S., Yarchoan, R. Parameters affecting the development of non-Hodgkin's lymphoma in patients with severe human immunodeficiency virus infection receiving antiretroviral therapy. *J Clin Oncol.* 11(6):1099-1107, 1993.

Pomerantz, R. J. Effects of HIV-1 Vpr on neuroinvasion and neuropathogenesis. *DNA Cell Biol.* 23:227-238, 2004.

Power, C., Gill, M. J., Johnson, R. T. Progress in Clinical Neurosciences: The Neuropathogenesis of HIV Infection: Host-Virus Interaction and the Impact of Therapy. *Can J Neurol Sci.* 29: 19-32, 2002.

Prento, P., Lyon, H. O. Methyl green-pyronin Y staining of nucleic acids: studies on the effects of staining time, dye composition and diffusion rates. *Biotech Histochem.* 78(1):27-33, 2003.

Price, S. R., Baley, J. I., Wang, X. Muscle wasting in insulinopenic rats: Results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *J Clin Invest.* 98:1703-1708, 1996.

Qureshi, S. T., Gros, P., Malo, D. The LPS locus: Genetic regulation of host responses to bacterial lipopolysaccharide. *Inflammation Research.* 48:613-620, 1999.

Radin, D. R., Backer, E. L., Klatt, E. C., Balthazar, E. J., Jeffrey, R. B., Megibow, A. J., Ralls, P. W. Visceral and nodal calcification in patients with AIDS-related *Pneumocystis carinii* infection. *AJR.* 154(1):27-31, 1990.

Raetz, C. R. H., Ulevitch, R. J., Wright, S. D., Sibley, C. H., Ding, A., Nathan, C. Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEV J.* 5:2652-2660, 1991.

Rao T. K. Clinical features of human immunodeficiency virus associated nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 35:S13-8, 1991.

Rao, T. K. A decade of human immunodeficiency virus-associated nephropathy (HIVAN). *Transplant Proc.* 25: 2439-2440, 1993.

Ray, A., Sassone-Corsi, P., Sehgal, P. B. A multiple cytokine- and second messenger-responsive element in the enhancer of the human interleukin-6 gene: similarities with *c-fos* gene regulation. *Mol Cell Biol.* 9(12):5537-5547, 1989.

Recomendations of the Advisory Comitee for Elimination of Tuberculosis. The use of preventive treatement for tuberculosis in the United States. *MMWR,* 39:RR-9:9-12, 1990.

Rook, A. H., Masur, H., Lane, H. C., Frederick, W., Kasahara, T., Macher, A. M., Djeu, J. Y., Manischewitz, J. F., Jackson, L., Fauci, A. S., Quinnan, G. V. Jr. Interleukine-2 enhances the depressed natural killer and cytomegalovirus specific cytotoxic activities of lymphocytes from patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Invest.* 72:398-403, 1983.

Ross, M. J., Klotman, P. E. Recent Progress in HIV-Associated Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 13: 2997–3004, 2002.

Rothe, M., Israël, N., Barré-Sinoussi, F. Mécanismes de la réplication virale des VIH. *Médecine thérapeutique.* 2:12-18, 1996.

Roux, P., Alfieri, C., Hrimech, M., Cohen, E. A., Tanner, J. E. Activation of Transcription Factors NF- κ B and NF-IL6 by Human Immunodeficiency Virus-type 1 Protein R (Vpr) Induces Interleukin-8 Expression. *J Virol.* 74: 4658-4665, 2000.

Rozenzweig, M., Clark, D. P., Gaulton, G. N. Selective thymocyte depletion in neonatal HIV-1 thymic infection. *AIDS* 7:1601-1605, 1993.

Sabatier, J. M., Vives, E., Mabrouk, K., Benjouad, A., Rochat, H., Duval, A., Hue, B., Bahraoui, E. Evidence for neurotoxic activity of tat from human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 65(2):961-7, 1991.

Sacktor, N. The epidemiology of human immunodeficiency virus-associated neurological disease in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Neurovirol.* 8 (2):115-121, 2002.

Sambrook, J., Gething, M. J. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature.* 342(6247):224-5, 1989.

Samson, M., Aubry, F., Parmentier, M. Que sont les chimiokines? *Méd Sci.* 15:966-73, 1999.

Sangüeza, O. P., Requena, L. Malignant neoplasms. Kaposi's sarcoma. In *Pathology of vascular skin lesions. Clinicopathologic correlations.* Edited by Sangüeza, O. P., Requena, L. Humana Press, New Jersey. 217-235, 2003.

Santoro, T., Bryant, J. A., Pellicoro, J., Klotman, M. E., Kopp, J. B., Bruggeman, L. A., Franks, R. R., Notkins, A. L., Klotman, P. E. Growth failure and AIDS-like cachexia syndrome in HIV-1-transgenic mice. *Virology*, 201:147-151, 1994.

Sarid, R., Sato, T., Bohenzky, R. A., Russo, J. J., Chang, Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional Bcl-2 homologue. *Nature Medicine* 3(3):293-298, 1997.

Scaradavou, A. HIV-related thrombocytopenia. *Blood Rev.* 16:73-76, 2002.

Schellekens, P. T. A., Roos, M. T. L., De Wolf, F., Lange, J. M. A., Miedema, F. Low T cell responsiveness to activation via CD3/TCR is a prognostic marker for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1)-infected men. *J Clin Immunol.* 10:121-127, 1990.

Schim, M. F. v. d. L., Aaby, P. Towards a Better Understanding of the Epidemiology of HIV-2. *AIDS.* 13 (suppl A):S69-S84, 1999.

Schmidbauer, M., Budka, H., Okeda, R., Cristina, S., Lechi, A., Trabattoni, G. R. Multifocal vacuolar leukoencephalopathy: a distinct HIV-associated lesion of the brain. *Neuropathol. Appl Neurobiol.* 16:437-443, 1990.

Schöfer, H., Sachs, D. L. Kaposi's Sarcoma. In: HIV Medicine 2007. by Hoffmann, Ch., Rockstroh, J. K., Kamps, B. S. Ed. Flying Publisher. Ch13. pp477-488, 2007.

Schröder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., Bushman, F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 110: 521-529, 2002.

Schubert, U., Anton, L. C., Bacik, I., Cox, J. H., Bour, S., Bennink, J. R., Orłowski, M., Strebel, K., Yewdell, J. W. CD4 glucoprotein degradation induced by human immuno-deficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J Virol*. 72(3):2280-2288, 1998.

Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., Heard, J. M. Endocytosis of histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med*. 2:338-342, 1996.

Schwartz, R. H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science*. 248:1349-1356, 1990.

Sciacca, F. L., Stürzl, M., Bussolino, F., Sironi, M., Brandstetter, H., Zietz, C., Zhou, D., Matteucci, C., Peri, G., Sozzani, Sé., Bellini, R., Arese, M., Albini, A., Colotta, F., Mantovani, A. Expression on adhesion molecules, platelet-activating factor, and chemokines by Kaposi's sarcoma cells. *J Immunol*. 153:4816-4825, 1994.

Screpanti, I., Romani, L., Musiani, P., Modesti, A., Fattori, E., Lazzaro, D., Sellitto, C., Scarpa, S., Bellavia, D., Lattanzio, G., Bistoni, F., Frati, L., Cortese, R., Gulino, A., Ciliberto, G., Costantini, F., Poli, V. Lymphoproliferative disorder and imbalanced T-helper response in C/EBP- β -deficient mice. *EMBO J*. 14(9):1932-1941, 1995.

Seelamgari, A., Maddukuri, A., Berro, R., de la Fuente, C., Kehn, K., Deng, L., Dadgar, S., Bottazzi, M. E., Ghedin, E., Pumfery, A., Kashanchi, F. Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1. *Front biosci.* 9:2388-2413, 2004.

Seilhean, D., Dzia-Lepfoundzou, A., Sazdovich, V., Cannella, B., Raine, C., Katlama, C., Bricaire, F., Duyckaerts, C., Hauw, J-J. Astrocytic adhesion molecules are increased in HIV-1-associated cognitive motor complex. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 23:83-92, 1997.

Seilhean, D., Michaud, J., Duyckaerts, C., Hauw, J-J. Physiopathologie de l'infection du système nerveux par le VIH-1 et de la démence du SIDA. *Rev Neurol (Paris)* 154: 12, 830-842, 1998.

Selmaj, K. W., Raine, C. S. Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocytes damage *in vitro*. *Ann Neurol.* 23:339-346, 1988.

Senaldi, G., Piguët, P-F. Mortality and platelet depletion occur independently of fibrinogen consumption in murine models of tumor necrosis factor-mediated systemic inflammatory responses. *Cytokine.* 10(5):382-389, 1998.

Shah, A. H., Sowrirajan, B., Davis, Z. B., Ward, J. P., Campbell, E. M., Planelles, V., Barker, E. Degranulation of natural killer cells following interaction with HIV-1-infected cells is hindered by downmodulation of NTB-A by Vpu. *Cell Host Microbe.* 8:397-409, 2010.

Sharer LR, Cho ES, Epstein LG. Multinucleated giant cells and HTLV-III in AIDS encephalopathy. *Hum Pathol.*16(8):760, 1985.

Shevach, E. M. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* 2(6):389-400, 2002.

Shibata, D. Biologic aspects of AIDS-related lymphoma. *Curr Opin Oncol.* 6: 503-507, 1994.

Shuldiner, A. R. Transgenic Animals. *Molecular Medicine.* 334(10):653-655, 1996.

Simon, D. B., Farhi, A., Mahnensmith, R., Lifton, R. P. Inherited susceptibility to HIV nephropathy in African Americans. *J Am Soc Nephrol.* 7:1343, 1996.

Simon, F., Ly, T. D., Baillou-Beaufils, A., Fauveau, V., De Saint-Martin, J., Loussert-Ajaka, I., Chaix, M. L., Saragosti, S., Courouce, A. M., Ingrand, D. Sensitivity of screening kits for anti-HIV subtype O antibodies. *AIDS.* 8:1628-1629, 1994.

Sinclair, E., Gray, F., Ciardi, A., Scaravilli, F. Immunohistochemical changes and PCR detection of HIV provirus DNA in brains of asymptomatic HIV-positive patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 53:43-50, 1994.

Slofstra, S. H., Cate, H. T., Spek, C. A. Low dose endotoxin priming is accountable for coagulation abnormalities and organ damage observed in the Shwartzman reaction. A comparison between a single-dose endotoxemia model and a double-hit endotoxin-induced Shwartzman reaction. *Thrombosis Journal.* 4:13, 1-7, 2006.

Slofstra, S. H., Groot, A. P., Obdeijn, M. H., Reitsma, P. H., ten Cate, H., Spek, C. A. Gene expression profiling identifies C/EBPdelta as a candidate regulator of endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. *Am J Respir Crit Care Med.* 176(6):528-30, 2007.

Smith, T. W., DeGirolami, U., Héinin, D., Bolgert, F., Hauw, J. J. Human immunodeficiency virus (HIV) leukoencephalopathy and the microcirculation. *J. Neuropathol. Exp Neurol.* 49:357-370, 1990.

Sonigo, P. Variation virale, phylogénie et histoire naturelle du sida. *Médecine thérapeutique* 2:6-10, 1996.

Soulier, J., Grollet, L., Oksenhendler, E., Micléa, J. M., Cacoub, P., Baruchel, A., Brice, P., Clauvel, J. P., **d'Agay, M. F**, Raphael, M. Molecular analysis of clonality in Castleman's disease. *Blood.* 86(3):1131-8, 1995.

Sousa, A., Carneiro, J., Meier-Schellersheim, M., Grossman, Z., Victorino, R. 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.* 169:3400-3408, 2002.

Spina, C. A., Kwoh, T. J., Chowes, M. Y., Guatelli, J. C., Richman, D. D. The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes. *J Exp Med.* 179:115-123, 1994.

Sprent, J., Tough, D. F. Lymphocyte life-span and memory. *Nature.* 265:1395-1400, 1994.

Sredni-Kenigsbuch, D., Kambayashi, T., Strassmann, G. Neutrophils augment the release of TNF- α from LPS-stimulated macrophages via hydrogen peroxide. *Immunology Letters.* 71:97-102, 2000.

Staples, J. E., Fiore, N. C., Frazier, D. E., Gasiewikz, T. A., Silverstone, A. E. Overexpression of the anti-apoptotic oncogene, bcl-2, in the thymus does not prevent thymic atrophy induced by estradiol or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 151(1):200-210, 1998.

Staskus, K. A., Sun, R., Miller, G., Racz, P., Jaslowski, A., Metroka, C., Brett-Smith, H., Haase, A. T. Cellular tropism and viral interleukin-6 expression distinguish human herpesvirus 8 involvement in Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, multicentric Castleman's disease. *J Virol*. 73(5):4181-4187, 1999.

Stefanski, S. A., Elwell, M. R., Stromberg, P. C. Spleen, lymph nodes, and thymus In: *Pathology of the Fisher Rat*. By Boorman, G. A., Eustis, S. L., Elwell, M. R., Montgomery, Ch. A., Mackenzie, W. F. Academic Press Inc. Ca. USA. pp369-393, 1990.

Strebel, K. Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *Aids* 17(4):S25-34, 2003.

Strebel, K., Bour, S. Molecular Interactions of HIV With Host Factors. *AIDS*. 13 (suppl A):S13 - S24, 1999.

Su, L., Kaneshima, H., Bonyhadi, M., Salimi, S., Kraft, D., Rabin, L., McCune, J.M. HIV-1-induced thymocyte depletion is associated with indirect cytopathicity and infection of progenitor cells in vivo. *Immunity*. 2:25-36, 1995.

Subar, M., Neri, A., Inghirami, G., Knowles, D. M., Dalla-Favera, R. Frequent c-myc oncogene activation and infrequent presence of Epstein-Barr virus genome in AIDS-associated lymphoma. *Blood*. 72(2):667-671, 1988.

Subbramian, R. A., Cohen, E. A. Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *J Virol*. 68:6831-6835, 1994.

Suematsu, S., Matsuda, T., Aozasa, K., Akira, S., Nakano, N., Ohono, S., Miyazaki, J-l., Yamura, K-l., Hirano, T., Kishimoto, T. IgGI plasmocytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 86:7547-7551, 1989.

Surovoy, A., Waidelich, D., Jung, G. Nucleocapsid protein of HIV-1 and its Zn²⁺ complex formation analysis with electrospray mass spectrometry. *FEBS Lett.* 26:311(3):259-62, 1992.

Tavoni A, Vitali C, Baglioni P, Gerli R, Marchetti G, Di Munno O, Bombardieri S. Multicentric Castleman's disease in a patient with primary Sjögren's syndrome. *Rheumatol Int.* 12(6):251-3, 1993.

Terwilliger, E. F., Cohen, E. A., Lu, Y. C., Sodroski, J. G., Haseltine, W. A. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 86(13):5163-7, 1989.

Thali, M., Bukovsky, A., Kondo, E. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature.* 372:363-365, 1994.

Thomson, M. M., Casado, G., Posada, D., Sierra, M., Najera, R. Identification of a novel HIV-1 complex circulating recombinant form (CRF18_cpx) of central African origin in Cuba. *AIDS.* 19:1155-1163, 2005.

Thornton, A. M., Piccirillo, C. A., Shevach, E. M. Activation requirements for the induction of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function. *Eur J Immunol.* 34(2):366-376, 2004.

Tobias, P., Soldau, K., Ulevitch, R. G. Isolation of lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med.* 164:777-793, 1986.

Toft, P., Svendsen, P., Tonnesen, E., Rasmussen, J. W., Christensen, N. J. Redistribution of lymphocytes after major surgical stress. *Acta Anesthesiol Scand.* 37:245-249, 1993.

Toggas, S. M., Masliah, E., Rockenstein, E. M., Rall, G. F., Abraham, C. R. Central nervous system damage produced by expression of HIV-1 coat protein gp120 in transgenic mice. *Nature.* 364:188-193, 1994.

Tonino, A., Barbara, G., Screpanti, I., Gulino, A., Poli, V. Interleukin-6 and CAAT/enhancer binding protein b-deficient mice act as tools to dissect the IL-6 signalling pathway and IL-6 regulation. *Immunobiol.* 198:144-156, 1997.

Toyoda H. Komurasaki T., Ikeda Y., Yoshimoto M., Morimoto S. Molecular cloning of mouse epiregulin, a novel epidermal growth factor-related protein, expressed in the early stage of development. *FEBS Lett.* 377(3): 403-407, 1995.

Treacy, M., Lai, L., Costello, C., Clark, A. Peripheral blood and bone-marrow abnormalities in patients with HIV-related disease. *Br J Haematol.* 65:289-294, 1987.

Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J. M., Olson, W. C., Allaway, G. P., Chengmayer, C., Robinson, J., Maddon, P. J., Moore, J. P. CD4-independent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature.* 384:184-187, 1996.

Tsai, C. Y., Vanden Halsevelde, M., Decourt, J. L., De Leys, R. J., Vanderborght, B., Van der Groen, G., van Heuverswijn, H., Saman, E. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J Virol.* 68:1586-1596, 1994.

Tsunemi, S., Iwasaki, T., Imado, T., Higasa, S., Kakishita, E., Shirasaka, T., Sano, H. Relationship of CD4+CD25+ regulatory T cells to immune status in HIV-infected patients. *AIDS*. 19:879-886, 2005.

Ugolini, S., Mondor, L., Sattentau, Q. J. HIV-1 attachment: Another look. *Trends Microbiol.* 7:144-149, 1999.

UNAIDS. Rapport sur l'épidémie mondiale de sida 2008. Dans: Programme Communs des Nations Unies sur le VIH/SIDA (http://www.unaids.org/fr/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2008/2008_Global_report.asp), 2008.

Van Damme, N., Goff, D., Katsura, C., Jorgenson, R. L., Mitchell, R., Johnson, M. C., Edward B. Stephens, E. B., John Guatelli, J. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe*. 3: 245–252, 2008.

Van Heuverswyn, F., Li, Y., Neel, C., Bailes, E., Keele, B. F., Liu, W., Loul, S., Butel, C., Liegeois, F., Bienvenue, Y., Ngolle, E. M., Sharp, P. M., Shaw, G. M., Delaporte, E., Hahn, B. H., Peeters, M. Human immunodeficiency viruses: SIV infection in wild gorillas. *Nature*. 444(7116):164, 2006.

Vanni, T., Sprinz, E., Machado, M. W., Santana, R. D., Fonseca, B. A., Schwartzmann, G. Systemic treatment of AIDS-related Kaposi sarcoma: Current status and perspectives. *Cancer Treat Rev.* 32(6):445-455, 2006.

Vendeville, A., Rayne, F., Bonhoure, A., Bettache, N., Montcourrier, P., Beaumelle, B. HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Mol Biol Cell*. 15:2347-2360, 2004.

Verhasselt, V., Vildé, J. L. Infection due au virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Dans: Imagerie du SIDA. Par Bellin, M. F., Brunelle, F., Grenier, P., Martin, N., Menu, Y., Vildé, J. L. Dirigée par Nahum, H. Éd. Flammarion Médecine-Sciences. Paris, France. pp1-11, 1991.

Vieira J, Huang M, Koelle D, Corey L. Transmissible Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in saliva of men with a history of Kaposi's sarcoma. *J Virol.* 71:7083-7087, 1997.

Wagner, J. G., Roth, R. A. Neutrophil migration during endotoxemia. *J of Leukocyte Biology.* 66:10-24, 1999.

Wallace, D. R. HIV neurotoxicity: potential therapeutic interventions. *J Biomed Biotechnol.* 1-10, 2006.

Waterston, A., Bower, M. Fifty years of Multicentric Castleman's disease. *Acta Oncologica.* 43:699-704, 2004.

Wattre, P., Bert, V., Hober, D. Apoptose et infections virales humaines. *Ann Biol Clin.* 54:189-197, 1996.

Weis, S., Haug, H., Budka, H. Astroglial changes in the cerebral cortex of AIDS brains: a morphologic and immunohistochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 19:329-335, 1993.

Welch, J. S., Ricote, M., Akiyama, T. E., Gonzalez, F. J., Glass, C. K. PPAR- γ and PPAR- δ negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN- γ target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:6712-6717, 2003.

Wells, C. A., Ravasi, T., Faulkner, G., Carninci, P., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y., Sweet, M., Wainwright, B., Hume, D. Genetic control of the innate immune response. *BMC Immunol.* 4:5, 1-18, 2003.

Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A., Strebel, K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol.* 66:226-234, 1992.

Woodward, M. J., de Boer, J., Heidorn, S., Hubank, M., Kioussis, D., Williams, O., Brady, H. J. Tnfrsf8 is an essential gene for the regulation of glucocorticoid-mediated apoptosis of thymocytes. *Cell Death Differ.* 2009 Sep 4. [Epub ahead of print] advance online publication, 4 September 2009; doi:10. 1038/cdd. 2009.125.

Wu, L. J., Gerard, N. P., Wyatt, R., Choe, h., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A. A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C., Sodoroski, J. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature.* 384:179-183, 1996.

Wurfel, M. M., Hailman, E., Wright, S. D. Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J Exp Med.* 181:1743-1754, 1994.

Wyma, D. J., Kotov, A., Aiken, C. Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J Virol.* 74:9381-9387, 2000.

Wynia, M. K., Shapiro, B., Kuvin, J. T., Skolnik, P. R. Fatal Castleman's disease and pulmonary Kaposi's sarcoma in an HIV seropositive woman. *AIDS.* 9:814-816, 1995.

Yao, X. J., Friborg, J., Checroune, F., Gratton, S., Boisvert, F., Sékaly, R. P., Cohen, E. A. Degradation of CD4 induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: a predicted alpha-helix structure in the proximal cytoplasmic region of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *Virology*. 209(2):615-623, 1995.

Yawetz, S., Cumberland, W. G., Van der Meyden, M., Martinez-Maza, O. Elevated serum levels of soluble CD23 (sCD23) precede the appearance of acquired immunodeficiency syndrome-associated non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 85:1843-1849, 1995.

Yoshizaki, K., Matsuda, T., Nishimoto, N., Kuritani, T., Taeho, T., Aozasa, K., Nakahata, T., Kawai H., Tagoh, H., and Komori, T. Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *The American Society of Hematology*. 74(4): 1360-1367, 1989.

Zhang, H., Peterson, J. W., Niesel, D. W., Klimpel, G. R. Bacterial lipoprotein and lipopolysaccharide act synergistically to induce lethal shock and proinflammatory cytokine production. *The Journal of immunology*. 159:4868-4878, 1997.

Zhang, L., Tarleton, R. L. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by *in situ* immunochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur J Immunol*. 26: 102-109, 1996.

Zhang, L., Insel, P. A. The Pro-apoptotic Protein Bim Is a Convergence Point for cAMP/Protein Kinase A- and Glucocorticoid-promoted Apoptosis of Lymphoid Cells. *J Biol Chem*. Vol. 279(20): 20858–20865, 2004.

Zucker-Francklin, D., Cao, Y. Megakaryocytes of human immunodeficiency virus-infected individuals express viral RNA. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 86:5595-5599, 1989.

Zuo, Y., Matsusaka, T., Zhong, J., Ma, J., Ma, L., Hanna, Z., Jolicœur, P., Fogo, A. B., Ichikawa, I. HIV-1 Genes *vpr* and *nef* synergistically damage podocytes, leading to glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 17: 2832–2843, 2006.

Zylberberg, H., Pol, S. Reciprocal interaction between human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections. *Clinical Infectious Diseases*. 23(5):1117-1125, 1996a.

Zylberberg, H., Viard, J-P. Manifestations hépatobiliaires au cours de l'infection par le VIH. *Médecine Thérapeutique* (2) hors série:85-93, 1996b.