

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **UNIVERSITE MONTPELLIER II**

Préparée au sein de l'école doctorale :
Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé
Et de l'unité de recherche :
Institut de Génétique Humaine

Spécialité : **Virologie, Immunologie**

Présentée par **Charline DUQUENNE**

Modulation de l'activité des corécepteurs CCR5 et CXCR4
du VIH-1 comme stratégie thérapeutique:
étude des deux isoformes de CXCR4 et interaction de
CCR5 avec le récepteur S1P1.

Soutenue le 4 Décembre 2013 devant le jury composé de :

M. Jean-Daniel LELIEVRE.....Président
Professeur, Hôpital Henri Mondor, Créteil
M. Elmostafa BAHRAOUI.....Rapporteur
Professeur, CHU Purpan, Toulouse
M. Pierre DELOBEL.....Rapporteur
Professeur, CHU Purpan, Toulouse
M. Laurent PREZEAU.....Examineur
Directeur de Recherche, IGF, Montpellier
M. Vincent FRANCOIS.....Directeur de thèse
Chargé de Recherche, IGH, Montpellier
M. Pierre CORBEAU.....Co-Directeur de thèse
Professeur, IGH, Montpellier

Thèse réalisée au sein du laboratoire :

Institut de Génétique Humaine
Equipe Domiciliation, activation immunitaire et infection
141, rue de la Cardonille
34396 Montpellier Cedex 5
France

Résumé

CCR5 et CXCR4 sont les corécepteurs d'entrée du VIH utilisés par le virus *in vivo* en plus du récepteur principal CD4 pour infecter les cellules. Au début et tout le long de l'infection, on retrouve chez les patients infectés par le VIH, des virions R5 utilisant le corécepteur CCR5 pour infecter les cellules. Dans les stades tardifs de l'infection et chez environ la moitié des personnes infectées par le VIH, on observe en plus de ces souches R5, l'apparition de souches X4, utilisant le corécepteur CXCR4 pour infecter les cellules. Cette apparition de souches X4 est un facteur d'aggravation de la maladie. Les causes de cette commutation de R5 vers X4 sont mal définies. Le but de mon travail de thèse a été de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques visant l'un ou l'autre de ces corécepteurs.

La première partie de mon travail compare les deux isoformes de CXCR4 en tant que corécepteurs du VIH. Ces deux isoformes, CXCR4-A et CXCR4-B, diffèrent de 9 acides aminés en NH₂ terminal suite à un épissage alternatif. Nous avons montré que l'isoforme CXCR4-B est la plus performante en tant que corécepteur du VIH mais que ces deux variants sont équivalents pour la migration vers leur ligand commun CXCL12. Ainsi, nous proposons qu'en ciblant exclusivement l'isoforme B qui est la plus favorable à l'infection, via par exemple des siRNA, il serait possible de limiter les infections par des souches X4 tout en gardant une partie des fonctions essentielles de ce récepteur dans l'organisme, assurées par l'isoforme A. Nos résultats suggèrent également que l'infection par des souches R5 augmente le ratio en ARNm CXCR4-B / CXCR4-A dans des PBMC, et que ce ratio est en partie responsable de la commutation de R5 vers X4 associée à une aggravation de la maladie. Cibler cette isoforme CXCR4-B pourrait donc se révéler bénéfique.

La deuxième partie de cette thèse étudie la modulation de la fonction de corécepteur du VIH de CCR5 par S1P1, un autre membre de la famille des récepteurs couplés aux protéines G qui permet la remise en circulation des lymphocytes après leur séjour dans les organes lymphoïdes secondaires par chimiotactisme vers son ligand S1P, abondant dans le sang. Nous montrons que S1P1 interagit physiquement avec CCR5 et gêne l'entrée des virus R5 dans la cellule-hôte. A l'inverse, S1P1 active les étapes post-entrée du cycle viral, notamment l'expression génique virale. La résultante de ces effets opposés est une augmentation de la production virale par des cellules infectées *in vitro*. Ce projet a également montré que l'utilisation de FTY720, un antagoniste fonctionnel de S1P1, diminue l'infection de cellules dendritiques par des virus HIV-R5 *in vitro*, ainsi que la virémie dans un modèle de souris SCID infectées après reconstitution immunologique. La mise en évidence des interactions entre CCR5 et S1P1 ouvre donc des perspectives thérapeutiques.

Mots clefs : VIH, CCR5, CXCR4, S1P1, RCPG, FTY720.

Abstract

Title: Modulation of CCR5 and CXCR4 HIV-1 coreceptor activities as a therapeutic strategy: studying the two CXCR4 isoforms and the interaction of CCR5 with S1P1.

CCR5 and CXCR4 are the two HIV entry coreceptors used by the virus in addition to the main receptor CD4 *in vivo* to infect cells. R5 virions, that use CCR5 as a coreceptor to infect cells, are detected in most HIV patients. At late stages of infection and in about half of HIV infected persons, there is an emergence of X4 virions that use CXCR4 as a coreceptor, in addition to R5 virions. This emergence is associated with an increase in disease progression. The reasons for this R5 to X4 switch are poorly understood. The goal of my PhD work was to find new therapeutic strategies that target these coreceptors.

The first part of this work compares the two CXCR4 isoforms as HIV coreceptors. Those two isoforms, CXCR4-A and CXCR4-B, differ by 9 amino acids at their NH₂ terminal extremity as a consequence of an alternative splicing. We have shown that CXCR4-B isoform is more efficient as an HIV coreceptor but that those two variants are equivalent in terms of chemotaxis toward their common ligand CXCL12. Thus, we propose that by targeting specifically the B isoform that supports infection, via siRNA by example, it is possible to limit X4 development while keeping essential functions of this receptor. Our results also suggest that R5 infection increases CXCR4-B / CXCR4-A mRNA ratio in PBMC and that this ratio is in part responsible for R5 to X4 switch. Thus, targeting CXCR4-B isoform could be beneficial.

The second part of this PhD thesis studies the effect on CCR5 coreceptor function of S1P1, another G protein-coupled receptor that enables lymphocytes egress from lymph nodes by chemotaxis toward its ligand S1P that is abundant in blood. We have shown that S1P1 physically interacts with CCR5 and blocks R5 virus entry. On the other hand, S1P1 activates post-entry steps of the viral cycle, in particular gene expression. The resulting effect is an increase in viral production by infected cells *in vitro*. We also showed that the use of FTY720, a S1P1 functional antagonist, decreases dendritic cell infection by R5 viruses *in vitro*, and *in vivo* infection in a SCID mouse model. The emphasis of CCR5 and S1P1 interactions opens new therapeutic strategies.

Keywords: HIV, CCR5, CXCR4, S1P1, GPCR, FTY720.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à vous remercier, Pierre, de m'avoir acceptée dans votre équipe pour réaliser ma thèse. J'ai vraiment eu plaisir à travailler dans ce laboratoire pendant ces 3 années. Je tenais également à vous faire part de ma gratitude pour m'avoir permis d'aller en congrès en Malaisie.

Vincent, je souhaite te remercier pour tout. Etant un « animal à sang froid », tu sais bien que je ne vais pas m'étendre sur le sujet. Mais je tenais à te dire combien j'ai apprécié travailler à tes côtés. Ce fut très agréable, enrichissant, j'ai beaucoup appris. Tu n'as pas réussi à me convertir à tes cures de raisins mais j'ai aimé discuter de tes médecines un peu bizarres pour moi ! Merci également pour ta disponibilité et ta gentillesse, tu as été un super directeur de thèse ! J'espère que l'on gardera contact.

Sandrine, ah Sandrine! Rien que d'écrire ton prénom, j'ai ton rire qui arrive à mes oreilles. Je crois que c'est le son que j'ai le plus entendu lors de ma thèse. Je te remercie pour ta joie, ta bonne humeur et surtout ta gentillesse. Merci également pour ton aide technique, ta disponibilité. Je suis sûr que mes ELISA vont te manquer... Pour ma part, nos discussions vont me manquer.

Merci à toi, Laurence, pour ces trois années passées à tes côtés. J'ai apprécié les heures passées à refaire le monde (le laboratoire...) lorsque nous étions toutes les trois avec Sandrine au bureau. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Clément, merci pour tes précieux conseils et toutes les conversations que nous avons pu avoir. J'ai réellement apprécié nos échanges.

Un petit mot également pour toutes les personnes qui sont venues pour des périodes plus ou moins longues au laboratoire. Vous m'avez tous apporté un petit quelque chose!

Je remercie chaleureusement les membres de mon jury qui ont accepté de lire de mon manuscrit et d'évaluer mon travail.

Un grand merci à l'ANRS qui a financé ma thèse et à toutes les personnes qui ont permis la réalisation de mes deux projets.

Je tenais également à mentionner tous ceux qui m'ont soutenue en dehors du laboratoire. La liste est longue mais je pense en particulier à mes c(h)opines sans qui ces deux dernières années n'auraient pas été aussi joyeuses; même si le lundi matin (et les autres aussi...) étaient en contrepartie un peu difficile...

Merci à vous, mes amis, ma famille qui m'ont apporté soutien, joie, énergie durant toutes ces années. J'ai énormément de chance de vous avoir à mes côtés.

Enfin, une mention spéciale à toi qui te reconnaîtra et qui me supporte au quotidien (tu me connais et sais bien que ce n'est pas ici que je ferai la liste de tout ce que tu peux m'apporter...). Une nouvelle vie commence pour nous !

Merci à tous, ces trois années ont vraiment été riches d'un point de vue professionnel mais surtout personnel.

La vérité de demain se nourrit de l'erreur d'hier,

Antoine de Saint-Exupéry.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des abréviations.....	11
Productions scientifiques liées à la thèse.....	14
Liste des tableaux.....	16
Liste des figures.....	17
Introduction.....	21
A. le virus de l'immunodéficience humaine VIH.....	22
I) Historique :	22
II) Epidémiologie :	22
III) Les différentes phases de l'infection :	23
a. Primo-infection.....	23
b. Phase asymptomatique.....	24
c. Stade SIDA.....	24
IV) Structure du virus :	25
V) Génome :	26
VI) Cycle de réplication :	28
VII) Les récepteurs du VIH-1 :	30
a. Le récepteur CD4.....	30
i. Généralités.....	30
ii. CD4 et VIH.....	31
b. Le récepteur CCR5.....	32
i. Généralités.....	32
ii. CCR5 et VIH.....	32
iii. Ligands de CCR5.....	33
c. Le récepteur CXCR4.....	35
i. Généralités.....	35
ii. Ligands de CXCR4.....	35
iii. Isoformes de CXCR4.....	36
VIII) La commutation de virus R5 vers X4 :	37
a. Tropisme viral.....	37
b. Evaluation du tropisme viral chez les patients VIH.....	38
i. Tests phénotypiques.....	38
ii. Tests génotypiques.....	39

c.	Les causes de la commutation phénotypique R5-X4.....	40
B.	Les récepteurs couplés aux protéines G	42
I)	Les chimiokines :	42
II)	Fonctions des RCPG :	45
III)	Structure des RCPG :	45
IV)	Classes :	46
V)	Stimulation des RCPG :	48
a.	Activation.....	48
b.	Désensibilisation.....	49
VI)	Voies de signalisation des protéines G hétérotrimériques :	51
VII)	Diversité des protéines G hétérotrimériques :	54
a.	Les protéines G _s	54
b.	Les protéines G _{i/o}	54
c.	Les protéines G _q	55
d.	Les protéines G _{12/13}	55
e.	Le dimère G _{βγ}	55
f.	Implications de la diversité des protéines G sur l'étude des RCPG.	56
VIII)	Notion de ligands :	56
IX)	Oligomérisation :	57
a.	Modulation de l'expression membranaire.....	57
b.	Signalisation par les protéines G.....	58
c.	Détection des oligomères.....	59
X)	Oligomérisation des corécepteurs du VIH :	60
a.	Homodimérisation et hétérodimérisation de CCR5 et CXCR4.	60
b.	Hétérodimérisation des corécepteurs avec CCR2.....	61
c.	Hétérodimérisation des corécepteurs avec les récepteurs aux opioïdes. 62	
d.	Hétérodésensibilisation des corécepteurs.....	63
C.	Le récepteur 1 de la sphingosine-1-phosphate S1P1	66
I)	Synthèse et métabolisme de la sphingosine-1-phosphate :	66
II)	Sources de S1P :	68
III)	Export de S1P :	68
IV)	Rôles de S1P :	69
	Les différents récepteurs de la Sphingosine-1-Phosphate :	70
a.	S1P1/EDG1.....	70
b.	S1P2/EDG5.....	73
c.	S1P3/EDG3.....	74

d. S1P4/EDG6.....	74
e. S1P5/EDG8.....	75
V) Les ligands des S1PR :	76
a. Différents agonistes et antagonistes des S1PR.....	76
b. FTY720.....	79
VI) S1PR et migration des cellules du système immunitaire :	81
a. Export des lymphocytes T hors des organes lymphoïdes.....	81
b. Localisation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes.....	83
c. Export des cellules NK des organes lymphoïdes.....	84
d. Migration des autres cellules du système immunitaire.....	85
VII) Hétérodimérisation de S1P1 :	85
Objectifs de la thèse.....	86
Matériels et méthodes.....	88
Projet I : Deux isoformes de CXCR4 confèrent une infectabilité différente par VIH-1 X4: mécanisme, conséquence sur la commutation de R5 vers X4 et preuve de concept d'une stratégie thérapeutique.....	101
A. Introduction	102
B. Résultats	104
I) Expression des deux isoformes de CXCR4 :	104
a. Dans les PBMC humaines.....	104
b. Expression des deux isoformes dans différentes lignées cellulaires....	106
c. Expression des deux isoformes dans une lignée HOS.....	108
II) Différence d'infectabilité entre les lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B :	109
a. Différence d'infectabilité par un virus non répliatif observée pour chacune des deux isoformes.....	109
b. Viabilité.....	112
c. Effet du ligand de CXCR4 sur l'infection des deux lignées HOS.....	114
d. Différence d'infectabilité assurée par les deux isoformes par un virus répliatif.....	115
III) Etape du cycle rétroviral où se joue la différence d'infectabilité :	116
a. Entrée du virus et rétrotranscription selon l'isoforme.....	116
b. Effet des isoformes de CXCR4 sur l'expression génique du promoteur viral. 119	
IV) Etude d'une fonction de récepteurs de chimiokines des deux isoformes de CXCR4 :	120
V) Capacité des deux isoformes de CXCR4 à permettre une commutation de R5 vers X4 :	121
VI) Stratégie d'inhibition de l'isoforme CXCR4-B :	123

VII) Les isoformes CXCR4 dans les PBMC humaines :	126
a. Effet de l'activation et de l'infection sur la proportion des deux isoformes de CXCR4 <i>in vitro</i> .	126
b. Proportions des isoformes de CXCR4 chez les personnes infectées par le VIH.	128
C. Conclusions et perspectives	135
Projet II : Interactions de S1P1 avec le corécepteur CCR5 du VIH et son influence sur l'infection	137
A. Introduction	138
B. Résultats	140
I) Expression de S1P1 :	140
a. Expression de S1P1 dans les cellules lymphocytaires primaires chez l'homme.	140
b. Expression de S1P1 à la surface de lignées cellulaires.	141
II) Inhibition par S1P1 de l'entrée du virus dans les cellules :	142
a. Infection par un virus non répliatif R5.	142
b. Infection par des virus VSV-G ou X4 non répliatifs.	147
III) Effet activateur de S1P1 sur l'infection :	149
a. Infection par un virus répliatif R5.	149
b. Infection par un virus X4 répliatif.	150
c. Effet de S1P1 sur les étapes postérieures à l'entrée du virus.	150
d. Infection de virus à cellules ou de cellules à cellules.	153
IV) Absence d'effet des ligands de S1P1 sur l'infection de cellules HOS et de PBMC :	155
a. Effet de FTY720p sur l'infection de cellules HOS.	155
b. Dans des PBMC.	156
c. Transfection à l'aide de siRNA ciblant S1P1.	157
V) Inhibition de l'infection par FTY720p :	159
a. Dans les cellules dendritiques.	159
b. Dans les souris SCID.	160
C. Conclusions et perspectives	163
Conclusions générales	167
Bibliographie	169
Annexes	204
Annexe 1	205
Annexe 2	208
Annexe 3	234
Annexe 4	278

Liste des abréviations

7TM	7 domaines transmembranaires
A _{2A} R	Récepteur A _{2A} de l'adénosine
ABC	ATP-Binding Cassette
AC	Adénylate cyclase
AGS	Activators of G-protein signaling
AMD3100	1,1'-[1,4-Phénylenebis(méthylène)]-bis[1,4,8,11 tétraazacyclotétradécane]
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AOP-Rantes	Aminoxyptentane-Rantes
AP-2	Clathrin adaptor protein 2
APOBEC3G	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
AR	Récepteur adrénergique
ARF6	ADP-ribosylation factor 6
ATP	Adénosine triphosphate
BRET	Bioluminescence resonance energy transfer
BSA	Bovine serum albumin
CD4	Cluster of differentiation 4
CD69	Cluster of differentiation 69
CDC	Center for Disease Control
CDC42	Cell division control protein 42 homolog
CDR	Complementary determining region
Cellules NK	Cellules natural killer
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
D ₂ R	Récepteur D ₂ de la dopamine
DAG	Diacylglycérol
DARC	Duffy antigen/chemokine receptor
DC-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DUB	Enzyme de déubiquitination
e1	Boucle extracellulaire 1
EDG1	Endothelial differentiation gene 1
EFS	Etablissement français du sang
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FPR	Récepteur aux formyl peptides
FRET	Förster resonance energy transfer
FTY720	2-amino-2-[2-(4-octylphényl)éthyl]propane-1,3-diol
GABA	γ-Aminobutyric acid
GAP	GTPase activating protein
GDI	Guanine dissociation inhibitor
GDP	Guanosine diphosphate

GEF	Guanine exchange factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GRAFS	Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/Taste2, Secretin
GRK	G protein coupled receptor kinase
GTP	Guanosine triphosphate
HDAC	Histone deacétylase
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HTLV	Virus T lymphotrope humain
i1	Boucle intracellulaire 1
IL	Interleukine
IP3	Inositol triphosphate
IUPHAR	International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification
JNK	C Jun N _{term} kinase
KLF2	Krüppel-like factor 2
LPA	Lysophosphatidic acid receptor
LPP	Lipide-phosphate phosphatase
LTA	Acide lipotéichoïque
LTR	Long Terminal Repeat
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MIP-1	Macrophage inflammatory proteins 1
mTOR	Mammalian target of rapamycin
Nef	Negative regulatory factor
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NNY-Rantes	N ^α -nonanoyl-Rantes
PACAP	Pituitary adenylyl cyclase activating peptide
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PHA	Phytohémagglutinine
Pi3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acétate
Protéine G	Guanine nucleotide binding protein
PSC-Rantes	L-Thia-Pro ² , L-α-cyclohexyl-Gly ³ -NNY-Rantes
PTX	Toxine pertussique
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
Récepteur sst _{2A}	Récepteur de la somatostatine
Rev	Regulator of expression of viral proteins
RGS	Regulator of G protein signaling

Rluc	<i>Renilla reniformis</i>
ROCK	Rho-associated protein kinase
S1P	Sphingosine-1-phosphate
S1PR	Récepteur de la sphingosine-1-phosphate
SamHD1	SAM domain and HD domain-containing protein 1
Score FPR	False positive rate
SDF-1	Stromal cell-derived factor-1
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SphK	Sphingosine kinase
Spns2	Spinster homolog 2
SPP	S1P phosphatase
SVF	Sérum de veau foetal
Tat	Transactivator of transcription
TBX21	T-box transcription factor
TLR2	Toll-like receptor 2
TNF α	Tumor necrosis factor
Tr-FRET	FRET en temps résolu
TTT	Toulouse tropism test
UDS	Ultra-deep pyrosequencing
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vif	Viral infectivity factor
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VIP	Vasoactive intestinal peptide
Vpr	Viral protein R
Vpu	Viral protein U

Productions scientifiques liées à la thèse

Articles :

- « The two human CXCR4 isoforms display different HIV receptor activities: consequences for the emergence of X4 strains ». C Duquenne, C Psomas, S Gimenez, Mj Carles, C Barbuat, Jp Lavigne, A Sotto, J Reynes, P Guglielmi, C Mettling, V François, P Corbeau. *Article soumis*. [Annexe 2]
- « The S1P1 receptor interacts with CCR5 and enhances HIV-1 infection. Anti-HIV effect of the S1P1 functional antagonist FTY720 ». C Duquenne, S Gimenez, D Maurel, N Campos, A Guigues, E Doumazane, L Comps-Agrar, J Tazi, L Prézeau, P Corbeau, V François. *Article soumis*. [Annexe 3]

Brevet :

- « S1P receptor agonists and use thereof in treating HIV infections ». V François, P Corbeau, C Duquenne. 2012, Pub. N° WO/2012/080641, International Application N° PCT/FR2011/052948. [Annexe 4]

Communications orales :

- « Interactions of G protein coupled receptor S1P1 with HIV coreceptor CCR5 and its influence on infection ». C Duquenne, S Gimenez, P Corbeau & V François. Retraite IGH (Mai 2012, Saint Tropez).

Communication affichées :

- « HIV-1 R5 infection favors the expression of the CXCR4 isoform that is the most efficient as a coreceptor: implications for the emergence of CXCR4-using strains ». C Duquenne, S Gimenez, C Psomas, C Mettling, V François & P Corbeau. IAS conference on HIV pathogenesis treatment and prevention (Juillet 2013, Kuala Lumpur, Malaisie)
- « HIV-1 R5 infection favors the expression of the CXCR4 isoform that is the most efficient as a coreceptor: implications for the emergence of CXCR4-using strains ». C Duquenne, S Gimenez, C Psomas, C Mettling, V François & P Corbeau. Journées CBS2 (Mai 2013, Montpellier)

- « HIV-1 coreceptor function of two isoforms of CXCR4 ». C Duquenne, V François, C Mettling, S Gimenez & P Corbeau. Montpellier Infectious Diseases (Novembre 2012, Montpellier)
- « Interactions of the S1P1 receptor with CCR5 and its effects on HIV infection ». C Duquenne, S Gimenez, P Corbeau & V François. Montpellier Infectious Diseases (Novembre 2012, Montpellier)
- « HIV-1 coreceptor function of two isoforms of CXCR4 ». C Duquenne, V François, C Mettling, S Gimenez & P Corbeau Journées de l'IGH (Novembre 2012, Montpellier)
- « Interactions de S1P1, récepteur couplé aux protéines G, avec le co-récepteur CCR5 du VIH et son influence sur l'infection ». C Duquenne, P Corbeau & V François. Université des jeunes chercheurs de SIDACTION (Octobre 2011, Carry le Rouet).

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les chimiokines et leurs récepteurs	44
Tableau 2 : Hétérodimérisation de CCR5 et CXCR4 avec d'autres RCPG	63
Tableau 3 : Hétérodésensibilisation de CCR5 et CXCR4 avec d'autres RCPG.....	64
Tableau 4 : Récapitulatif des caractéristiques des différents S1PR.....	76
Tableau 5 : Agonistes et antagonistes des S1PR.....	78
Tableau 6 : Quantification de la production virale par le dosage de la protéine p24 dans le surnageant.	126
Tableau 7 : Proportion des ARNm des deux isoformes de CXCR4 dans les PBMC de donneurs sains et de personnes infectées par le VIH.	128

Liste des figures

Figure 1 : Différentes phases de l'infection par le VIH.....	23
Figure 2 : Structure du VIH-1.....	26
Figure 3 : Organisation génomique du VIH-1.....	28
Figure 4 : Cycle de réplication du VIH-1	28
Figure 5 : Entrée du virus dans la cellule.....	30
Figure 6 : Structure des deux isoformes d'ARN CXCR4.....	37
Figure 7 : Représentation schématique des séquences des deux isoformes de CXCR4	37
Figure 8 : Structures linéaire et en tonneau d'un RCPG	46
Figure 9 : Classification des RCPG	48
Figure 10 : Désensibilisation homologue des RCPG.....	51
Figure 11 : Cycle des protéines G	53
Figure 12 : Schéma de synthèse de la sphingosine-1-phosphate.....	67
Figure 13 : Fonctions de S1P en tant que messenger secondaire et ligand des S1PR.....	70
Figure 14 : Cascade de signalisation de S1P1	71
Figure 15 : Rôles majeurs de S1P1.....	72
Figure 16 : Modulation de l'expression de S1P1 par ses ligands	80
Figure 17 : sortie des lymphocytes des organes lymphoïdes.....	83
Figure 18 : Modulation de l'expression de S1P1 dans les cellules B de la zone marginale ...	84
Figure 19 : Amplification des isoformes CXCR4-A et CXCR4-B par les couples A et B.	105
Figure 20 : Quantification de l'ARNm de CXCR4 (CXCR4-A + CXCR4-B) dans les PBMC de donneurs sains.....	106
Figure 21 : ARNm de CXCR4-B dans différentes lignées cellulaires.....	107
Figure 22 : Ratio des ARNm CXCR4-B / CXCR4-A dans différentes lignées cellulaires.	107
Figure 23 : Expression à la membrane cellulaire des isoformes de CXCR4 dans des cellules HOS transduites.....	108
Figure 24 : Infection des lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B par un virus X4 non répliquatif.	109

Figure 25 : Infection des lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B par un virus R5 non répliquatif.	110
Figure 26 : Expression à la membrane cellulaire des isoformes de CXCR4 dans des lignées HEK 293T CD4+ transduites.....	111
Figure 27 : Infection des lignées 293T CD4 ⁺ CXCR4-A et 293T CD4 ⁺ CXCR4-B par un virus X4 non répliquatif.	112
Figure 28 : Infection des lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B par un virus X4 non répliquatif.	113
Figure 29 : Viabilité des HOS CXCR4-A et des HOS CXCR4-B infectées par X4Luc.	113
Figure 30 : Effet de CXCL12 sur l'infection par un virus X4 non répliquatif.....	114
Figure 31 : Infection des HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B par un virus X4 répliquatif.	115
Figure 32 : Infection des HOS CXCR4-A et des HOS CXCR4-B par un virus R5 répliquatif.	116
Figure 33 : Infection des lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B par 100 ng de virus HIV-X4.	117
Figure 34 : Evaluation des rétrotranscrits viraux précoces et tardifs.....	118
Figure 35 : Expression à la membrane cellulaire des isoformes de CXCR4 dans des HeLa-LTR-Luc transduites.	119
Figure 36 : Effet de la liaison de CXCL12 à chacune des isoformes de CXCR4 sur l'activation de la LTR.....	120
Figure 37 : Effet de CXCL12 sur le chimiotactisme de CXCR4-A et CXCR4-B.	121
Figure 38 : Commutation de R5 vers X4.....	122
Figure 39 : Expression membranaire de CXCR4 après transfection de siRNA ciblant CXCR4-B.	124
Figure 40 : Expression des ARNm des isoformes de CXCR4 après transfection de siRNA ciblant CXCR4-B.	124
Figure 41 : Effet de l'inhibition d'expression de CXCR4-B sur l'infectabilité d'un virus répliquatif HIV-X4.	125
Figure 42 : Expression des isoformes CXCR4 dans des PBMC infectées ou non par un virus R5 ou X4.	127
Figure 43 : Quantités relatives des ARNm des isoformes de CXCR4.	129
Figure 44 : ARNm des isoformes de CXCR4 en fonction du taux de T4 chez des personnes infectées par le VIH.	130
Figure 45 : ARNm des isoformes de CXCR4 en fonction du pourcentage de T4 chez des personnes infectées par le VIH.....	131

Figure 46 : ARNm des isoformes de CXCR4 en fonction du rapport T4/T8 chez des personnes infectées par le VIH.....	132
Figure 47 : ARNm des isoformes de CXCR4 en fonction de la virémie chez des personnes infectées par le VIH.	133
Figure 48 : ARNm des isoformes de CXCR4 en fonction du score FPR chez des personnes infectées par le VIH.	134
Figure 49 : Expression de S1P1 à la surface des cellules primaires.	140
Figure 50 : Expression membranaire de S1P1 et CCR5 dans les cellules HOS transduites.	142
Figure 51 : Mesure de l'infectabilité des lignées HOS CCR5 LacZ et HOS CCR5 S1P1 par un virus non répliquatif R5-Luc.	143
Figure 52 : Expression membranaire de CCR5 et S1P1 dans les cellules HEK 293T CD4 ⁺ transduites.....	144
Figure 53 : Infection des lignées 293T CD4 LacZ et 293T CD4 S1P1 par un virus non répliquatif R5-Luc.	145
Figure 54 : Viabilité des HOS CCR5 S1P1 et HOS CCR5 LacZ infectées par un virus non répliquatif R5-Luc.	146
Figure 55 : Infection des lignées HOS CCR5 LacZ et HOS CCR5 S1P1 par un virus non répliquatif R5.	146
Figure 56 : Infection des lignées HOS S1P1 et HOS LacZ par un virus non répliquatif pseudotypé par VSV-G.	147
Figure 57 : Infection des lignées HOS S1P1 et HOS LacZ par un virus X4-Luc.....	148
Figure 58 : Infection des lignées HOS CCR5 LacZ et HOS CCR5 S1P1 par un virus HIV-R5 répliquatif.	149
Figure 59 : Infection des lignées HOS S1P1 et HOS LacZ par un virus X4 répliquatif.....	150
Figure 60 : Transduction d'une lignée HOS par pHIV-S1P1 ou pHIV-LacZ puis infection 24h après transduction par un virus R5 non répliquatif.	151
Figure 61 : Expression de S1P1 à la surface des HeLa-LTR-Luc transduites.	152
Figure 62 : Effet de la transduction de HeLa-LTR-Luc de S1P1 sur la transcription.....	152
Figure 63 : Quantification de l'ARN viral suite à l'infection des cellules HOS S1P1 et HOS LacZ par un virus répliquatif HIV-R5.	154
Figure 64 : Infection de cellules HOS S1P1 et HOS LacZ par des cellules MOLT chroniquement infectées.....	155
Figure 65 : Effet des ligands de S1P1 sur l'infection de PBMC par un virus répliquatif HIV-R5.	156

Figure 66 : Expression membranaire de S1P1 après transfection de la lignée HOS CCR5 S1P1 par siRNA.....	157
Figure 67 : Infection des cellules transfectées par siRNA ciblant S1P1 par un virus non répliatif R5.....	158
Figure 68 : Infection des cellules transfectées par siRNA ciblant S1P1 par un virus répliatif HIV-R5.....	158
Figure 69 : Infection des THP-1 différenciées en présence ou non de VLP-vpx.....	159
Figure 70 : Infection de cellules dendritiques infectées avec un virus répliatif HIV-R5 et préincubées avec du FTY720p.....	160
Figure 71 : Effet de FTY720 sur l'infection <i>in vivo</i> de souris SCID humanisées par un virus répliatif HIV-R5.....	161
Figure 72 : Effet de l'expression de S1P1 sur le cycle viral du VIH.....	163

Introduction

A. le virus de l'immunodéficience humaine VIH

I) Historique :

Les premiers cas de syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) chez l'homme ont été découverts en 1981 aux Etats-Unis. En effet, le CDC¹ à Atlanta informe en Juin d'une recrudescence de cas de pneumonies à *Pneumocystis jirovecii* et de sarcomes de Kaposi, deux maladies très rares (CDC 1981). Les premiers malades sont homosexuels et possèdent tous un très faible taux de lymphocytes T CD4. D'autres personnes développent ensuite les mêmes pathologies : des héroïnomanes, des Haïtiens et des hémophiles transfusés, ce qui laisse supposer que l'agent infectieux responsable est un agent pathogène transmissible par le sang et les relations sexuelles (Piot, Quinn et al. 1984). En décembre 1982, 21 cas de SIDA sont identifiés en France. En mai 1983, l'équipe de Luc Montagnier à l'institut Pasteur de Paris démontre qu'il s'agit d'un rétrovirus qui prendra le nom, trois ans plus tard, de virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983).

Le VIH appartient à la sous-famille des lentivirus caractérisés par une longue période d'incubation et un effet cytopathogène. Il existe deux sous-types de VIH : le VIH-1 qui est prédominant et le VIH-2 qui est présent surtout en Afrique de l'Ouest (Clavel, Guetard et al. 1986).

II) Epidémiologie :

Dans le monde, environ 34 millions de personnes [31.4 à 35.9 millions] vivent aujourd'hui avec le VIH, dont près de 50% connaissent leur statut sérologique. A l'échelle mondiale, on compte 2.5 millions de nouvelles infections par le VIH et 1.7 millions de décès en 2011 (rapport ONUSIDA, 2012). Le SIDA est la seconde maladie infectieuse la plus mortelle, derrière les infections respiratoires comme la pneumonie, avec environ 5500 morts et 7400 nouvelles infections par jour dont plus de 95% des cas sont développées dans les pays à ressources limitées. Le nombre

¹ Center for Disease Control.

de patients infectés en France est estimé à 152 000 (Brun-Vezinet et Charpentier 2013).

III) Les différentes phases de l'infection :

On dénombre trois phases lors de l'évolution de l'infection par le VIH : la primo-infection, une phase de latence clinique et enfin le stade SIDA, symptomatique [Figure 1].

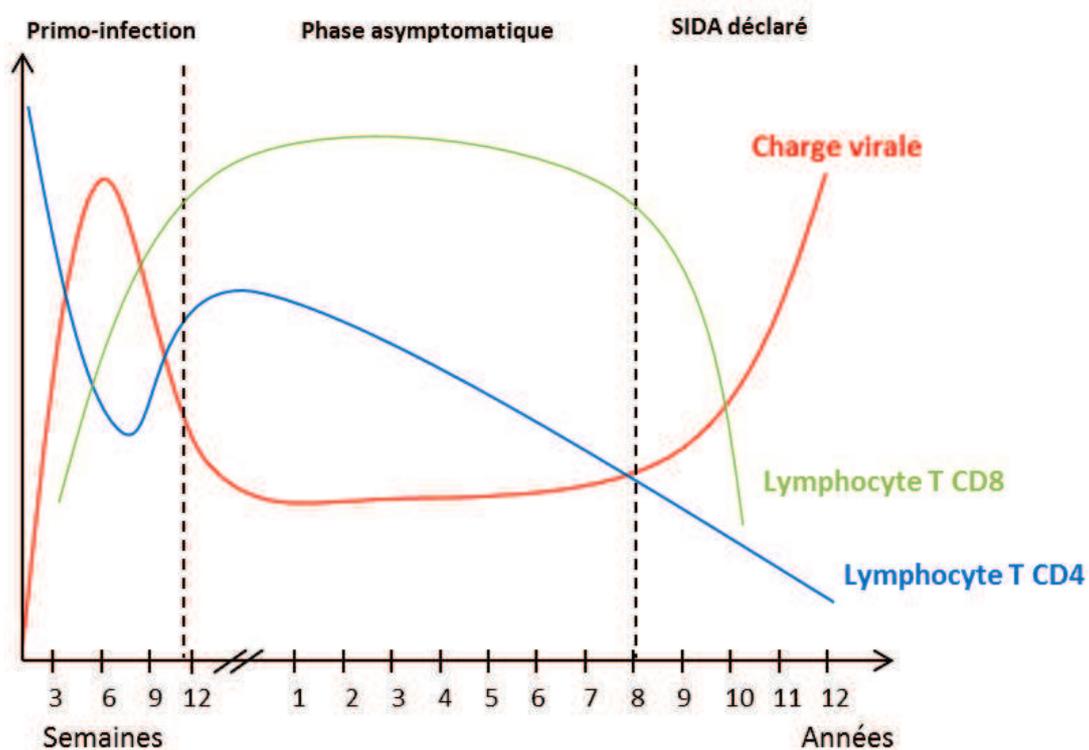


Figure 1 : Différentes phases de l'infection par le VIH

Evolution de la charge virale (en rouge), du nombre de lymphocytes T CD4 (en bleu) et du nombre de lymphocytes T CD8 (en vert) dans les différentes phases de l'infection par le VIH (primo-infection, phase asymptomatique et stade SIDA)

a. Primo-infection.

Lors de la première phase de l'infection, on observe une forte réplication virale avec un nombre de virions dans l'organisme pouvant atteindre 10^7 copies/ml de plasma. Les organes lymphoïdes secondaires sont les sites majeurs de production de virus et

le taux de lymphocytes T CD4 diminue alors fortement (Levy 1993). Cette primo-infection peut passer inaperçue. Cependant, chez 50% à 90% des sujets infectés, des symptômes grippaux apparaissent 3 à 6 semaines après l'infection. Celle-ci est ensuite plus ou moins contrôlée par les lymphocytes T CD8 cytotoxiques et une réponse humorale constituée d'anticorps spécifiques des protéines du VIH est également détectée (Safrit 1995; Lackner, Lederman et al. 2012). Cette réponse immunitaire provoque alors une diminution de la charge virale plasmatique et une augmentation du taux de lymphocytes T CD4 circulants, sans pouvoir totalement éradiquer le virus (Levy 1993).

b. Phase asymptomatique.

Sous contrôle partiel du système immunitaire, le virus se multiplie dans les organes lymphoïdes et reste à un niveau de production constant d'environ 10^{10} virions/jour (Perelson, Neumann et al. 1996). Durant cette phase asymptomatique, le taux de lymphocytes T CD4 diminue lentement jusqu'à un niveau très faible, supérieur à 200 lymphocytes T CD4/mm³ de plasma, et une altération progressive des fonctions immunitaires est alors observée (Weber 2001). Cette phase asymptomatique dure en moyenne 10 ans.

Chez les patients « progressseurs rapides », cette phase est beaucoup plus courte, entre 2 et 3 ans, alors que chez les progressseurs lents, elle peut durer beaucoup plus longtemps. Ces « asymptomatiques à long terme » maintiennent sans antviraux un nombre de lymphocytes T CD4 élevé et représentent environ 5% des patients (Cao, Qin et al. 1995; Pantaleo, Menzo et al. 1995).

c. Stade SIDA.

Lors de la dernière phase de l'infection, on observe une ascension de la virémie et une forte diminution du taux de lymphocytes T CD4 atteignant un niveau inférieur à 200/mm³ (Levy 1993). La vitesse de destruction des cellules T CD4 est directement liée à la quantité de virus détectée dans le plasma (Weber 2001). Le patient est alors

immunodéprimé laissant la place aux maladies opportunistes et aux tumeurs entraînant, à terme, le décès de l'individu.

Il existe cependant chez environ 1 personne infectée sur 1000, des « élites contrôleurs » qui, sans traitement antiviral, n'ont pas de charge virale détectable (< 50 copies/ml) et qui possèdent généralement un taux de lymphocytes T CD4 relativement constant (Grabar, Selinger-Leneman et al. 2009).

IV) Structure du virus :

Le VIH-1 a un diamètre de 110 à 160 nm (Briggs, Wilk et al. 2003; Zhu, Liu et al. 2006). Son enveloppe est composée d'une bicouche lipidique provenant de la membrane de la cellule infectée dont il est issu. Dans cette bicouche sont insérées des glycoprotéines sous forme de trimères. Elles sont composées de deux sous-unités : les glycoprotéines de surface très glycosylées gp120 permettant la liaison du virus avec le récepteur CD4 et les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 de la cellule cible, et les glycoprotéines transmembranaires gp41 permettant la fusion de l'enveloppe avec la membrane cellulaire. Chaque gp120 est liée de façon non covalente à l'une des trois gp41 (Wyatt et Sodroski 1998; Hartley, Klasse et al. 2005). Ces glycoprotéines sont formées par le clivage post-traductionnel d'un précurseur, la gp160, par une protéase cellulaire; la partie N terminale donnant la gp120 et la partie C terminale générant la gp41 (Berger, Murphy et al. 1999; Gomez et Hope 2005). La face interne de l'enveloppe virale est recouverte par la matrice virale (protéine p17) puis se trouve la capsid (p24) en forme de cône (Briggs, Wilk et al. 2003). Ce « core » viral contient le génome viral composé de deux brins identiques d'ARN viral de polarité positive ainsi que les enzymes nécessaires à la réplication virale: la transcriptase inverse (p64), l'intégrase (p32) et la protéase (p10) [Figure 2].

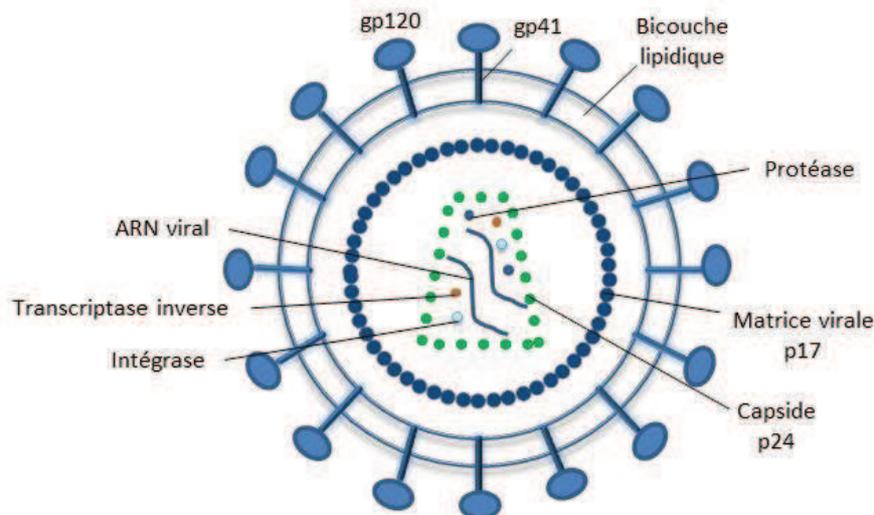


Figure 2 : Structure du VIH-1

Le VIH-1 se compose de deux brins identiques d'ARN et des enzymes nécessaires à la réplication virale, entourés d'une capside, elle-même enfermée par une matrice virale, le tout protégé par une bicouche lipidique où sont insérées les glycoprotéines d'enveloppe.

V) Génome :

La première séquence complète du VIH a été découverte en 1985 (Ratner, Haseltine et al. 1985). Le génome du VIH contient environ 9700 nucléotides et est composé de neuf gènes différents. Trois sont communs à tous les rétrovirus : *gag* qui code pour les protéines structurales du core viral (la matrice, la capside, la nucléocapside et la protéine p6), *pol* qui code pour les enzymes de réplication virales (la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase) et *env* qui code pour les glycoprotéines d'enveloppe (la gp160 donnant la gp41 transmembranaire et la gp120 de surface) [Figure 3]. Les autres gènes codent pour les protéines de régulation (Tat et Rev) et pour les protéines accessoires (Vpr, Nef, Vif et Vpu). Ces protéines sont responsables de l'organisation du cycle viral (Levy 1993; Bour, Geleziunas et al. 1995; Frankel et Young 1998; Freed 2001):

- Tat (transactivator of transcription) active fortement la transcription de l'ADN proviral. Cette petite protéine modifie notamment la structure de la chromatine pour agir sur l'étape de transcription.

- Rev (regulator of expression of viral proteins) favorise le transport des ARN viraux du noyau vers le cytoplasme.
- Vpr (viral protein R) est lié à l'arrêt des cycles cellulaires en G2 favorisant la réplication virale, à l'importation du complexe de pré-intégration au noyau des cellules infectées et active faiblement la transcription de l'ADN proviral.
- Nef (negative regulatory factor) augmente la réplication virale, diminue l'expression à la surface cellulaire de CD4 et des molécules de classe 1 du complexe majeur d'histocompatibilité protégeant ainsi les cellules infectées contre la lyse par les cellules T CD8 cytotoxiques, et permet l'export des particules virales.
- Vif (viral infectivity factor) est responsable du pouvoir infectieux de la particule virale. Il entraîne notamment la dégradation par le protéasome du facteur de restriction cellulaire APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G), qui est une cytidine déaminase possédant une forte activité antivirale.
- Vpu (viral protein U) entraîne la dégradation des molécules de CD4 nouvellement synthétisées qui retiennent les glycoprotéines d'enveloppe gp160 dans le réticulum endoplasmique, permettant le transport de ces glycoprotéines d'enveloppe à la surface cellulaire pour l'assemblage en particules virales. Il favorise également le relargage des virions nouvellement formés. Vpu inhibe notamment l'effet antiviral du facteur de restriction cellulaire Tetherin en provoquant sa dégradation.

Le génome viral est encadré par des séquences LTR (Long Terminal Repeat) qui permettent l'intégration du provirus dans le génome de la cellule-hôte et la production de nouveaux virions. Les LTR sont des régions non codantes, qui contrôlent l'initiation et la régulation de la transcription du génome. En effet, le 5' LTR est un promoteur de la transcription et le 3' LTR assure la polyadénylation. Chaque LTR est constituée des régions unique 3 (U3), de répétition (R) et unique 5 (U5).

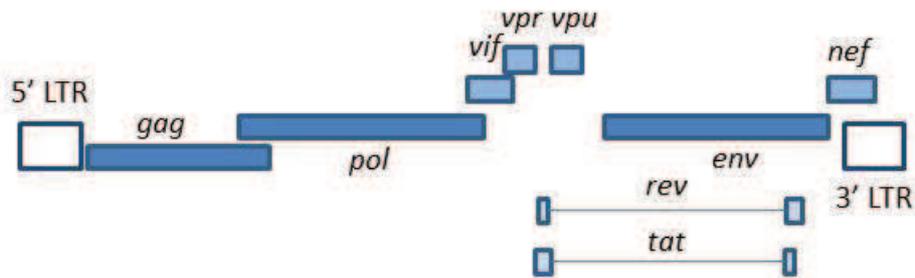


Figure 3 : Organisation génomique du VIH-1

Le génome du VIH est composé de trois gènes principaux (*gag*, *pol*, *env*), de gènes de régulation (*tat*, *rev*), de gènes codant pour les protéines accessoires (*vpr*, *nef*, *vif*, *vpu*) et est encadré par les séquences LTR.

VI) Cycle de réplication :

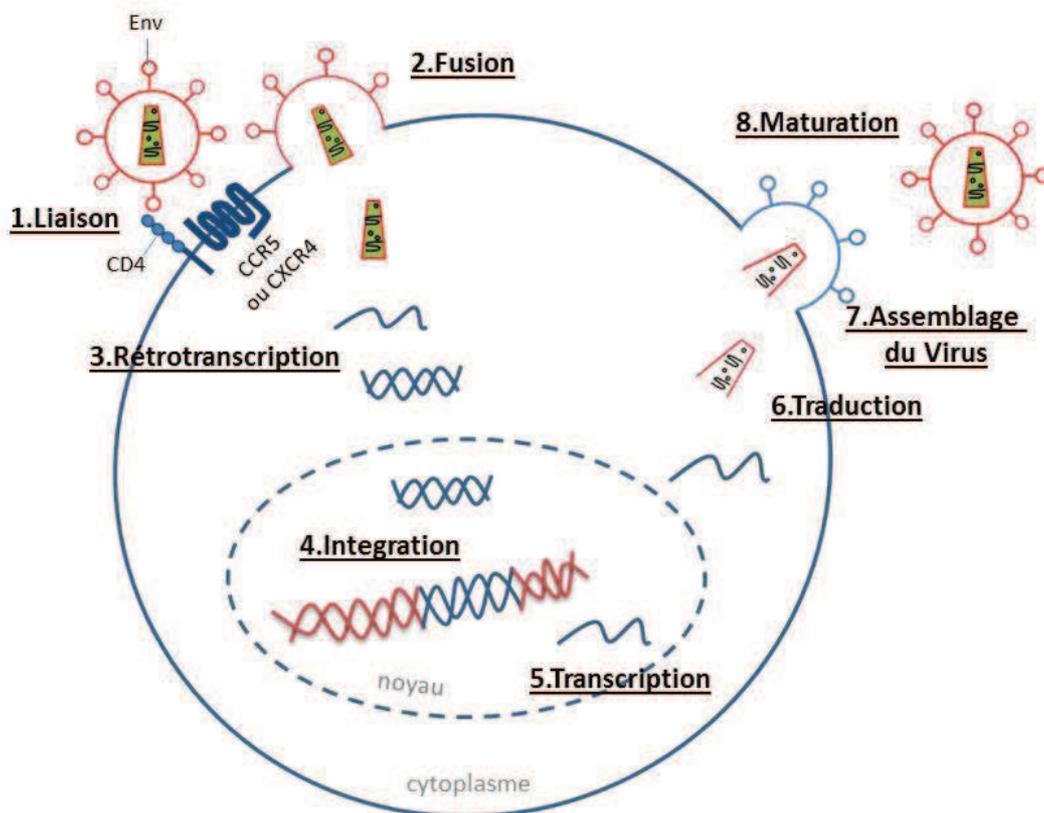


Figure 4 : Cycle de réplication du VIH-1

Le cycle de réplication du VIH commence par la fixation du virus à la cellule via un couple récepteur-corécepteur entraînant l'entrée du virus dans la cellule. L'ARN viral est rétrotranscrit en ADN double brin qui est ensuite importé dans le noyau. L'ADN proviral est alors intégré dans l'ADN cellulaire puis est transcrit en ARNm et traduit en protéines virales. Celles-ci vont s'assembler pour former une particule virale par bourgeonnement de la membrane plasmique.

Le cycle de réplication virale est constitué de deux phases : les étapes précoces qui débutent à la liaison du virus à la membrane de la cellule-hôte jusqu'à l'import du complexe de pré-intégration dans le noyau, et les étapes tardives qui commencent par l'intégration de l'ADN viral dans l'ADN de la cellule-hôte et se terminent à la maturation et l'export du virion [Figure 4].

La particule virale se fixe tout d'abord à la membrane de la cellule-hôte par l'interaction de la glycoprotéine de surface gp120 sur le récepteur CD4. La gp120 se compose de 5 régions conservées (C1 – C5) et de 5 régions hypervariables (V1 – V5) ; la liaison à CD4 se faisant au niveau des domaines conservés C2 à C4 de la gp120 (Levy 1993; Bour, Geleziunas et al. 1995; Freed 2001). La fixation induit un changement conformationnel qui permet l'interaction de la gp120, notamment via ses domaines V1/V2 et V3, avec les corécepteurs CCR5 ou CXCR4 selon le tropisme viral déterminé par la boucle V3 de la gp120 (Freed 2001; Hartley, Klasse et al. 2005; Wilen, Tilton et al. 2012). Il y a alors un réarrangement structural d'une partie de la gp41 entraînant la fusion de la particule virale avec la cellule-hôte, ce qui permet l'entrée du virus dans la cellule (Berger, Murphy et al. 1999) [Figure 5]. La particule est ensuite décapsidée libérant le matériel génétique viral dans le cytoplasme de la cellule. La transcriptase inverse permet alors la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN double brin. La dernière étape précoce est l'import nucléaire du complexe de pré-intégration grâce à des filaments d'actine.

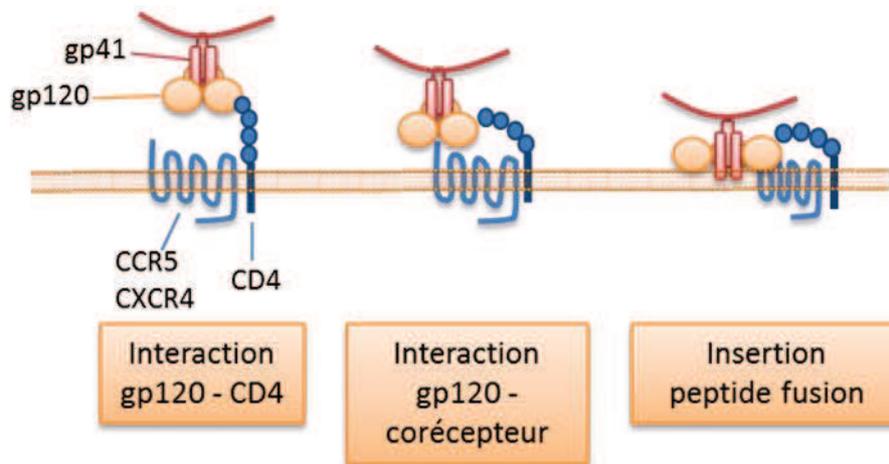


Figure 5 : Entrée du virus dans la cellule

La glycoprotéine virale gp120 se lie au récepteur CD4 entraînant l'interaction entre la gp120 et le corécepteur, CCR5 ou CXCR4. Il y a ensuite un changement conformationnel entraînant l'insertion du peptide fusion dans la membrane et la fusion de la particule virale avec la cellule-hôte.

Il y a ensuite une étape d'intégration aléatoire dans l'ADN de la cellule-hôte catalysée par l'intégrase (Levy 1993; Freed 2001). Le VIH peut persister intégré de manière latente pendant plusieurs années. Par réactivation de la cellule-hôte, l'ADN est transcrit en ARNm. L'ARN viral migre ensuite en dehors du noyau puis est traduit en protéines virales dans le cytoplasme. Après modifications post-traductionnelles des protéines virales par la protéase, il y a l'assemblage de tous les éléments viraux à la membrane cellulaire en nouveau virion. Enfin, le bourgeonnement permet le relargage du virion qui utilise la bicouche lipidique de la cellule-hôte pour former son enveloppe. La maturation permet un changement structural du virion qui devient alors infectieux (Frankel et Young 1998).

VII) Les récepteurs du VIH-1 :

- a. Le récepteur CD4.
 - i. Généralités

Le récepteur CD4 (cluster of differentiation 4) est une glycoprotéine transmembranaire d'environ 55 kDa de la superfamille des immunoglobulines, impliquée dans les phénomènes de reconnaissance, de liaison et d'adhésion des

cellules (Bour, Geleziunas et al. 1995; Bowers, Pitcher et al. 1997). Son rôle est d'assister l'interaction des récepteurs des lymphocytes T avec le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II) des cellules présentatrices d'antigène. La molécule CD4 est formée de trois régions : une partie cytoplasmique, une partie transmembranaire et une partie extracellulaire. Cette dernière est composée de 4 domaines immunoglobulines (D1 à D4). Le domaine D1 est composé de 3 sous-régions CDR (CDR1 à CDR3) (complementary determining region). Le domaine CDR2 (notamment grâce à une phénylalanine en position 43) permet l'interaction avec les domaines C3 et C4 de la gp120 (Maddon, Molineaux et al. 1987; Levy 1993; Bour, Geleziunas et al. 1995).

ii. CD4 et VIH

En 1984, la protéine CD4 est identifiée comme étant le principal récepteur du VIH (Dalgleish, Beverley et al. 1984; Klatzmann, Champagne et al. 1984; McDougal, Mawle et al. 1985; Sattentau et Weiss 1988; Levy 1993). Le virus infecte donc les cellules possédant ce récepteur à leur surface : principalement les lymphocytes T CD4 (plus de 90% des cellules infectées), les monocytes/macrophages (entre 5 et 7%) et les cellules microgliales du système nerveux (Dalgleish, Beverley et al. 1984; Klatzmann, Champagne et al. 1984). Les cellules dendritiques sont également infectées mais elles ne produisent pas de virions ; elles assurent le transport et la transmission du virus aux autres cellules (Geijtenbeek, Kwon et al. 2000; Steinman 2000). En effet, dans ces cellules, le cycle de réplication est incomplet car il n'y a pas de transcription inverse de l'ARN viral du fait de l'expression du facteur de restriction SamHD1 (SAM domain and HD domain-containing protein 1) (Laguet, Sobhian et al. 2011). Les virions se fixent aux cellules dendritiques via des lectines de surface comme DC-SIGN (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin), ce qui entraîne l'endocytose des virions. Les cellules dendritiques migrent alors vers les organes lymphoïdes secondaires et, par interaction avec les cellules T, les virus ainsi internalisés sont transmis à d'autres cellules T (Wilen, Tilton et al. 2012).

L'interaction de CD4 avec la gp120 n'est pas suffisante à l'entrée du VIH-1, il faut la présence de corécepteurs qui sont, *in vivo*, CCR5 ou CXCR4 (Alkhatib, Combadiere et al. 1996; Choe, Farzan et al. 1996; Deng, Liu et al. 1996; Feng, Broder et al. 1996). La spécificité du virus à utiliser l'un des corécepteurs est appelée tropisme : tropisme R5 ou X4. Les virus à double tropisme R5X4 peuvent utiliser les deux corécepteurs (Berger, Murphy et al. 1999).

b. Le récepteur CCR5.

i. Généralités

CCR5 fait partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) activés par les β -chimiokines de 352 acides aminés et présente un poids moléculaire d'environ 40 kDa. CCR5 est exprimé à la surface de plusieurs cellules immunitaires comme les lymphocytes T et B, les macrophages et les cellules dendritiques (Wu, Paxton et al. 1997; Oppermann 2004; Sorce, Myburgh et al. 2011). Il est également exprimé à la surface de cellules du système nerveux central comme les astrocytes, les cellules microgliales qui appartiennent à la lignée macrophagique et les neurones (He, Chen et al. 1997; Murphy, Baggiolini et al. 2000; Mueller et Strange 2004). Son rôle physiologique principal est le recrutement de cellules effectrices aux sites d'inflammation. CCR5 est également le principal corécepteur utilisé par le VIH.

ii. CCR5 et VIH

CCR5 est une protéine dont le rôle est majeur lors de l'infection par le VIH. En effet, les individus homozygotes pour une mutation codant pour une forme tronquée de cette protéine, la mutation $\Delta 32$, sont résistants à l'infection par les virus R5 (Liu, Paxton et al. 1996; Corbeau et Reynes 2009). Cette délétion de 32 paires de bases dans la région codante pour la seconde boucle extracellulaire de CCR5 engendre un codon stop prématuré et induit une protéine tronquée non exprimée à la surface cellulaire (Berger, Murphy et al. 1999). Les individus homozygotes pour cette délétion représentent 1 à 2% de la population caucasienne et ne présentent pas de phénotype particulier ; les individus hétérozygotes en représentent 10 à 20% (Libert,

Cochaux et al. 1998). L'hétérozygotie pour cette mutation ne protège pas contre le VIH mais est associée à une diminution plus lente du taux de CD4 (Liu, Paxton et al. 1996; Wu, Paxton et al. 1997; Weber 2001). Le « patient de Berlin » semblait être la preuve du rôle critique de CCR5 dans l'infection par le VIH. En effet, ce patient atteint d'une leucémie et infecté par le VIH a reçu une greffe de moelle osseuse d'un donneur homozygote $\Delta 32$ en 2007 et a depuis ce jour une charge virale indétectable (Hutter, Nowak et al. 2009). Cependant, deux autres patients, les « patients de Boston », qui ont reçu une transplantation de cellules souches de donneurs CCR5⁺ pour le traitement de lymphomes semblent contrôler le virus sans traitement (Henrich 2013; Henrich, Hu et al. 2013). Ceci laisse supposer que ce n'est pas la particularité des cellules greffées (CCR5 $\Delta 32$ homozygotes) qui permet une possible guérison mais la greffe en elle-même.

Dans notre laboratoire, il a été établi que la densité de CCR5 sur les lymphocytes T CD4 est stable au cours du temps pour un individu donné (Reynes, Portales et al. 2000). D'autre part, l'équipe a montré que dans le cas d'une infection par le VIH, la densité de CCR5 à la surface des lymphocytes est corrélée à l'infectabilité (Lin, Mettling et al. 2002), à la charge virale (Reynes, Portales et al. 2000; Portales, Clot et al. 2001), au rebond viral après arrêt thérapeutique (Reynes, Baillat et al. 2004), à la progression de la maladie (Reynes, Portales et al. 2001; Gervaix, Nicolas et al. 2002) et à la réponse au traitement antirétroviral (Gervaix, Nicolas et al. 2002).

iii. Ligands de CCR5

Les principaux ligands naturels de CCR5 sont CCL5 (ou RANTES « regulated on activation, normal T cell expressed and secreted »), CCL3 et CCL4 (ou MIP-1 α et MIP-1 β « macrophage inflammatory proteins 1 ») ; CCL4 étant le ligand le plus spécifique de CCR5 (Raport, Gosling et al. 1996). MCP-2 (monocyte chemoattractant protein 2) a également été décrit comme étant un ligand de CCR5 pouvant inhiber l'infection par le VIH-1 (Ruffing, Sullivan et al. 1998). Ces ligands sont des chimiokines responsables du chimiotactisme des leucocytes. La liaison de ces ligands se fait essentiellement sur la deuxième boucle extracellulaire du récepteur de

chimiokines (Samson, LaRosa et al. 1997; Wu, LaRosa et al. 1997; Ruffing, Sullivan et al. 1998).

De nombreux dérivés de CCL5 ont été obtenus par modification de sa partie N terminale. C'est le cas notamment de NNY- (N^α-nonanoyl), AOP- (aminooxypentane) et PSC- (L-Thia-Pro², L- α -cyclohexyl-Gly³-NNY) Rantes qui, tout comme leur analogue endogène, induisent l'internalisation du récepteur. Ils ont une activité antivirale plus forte que CCL5 car ils inhibent le recyclage à la membrane plasmique de CCR5 (Mack, Luckow et al. 1998; Pastore, Picchio et al. 2003). Ainsi, les agonistes de CCR5 inhibent l'infection par le VIH *in vitro* par deux mécanismes : par encombrement stérique en empêchant la liaison de la gp120 sur le corécepteur et en diminuant la quantité de CCR5 exprimé à la surface des cellules par internalisation (Alkhatib, Locati et al. 1997).

La conformation du corécepteur est très importante dans le cas de l'infection par le VIH. En effet, il existe différentes conformations de CCR5 à la surface des cellules, notamment selon que le récepteur est lié à une protéine G ou non. Les ligands naturels de CCR5 ont une forte affinité pour le récepteur CCR5 lié aux protéines G et une plus faible affinité envers le récepteur non lié. Cette distinction n'est pas retrouvée avec la gp120 qui ne distingue pas ces conformations de CCR5. Ceci expliquerait le peu d'effet de ces chimiokines sur l'infection *in vivo* (Colin, Benureau et al. 2013).

Un antagoniste de CCR5 est utilisé dans le traitement du VIH, il s'agit du Maraviroc (UK-427,857), connu sous le nom commercial Celsentri® (ViiV). Il se lie dans la poche hydrophobe du domaine transmembranaire de CCR5 et induit un changement conformationnel qui bloque la liaison de la gp120 au corécepteur, empêchant ainsi la fusion membranaire nécessaire à l'entrée du virus (Dorr, Westby et al. 2005). Il est le premier antagoniste de CCR5 approuvé par la FDA (US Food and Drug Administration) et est utilisé en combinaison avec d'autres antirétroviraux chez les patients infectés par des virus R5 (Lieberman-Blum, Fung et al. 2008). Il est prescrit chez les patients n'ayant que des virions de souche R5, car son utilisation chez les patients ayant des virus X4 ou R5X4 peut entraîner une augmentation rapide des souches X4, associées à la progression vers le stade SIDA (Symons, van Lelyveld et al. 2011; Recordon-Pinson, Raymond et al. 2013). La structure cristallographique

haute résolution de CCR5 lié au Maraviroc a récemment été publiée et montre que cet inhibiteur non compétitif se lie dans une région différente du site de liaison du VIH et des chimiokines (Tan, Zhu et al. 2013).

c. Le récepteur CXCR4.

i. Généralités

Le second corécepteur principal du VIH-1 est CXCR4, un autre RCPG appartenant à la sous-famille des récepteurs d' α -chimiokines, de 352 acides aminés, autrefois nommé LESTR ou fusin (Loetscher, Geiser et al. 1994; Murphy, Baggiolini et al. 2000). Cette protéine est exprimée à la surface de nombreuses cellules comme les cellules progénitrices hématopoïétiques, les polynucléaires neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques et les macrophages (Loetscher, Geiser et al. 1994; Bleul, Wu et al. 1997; Murphy, Baggiolini et al. 2000; Yoshie, Imai et al. 2001). Il est également exprimé à la surface de cellules du système nerveux central comme les astrocytes, les cellules endothéliales du cerveau, les cellules microgliales et les neurones (Bajetto, Bonavia et al. 2002; Lazarini, Tham et al. 2003). Il joue notamment un rôle important dans la domiciliation et la rétention des cellules souches dans la moelle osseuse (Lapidot 2001). Il a également été montré que CXCR4 permet la migration de certaines cellules cancéreuses (Murphy 2001). Aussi, une forte expression de CXCR4 sur les cellules tumorales est liée à un mauvais pronostic dans le cas du cancer du sein (Xu, Shen et al. 2013).

ii. Ligands de CXCR4

Le ligand principal de CXCR4 est le stromal cell-derived factor-1 (SDF-1 ou CXCL12), impliqué dans la migration et le recrutement des lymphocytes T, des monocytes et des cellules endothéliales (Bleul, Farzan et al. 1996; Bleul, Fuhlbrigge et al. 1996; Oberlin, Amara et al. 1996; Gupta, Lysko et al. 1998). CXCL12 stimule également la prolifération des cellules progénitrices B et hématopoïétiques (Nagasawa, Kikutani et al. 1994; Nagasawa, Hirota et al. 1996; Aiuti, Webb et al.

1997). Il existe deux formes de ce ligand formées par épissage alternatif : CXCL12 α et CXCL12 β qui diffèrent de 4 acides aminés en C terminal : CXCL12 α code pour une protéine de 89 acides aminés contre 93 acides aminés pour CXCL12 β (Tashiro, Tada et al. 1993; Shirozu, Nakano et al. 1995). CXCR4 et CXCL12 ont également un rôle important lors de l'organogenèse. En effet, les souris KO CXCR4^{-/-} ou CXCL12^{-/-} meurent durant l'embryogenèse et présentent des défauts cardiaques, vasculaires, hématopoïétiques et du développement du cervelet (Ma, Jones et al. 1998; Zou, Kottmann et al. 1998; Berger, Murphy et al. 1999; Murphy, Baggiolini et al. 2000).

De la même manière que les ligands de CCR5 inhibent l'infection par les souches R5, CXCL12 bloque l'infection de cellules par des virus X4 (Oberlin, Amara et al. 1996). Les chimiokines naturelles ayant des demi-vies très courtes et des effets secondaires, il a été nécessaire de trouver d'autres composés capables de cibler les récepteurs d'entrée du VIH. Dans le cas de CXCR4, ce sont notamment des dérivés de CXCL12 ou encore l'antagoniste spécifique de CXCR4, le bicyclame AMD3100 (1,1'- [1,4-Phénylenebis(méthylène)] – bis [1,4,8,11 – tétraazacyclotétradécane]), possédant une forte activité antivirale *in vitro* contre les virus X4. Ce composé est maintenant utilisé lors des transplantations autologues chez les patients ayant des lymphomes non-hodgkiniens et des myélomes multiples pour ses capacités à mobiliser les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse dans le sang périphérique (De Clercq 2010). Ce composé a une faible biodisponibilité par voie orale mais des dérivés, notamment l'antagoniste AMD070, ont été conçus pour remédier à ce problème (Hendrix, Collier et al. 2004; Steen, Schwartz et al. 2009).

iii. Isoformes de CXCR4

Deux isoformes du récepteur CXCR4 ont été identifiées chez l'Homme (Gupta et Pillarisetti 1999). La première isoforme (CXCR4-A) provient de la traduction d'un ARNm non épissé alors que la seconde (CXCR4-B) provient de la traduction d'un ARNm épissé. De plus, la transcription est débutée par des codons d'initiation différents pour ces deux isoformes [Figure 6]. CXCR4-A est plus long que CXCR4-B de 5 acides aminés au niveau de la région N terminale et ses 4 acides aminés

suivants sont différents, le reste de la molécule étant inchangé² [Figure 7]. L'ARNm correspondant à CXCR4-A n'est pas exprimé dans tous les tissus où l'ARNm correspondant à CXCR4-B l'est, mais est particulièrement exprimé dans la rate et les globules blancs périphériques (Gupta et Pillarisetti 1999).

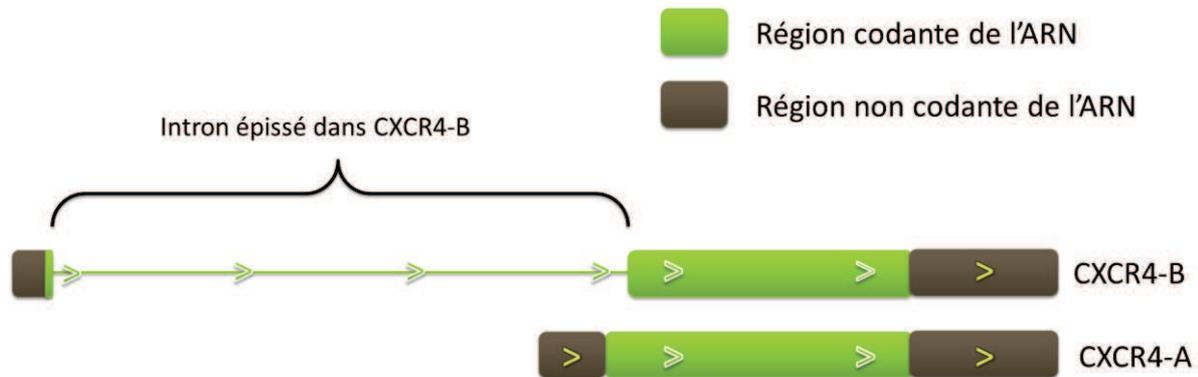


Figure 6 : Structure des deux isoformes d'ARN CXCR4

Représentation des ARN CXCR4-A et CXCR4-B, avec les régions codantes en vert et les régions non codantes de l'ARN en marron. On remarque également la présence d'un intron épissé dans CXCR4-B.



Figure 7 : Représentation schématique des séquences des deux isoformes de CXCR4

Les protéines CXCR4-A et CXCR4-B diffèrent de 9 ou 5 acides aminés en NH₂ terminal, représentés en rouge.

VIII) La commutation de virus R5 vers X4 :

a. Tropicisme viral.

En début d'infection par le VIH-1, on retrouve chez la plupart des patients des virions R5 utilisant CCR5 comme corécepteur et n'induisant pas de syncytia (Schuitemaker, Kootstra et al. 1991; Connor et Ho 1994; van't Wout, Kootstra et al. 1994). Alors que les virions R5 persistent durant toutes les étapes de l'infection, on observe chez un

² En Annexe 1 se trouve l'ADN génomique de CXCR4 avec les régions codantes et non codantes correspondant à (A) CXCR4-A et (B) CXCR4-B.

tiers à la moitié des patients, une commutation vers des virions X4 utilisant CXCR4 comme corécepteur dans les phases avancées de la maladie (Schuitemaker, Koot et al. 1992; Connor, Sheridan et al. 1997; Michael et Moore 1999). Contrairement aux virions R5, les virus à tropisme X4 induisent des syncytia, et sont en général associés à une diminution plus rapide du taux de cellules T CD4 entraînant l'accélération de la progression vers le stade SIDA (Tersmette, de Goede et al. 1988; Tersmette, Gruters et al. 1989; Connor et Ho 1994; Maas, Gange et al. 2000; Schramm, Penn et al. 2000; Didigu et Doms 2012).

b. Evaluation du tropisme viral chez les patients VIH.

i. Tests phénotypiques

Pour évaluer le tropisme des virus, plusieurs méthodes sont possibles. Tout d'abord, un test de formation de syncytia dans des cellules lymphocytaires MT2 est possible pour évaluer le tropisme (Koot, Vos et al. 1992). En effet, ces cellules n'expriment que le corécepteur CXCR4 et forment des syncytia lorsqu'elles sont infectées. Les cellules MT2 sont mises en contact avec des PBMC (peripheral blood mononuclear cells) ou du plasma provenant de patients. L'apparition de syncytia permet d'affirmer l'utilisation de CXCR4 comme corécepteur par le virus. Cette analyse n'est pas compatible avec des détections à grande échelle, n'inclut pas de contrôle d'infection de cellules CCR5⁺ et n'est donc quasiment plus utilisée en routine. De plus, cette méthode risque de sélectionner les souches virales les plus adaptées à la réplication *in vitro*. D'autres tests phénotypiques ont été développés, basés sur la capacité ou non des virus testés à infecter des cellules exprimant de manière stable un seul des deux corécepteurs du VIH (Trouplin, Salvatori et al. 2001; Whitcomb, Huang et al. 2007; Raymond, Delobel et al. 2012; Weber, Vazquez et al. 2013). Ces techniques utilisent des virus recombinants contenant une partie ou la totalité du gène *env* du VIH des patients et la détection des cellules CCR5⁺ ou CXCR4⁺ infectées se fait par colorimétrie ou luminométrie (gène de la β -galactosidase sous la dépendance du promoteur LTR du VIH ou gène *luciférase* inséré dans le vecteur VIH). Si les virus des patients testés sont capables d'infecter les cellules exprimant CCR5 et les cellules CXCR4, il est ensuite possible par sous-clonage de chaque population virale de déterminer s'il s'agit de mélanges de virus R5 et de virus X4 ou de virus dual

R5X4. Les techniques les plus connues sont le test TTT (Toulouse Tropism Test) et Trofile (Raymond, Delobel et al. 2010). Ces tests sont en général très sensibles, ils permettent la détection des variants minoritaires X4 même s'ils ne représentent que 0.5% de la population virale. Les tests phénotypiques sont également souvent longs et chers, ce qui les rend difficiles d'utilisation en routine.

ii. Tests génotypiques

La troisième région variable V3 de la gp120 est très importante pour le tropisme. En effet, cette région de 35 résidus, glycosylée est très variable. Un changement de 1 à 3 acides aminés dans cette boucle V3 peut être suffisant pour convertir un virus R5 en virus X4. Ainsi, la présence d'acides aminés chargés positivement aux positions 11 et 25 (et parfois aux positions 24, 27, 28 et 32) dans la boucle V3 est associée à l'utilisation du corécepteur CXCR4 (De Jong, De Ronde et al. 1992; Fouchier, Groenink et al. 1992; Connor, Sheridan et al. 1997; Hoffman, Seillier-Moiseiwitsch et al. 2002; Jensen, Li et al. 2003; Hartley, Klasse et al. 2005; Didigu et Doms 2012). La commutation du tropisme R5 vers un tropisme X4 est ainsi souvent associée à une augmentation de la charge positive nette de V3, CXCR4 ayant une surface extracellulaire chargée négativement contrairement à CCR5 qui a une surface de charge neutre (Fouchier, Groenink et al. 1992; Hartley, Klasse et al. 2005). Alors que les séquences V3 sont relativement homogènes parmi les virus R5 (de 85 à 100% d'homologie), ces régions sont très variables parmi les virus X4 (Chesebro, Wehrly et al. 1992). Ces données ont alors permis le développement de tests de génotypage utilisant des algorithmes de prédiction d'utilisation des corécepteurs qui comparent la séquence à évaluer avec une banque de séquences dont le phénotype est connu (Jensen, Li et al. 2003; Garrido, Roulet et al. 2008; Raymond, Delobel et al. 2008). Un test de génotypage couramment utilisé est l'algorithme geno2pheno qui utilise la notion de score FPR (false positive rate) pour évaluer le tropisme des patients (Beerenwinkel, Daumer et al. 2003). Ce score prédit l'utilisation du corécepteur CCR5 par le séquençage de la partie V3 de la gp120. Plus cette valeur est élevée et plus la probabilité d'utiliser CCR5 comme corécepteur est grande. Différents seuils de FPR, entre 2% et 20%, sont utilisés pour déterminer l'utilisation de CXCR4 comme corécepteur. Alors que les données européennes conseillent d'utiliser un

FPR de 10%, l'utilisation d'un FPR inférieur à 2% prédit le mieux la présence de souches utilisant CXCR4 comme corécepteur, chez les patients ayant peu de cellules T CD4 et qui sont avancés dans la maladie (Vandekerckhove, Wensing et al. 2011; Santoro, Armenia et al. 2012). Ces tests sont plus rapides, plus simples et moins chers que leurs analogues phénotypiques. Cependant, ils étaient jusqu'à présent bien moins sensibles (détection des variants minoritaires X4 présents à plus de 10% ou 20% de la population virale totale). L'apparition de l'UDS (ultra-deep pyrosequencing) a permis de résoudre ce problème et d'obtenir des sensibilités du même ordre de grandeur que les tests phénotypiques (Saliou, Delobel et al. 2011). On peut également noter que, contrairement aux tests phénotypiques utilisés, les algorithmes génotypiques ne peuvent pas distinguer entre les virus X4 et les virus dual R5X4 car leurs déterminants dans la région V3 sont similaires (Raymond, Delobel et al. 2010; Raymond, Saliou et al. 2013).

c. Les causes de la commutation phénotypique R5-X4.

Les raisons pour lesquelles un individu nouvellement infecté ne porte que des souches R5 et que les souches X4 n'apparaissent que tardivement dans la maladie sont actuellement mal définies. Il existe plusieurs postulats à ces observations : l'hypothèse des filtres, l'hypothèse immunitaire et l'hypothèse virologique.

La première proposition suppose que durant la transmission sexuelle, seules quelques souches R5 soient transmises (Zhu, Wang et al. 1996). Il semblerait notamment y avoir une séquestration des souches X4 par les cellules épithéliales génitales (Berlier, Bourlet et al. 2005). De même, les cellules épithéliales intestinales semblent permettre la transmission exclusive des souches R5 (Meng, Wei et al. 2002). De plus, CXCL12 est présent en grande quantité dans les muqueuses et pourrait bloquer les virus X4 (Agace, Amara et al. 2000). Cependant, ce modèle paraît incomplet en ne tenant pas compte des autres voies de transmission possible.

L'hypothèse immunitaire avance que les souches X4 sont plus facilement éliminées par le système immunitaire que les souches R5 (Roos, Lange et al. 1992). En effet, les souches X4 peuvent être transmises mais ne perdurent pas dans le sang

(Cornelissen, Mulder-Kampinga et al. 1995). Il semble notamment que les réponses cytotoxique et humorale soient plus efficaces contre les souches X4 (Bou-Habib, Roderiquez et al. 1994; Harouse, Buckner et al. 2003). Cependant, cette hypothèse n'est pas suffisante car l'émergence de souches X4 ne se retrouve pas chez tous les patients ayant un fort déficit immunitaire.

L'hypothèse virologique propose que les souches R5 répliquent plus facilement que les souches X4, particulièrement en début d'infection (Schweighardt, Roy et al. 2004; Roy, Schweighardt et al. 2005). Ensuite, les souches X4 provenant de souches R5 mutées, après une étape intermédiaire où elles sont moins performantes que les souches R5 initiales, pourraient se développer (Kuiken, de Jong et al. 1992). Certains auteurs affirment que les souches R5 et X4 se répliquent à des vitesses similaires et que seule la proportion des cellules cibles pourrait expliquer la prédominance des souches R5 (Grivel, Elliott et al. 2007). Aussi, les souches X4 pourraient avoir un désavantage par rapport aux souches R5 du fait de leur cytopathogénécité éventuellement supérieure (Rodrigo 1997).

Dans le laboratoire, il a été observé une augmentation de la densité membranaire en CXCR4 à la surface des cellules T CD4 chez environ un tiers des patients ayant moins de 300 cellules T CD4/mm³ de plasma (Lin, Portales et al. 2005). *In vitro*, un tel phénomène facilite la commutation de R5 vers X4 (Fiser, Vincent et al. 2010). Or les individus chez lesquels sont identifiés des virions X4 ont des densités membranaires de CXCR4 à la surface de leurs cellules T CD4 plus élevées que les individus chez lesquels ne circulent que des virions R5 (Lin, Portales et al. 2005). Ceci a amené les auteurs à proposer qu'une augmentation du niveau d'expression de CXCR4 à la surface des cellules T CD4 pourrait faciliter l'émergence des souches X4. Un des facteurs pouvant provoquer cette augmentation est l'interleukine 7 (IL-7). Il a été effectivement observé *in vitro*, qu'en présence d'IL-7, il y a surexpression de CXCR4 au niveau de la membrane des cellules T CD4 et un raccourcissement du délai de commutation de R5 vers X4 (Brieu, Portales et al. 2011). Ainsi, à un stade avancé de la maladie, la lymphopénie T CD4 pourrait induire une surproduction d'IL-7 qui, par son effet sur l'expression de CXCR4, pourrait faciliter l'émergence de virions X4.

B. Les récepteurs couplés aux protéines G

I) Les chimiokines :

Les chimiokines (cytokines chimiotactiques) sont de petites protéines de 8 à 14 kDa (70 – 130 acides aminés) qui se lient à des RCPG aussi appelés récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7TM). Les chimiokines sont des cytokines capables de promouvoir la migration cellulaire orientée (Baggiolini, Dewald et al. 1997; Ward et Westwick 1998; Berger, Murphy et al. 1999; Choi et An 2011). Elles jouent également un rôle dans l'angiogenèse et dans la régulation des cellules neuronales (Sorace, Myburgh et al. 2011). La plupart des chimiokines sont exprimées de manière constitutive dans les organes lymphoïdes (Yoshie, Imai et al. 2001). Il existe 4 sous-familles classant les chimiokines selon la conservation des deux premiers résidus cystéines dans le domaine N terminal de la protéine : C (ou γ), CX₃C (ou δ), CC (ou β) et CXC (ou α) (Murphy, Baggiolini et al. 2000; Choi et An 2011; Scholten, Canals et al. 2011). Les deux derniers étant les groupes majoritaires, ils regroupent près de 50 chimiokines, et se différencient par la présence ou non d'un acide aminé (X) entre les deux résidus cystéine proche du domaine N terminal de la protéine. Les chimiokines CXC participent majoritairement à l'activation des neutrophiles alors que les chimiokines CC stimulent d'autres leucocytes comme les monocytes, les lymphocytes, les basophiles et les éosinophiles (Yoshie, Imai et al. 2001; Choi et An 2011). Parmi les chimiokines CXC, on distingue celles présentant le motif conservé « glutamate-leucine-arginine » entre l'extrémité N terminale et la première cystéine, nommées ELR CXC et qui attirent les neutrophiles et celles qui ne présentent pas ce motif, les chimiokines non-ELR CXC, qui n'attirent pas les neutrophiles mais d'autres cellules comme les lymphocytes T activés (Rollins 1997; Rossi et Zlotnik 2000; Bajetto, Bonavia et al. 2002). Par convention, on nomme les RCPG selon les caractéristiques des chimiokines qu'ils lient. Ainsi, les chimiokines CXC se lient aux récepteurs CXCR, les chimiokines CC se lient aux récepteurs CCR et les chimiokines C et CX₃C ont leurs récepteurs spécifiques [Tableau 1]. Un récepteur peut lier une ou plusieurs chimiokines d'une même sous-famille et de nombreuses chimiokines sont capables d'interagir avec différents récepteurs (Berger, Murphy et al. 1999). Une classification est également utilisée groupant les chimiokines en deux catégories : les chimiokines constitutives (encore appelées homéostatiques ou

immunitaires) d'une grande importance dans le développement et le maintien du système immunitaire et la formation de l'architecture des organes lymphoïdes secondaires, et les chimiokines inflammatoires (ou induites), les plus nombreuses, qui sont sécrétées et qui recrutent les leucocytes en réponse à des stress physiologiques (Murphy, Baggiolini et al. 2000; Yoshie, Imai et al. 2001; Proudfoot 2002; Munoz, Holgado et al. 2012).

Familles	Chimiokines	Chimiokines	Récepteurs	
ELR-CXC	CXCL1	Gro- α	CXCR2	
	CXCL2	Gro- β	CXCR2	
	CXCL3	Gro- γ	CXCR2	
	CXCL5	ENA-78	CXCR1, CXCR2	
	CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	
	CXCL7	NAP-2	CXCR1, CXCR2	
	CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	
	CXCL15	WECHÉ	-	
	non ELR-CXC	CXCL4	PF4	CXCR3
		CXCL9	MIG	CXCR3
CXCL10		IP-10	CXCR3	
CXCL11		I-TAC	CXCR3	
CXCL12		SDF-1	CXCR4, CXCR7	
CXCL13		BCA-1	CXCR5	
CXCL14		BRAK	-	
CXCL16		SRPSOX	CXCR6	
CXCL17	VCC1	-		
CC	CCL1	I-309	CCR8	
	CCL2	MCP-1	CCR1, CCR2	
	CCL3	MIP-1 α	CCR1, CCR5	
	CCL4	MIP-1 β	CCR1, CCR5, CCR8	
	CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	
	CCL6	C10	CCR1	
	CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	
	CCL8	MCP-2	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	
	CCL9/CCL10	MIP-1 γ	CCR1	
	CCL11	Eotaxin	CXCR3, CCR3, CCR5	
	CCL12	MCP-5	CCR2	
	CCL13	MCP-4	CCR1, CCR2, CCR3, CCR5	
	CCL14	HCC-1	CCR1	
	CCL15	HCC-2	CCR1, CCR3	
	CCL16	HCC-4	CCR1	
	CCL17	TARC	CCR4	
	CCL18	DC-CK-1	-	
	CCL19	ELC	CCR7	
	CCL20	MIP-3 α	CCR6	
	CCL21	SLC	CXCR3, CCR7	
	CCL22	MDC	CCR4	
	CCL23	MPIF-1	CCR1	
	CCL24	MPIF-2	CCR3	
	CCL25	TECK	CCR9, CCR11	
	CCL26	Eotaxin-3	CCR3, CCR10	
	CCL27	CTACK	CCR10	
	CCL28	MEC	CCR3, CCR10	
	CX3C	CX3CL1	Fractalkine	CX3CR1
C	XCL1	Lymphotactin α	XCR1	
	XCL2	Lymphotactin β	XCR1	

Tableau 1 : Les chimiokines et leurs récepteurs

Listing et nomenclatures des chimiokines et de leurs récepteurs, classés selon la conservation des deux premiers résidus cystéines dans le domaine N terminal de la protéine : CXC, CC, CX₃C et C.

II) Fonctions des RCPG :

Les RCPG représentent la plus grande famille de récepteurs de surface. Le nombre de RCPG dans le génome humain est estimé à plus de 900, comprenant près de 500 récepteurs gustatifs ou olfactifs (Murphy, Baggiolini et al. 2000; Takeda, Kadowaki et al. 2002). Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques comme la vue, le goût, l'odorat, la phototransduction, la digestion, le chimiotactisme, la pression artérielle, l'immunité et la régulation du métabolisme. En cas de surexpression, de mutation ou par l'effet de molécules exogènes, les RCPG peuvent provoquer de nombreuses maladies inflammatoires, neurologiques, des cancers et des infections virales (Berger, Murphy et al. 1999; Proudfoot 2002; Schoneberg, Schulz et al. 2004; Lodowski et Palczewski 2009). En effet, des mutations dans les RCPG sont responsables de plus de 30 maladies humaines. Ainsi, alors qu'ils ne représentent qu'environ 3% du génome humain, ils sont ciblés par environ 30% des médicaments actuellement sur le marché (Takeda, Kadowaki et al. 2002; Schoneberg, Schulz et al. 2004). Ils incluent notamment certains blockbusters comme les β -bloquants, les antihistaminiques et les opiacés (Ma et Zemmel 2002).

III) Structure des RCPG :

Les RCPG possèdent tous un arrangement similaire : un domaine N terminal extracellulaire, sept hélices transmembranaires de 25 à 35 acides aminés (TM I à VII) reliées par des boucles extracellulaires et intracellulaires (respectivement e1 à e3 et i1 à i3) et un domaine C terminal cytosolique (Savarese et Fraser 1992; Murphy 1996; Fredriksson, Lagerstrom et al. 2003) [Figure 8]. Dans une même classe de RCPG, les domaines transmembranaires hydrophobes présentent une homologie de séquence alors que les régions hydrophiles contiennent souvent des séquences plus divergentes (Probst, Snyder et al. 1992; Strader, Fong et al. 1994). Aussi, alors que la partie extracellulaire permet la liaison aux ligands et est variable parmi les différents RCPG, la partie intracellulaire permet la signalisation par les protéines G ou les β -arrestines et des motifs de séquences d'acides aminés sont plus conservés parmi de nombreux RCPG (Katritch, Cherezov et al. 2012). Une grande partie des récepteurs présente en général une masse de 40 à 85 kDa.

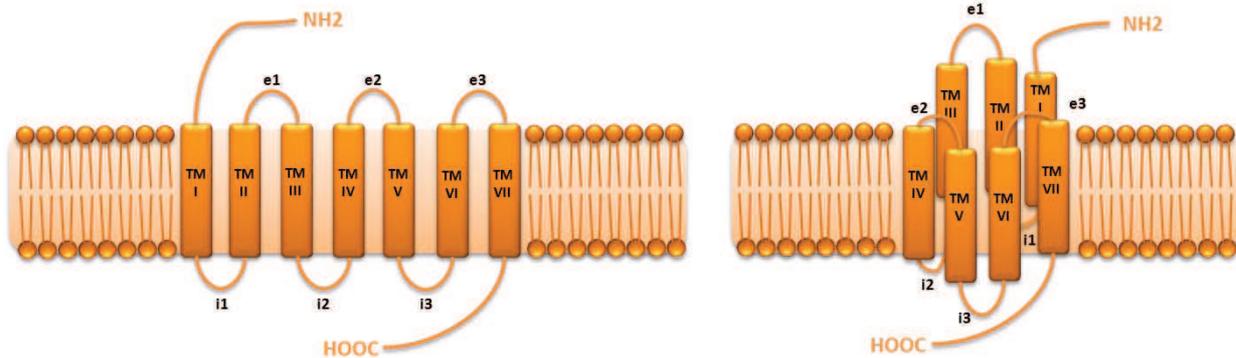


Figure 8 : Structures linéaire et en tonneau d'un RCPG

Représentation de l'arrangement similaire des RCPG avec une structure linéaire (à gauche) et une structure en tonneau (à droite). Les RCPG possèdent une partie N terminale entracellulaire, 7 domaines transmembranaires et une partie C terminale cytoplasmique.

IV) Classes :

Même si cela varie en fonction des classifications proposées, les RCPG humains sont le plus souvent regroupés en 4 grandes classes (A, B, C et Fz), déterminées par les similarités de séquence en acides aminés.

La classe A est la plus abondante et la plus étudiée. D'après la base de données IUPHAR (International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification), elle comprend près de 300 récepteurs parmi lesquels 57 n'ont pas de ligand clairement identifié ; ces récepteurs sont appelés orphelins (Foord, Bonner et al. 2005; Davenport, Alexander et al. 2013). La classe A est composée des récepteurs de la rhodopsine, adrénérgiques, des chimiokines, des glycoprotéines et des récepteurs odorants ou olfactifs. Cette classe est caractérisée par la conservation d'une vingtaine d'acides aminés, notamment des prolines, qui se situent pour la plupart dans la moitié cytoplasmique du domaine 7TM. La classe A est elle-même formée par trois sous-groupes : la classe 1a composée des récepteurs activés par de petites molécules organiques qui se lient dans la cavité formée par le domaine 7TM, la classe 1b comprenant les récepteurs de peptides, plus volumineux et qui se lient aux boucles extracellulaires et la partie N terminale et la classe 1c possédant un grand domaine N terminal, site de liaison des hormones glycoprotéiques (Bockaert et Pin 1999) [Figure 9].

La cinquantaine de RCPG définissant la classe B possèdent un large domaine N terminal, contenant 6 résidus cystéine conservés permettant la formation de ponts disulfures, de 100 à 500 acides aminés qui lient de gros peptides tels que le glucagon, VIP (vasoactive intestinal peptide), les sécrétines et PACAP (pituitary adenylyl cyclase activating peptide) (Foord, Bonner et al. 2005). Cette classe comprend 28 récepteurs encore orphelins (Davenport, Alexander et al. 2013). La liaison du ligand au récepteur se fait par son domaine N terminal, la première boucle extracellulaire et le domaine transmembranaire TM I (Bockaert et Pin 1999). D'après la classification GRAFS (Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/Taste2, Secretin), la famille B peut également être divisée en deux familles distinctes avec la famille Secretin et la famille Adhesion (Fredriksson, Lagerstrom et al. 2003). Les récepteurs de la famille Secretin possèdent une région N terminale de 60 à 80 acides aminés contenant un domaine de liaison aux hormones et qui lie préférentiellement de gros peptides agissant la plupart du temps de manière paracrine, donc sur des cellules voisines (Fredriksson 2006). Les récepteurs de la famille Adhesion ont une région N terminale de 200 à 2800 acides aminés et se lient préférentiellement aux molécules de la matrice extracellulaire (Stacey, Lin et al. 2000; Fredriksson, Lagerstrom et al. 2003; Kwakkenbos, Kop et al. 2004) [Figure 9].

La classe C est composée d'une vingtaine de récepteurs dont 7 sont encore considérés orphelins (Foord, Bonner et al. 2005; Davenport, Alexander et al. 2013). Elle comporte un grand domaine N terminal extracellulaire possédant jusqu'à 800 acides aminés, et site de fixation du ligand. Cette classe comprend les récepteurs métabotropiques des neurotransmetteurs glutamate et GABA (γ -Aminobutyric acid) et le récepteur du calcium. Le domaine N terminal est composé de deux lobes séparés par une fente qui oscillent entre des conformations ouverte et fermée en absence de ligand et qui se stabilisent dans une conformation fermée en présence de ligand. Ce domaine est nommé « Venus Flytrap » par comparaison avec la plante carnivore du même nom qui change de conformation pour attraper les insectes (Pin, Galvez et al. 2003). Le domaine de liaison aux ligands de la région N terminale interagit avec de petites molécules comme les neurotransmetteurs du glutamate, les ions calciques et les molécules du goût [Figure 9].

La dernière classe, composée d'une dizaine de récepteurs, comprend les récepteurs Frizzled et Smoothened qui sont notamment impliqués dans la prolifération,

l'induction embryonnaire et la polarité cellulaire lors du développement métazoaire (Winklbauer, Medina et al. 2001; Wang et Malbon 2004). Les récepteurs de la famille Frizzled possèdent un domaine N terminal d'environ 200 acides aminés avec des résidus cystéine conservés qui permettent la liaison aux glycoprotéines sécrétées Wnt (Fredriksson 2006).

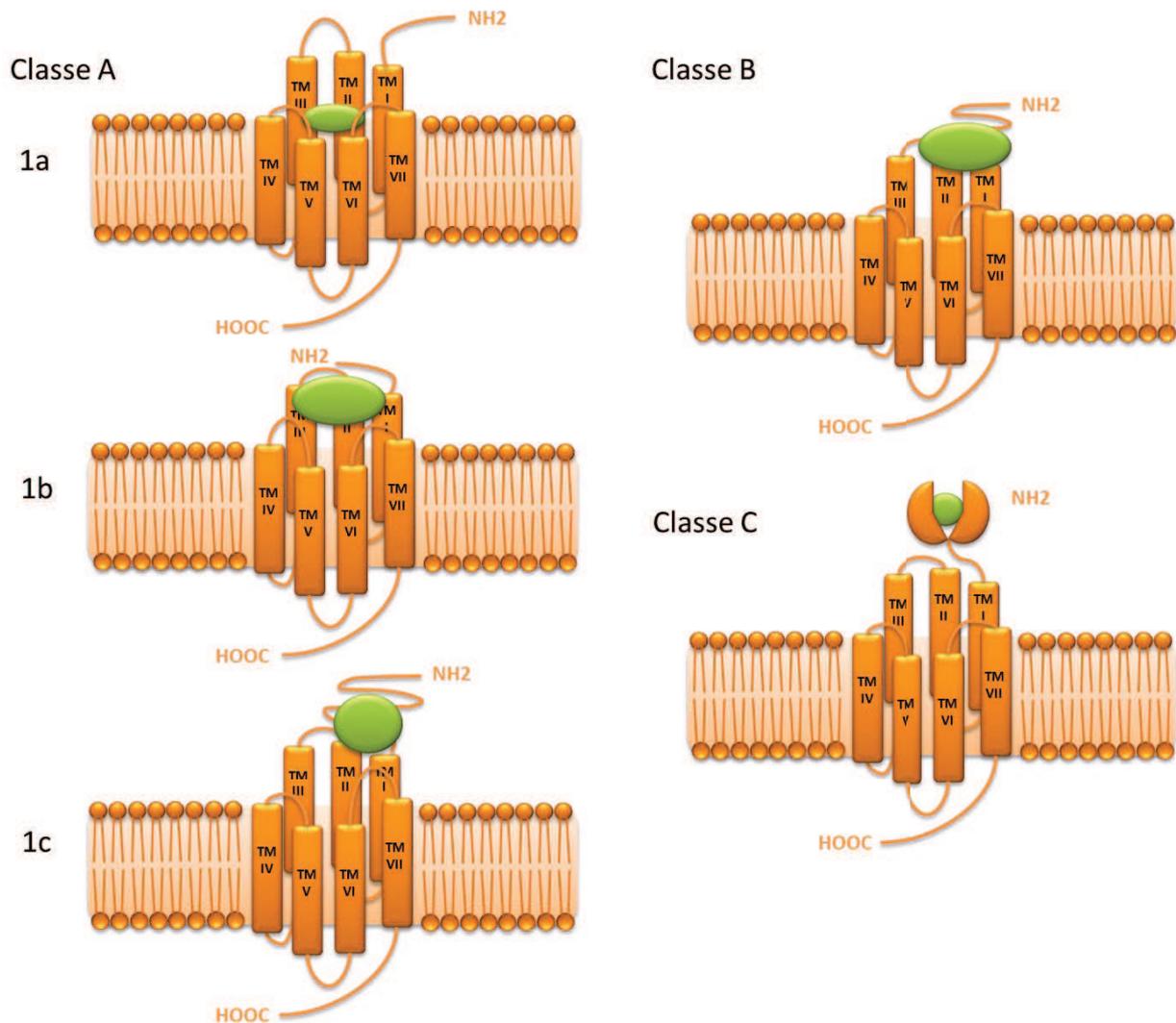


Figure 9 : Classification des RCPG

Représentation de l'interaction ligand-récepteur des classes majoritaires de RCPG d'après Bockeaert et Pin 1999.

V) Stimulation des RCPG :

a. Activation.

Les RCPG peuvent être activés par des stimuli extracellulaires très variés comme des enzymes, des hormones, du calcium, des lipides, des amines, des peptides, des

acides aminés, des protéines, des ions et des photons (Strader, Fong et al. 1994; Fredriksson, Lagerstrom et al. 2003; Schoneberg, Schulz et al. 2004).

La liaison d'un agoniste au RCPG exprimé à la membrane cellulaire entraîne un changement conformationnel au niveau de la cavité formée par les sept hélices transmembranaires. Ceci modifie les boucles intracellulaires du récepteur dévoilant les sites de fixations des protéines G (Wess 1997). Cette modification de conformation vers un état actif permet alors l'interaction avec et l'activation de protéines G hétérotrimériques qui activent ensuite différents effecteurs (adénylate cyclase (AC), phospholipase, phosphodiesterase), générant eux-mêmes de seconds messagers intracellulaires (adénosine monophosphate cyclique (AMPc), Ca^{2+} ...) (Savarese et Fraser 1992; Strader, Fong et al. 1994).

b. Désensibilisation.

Après de fortes et/ou de longues expositions à leurs agonistes, les RCPG se désensibilisent, ce qui se traduit par une rapide atténuation de la réponse du récepteur. Généralement, ils se re-sensibilisent lorsqu'ils ne sont plus exposés à leurs agonistes pendant un certain temps (Premont et Gainetdinov 2007). L'arrêt du signal est obtenu par désensibilisation hétérologue après activation d'un autre RCPG ou homologue après sa propre activation (Savarese et Fraser 1992).

Lors de la désensibilisation homologue, après liaison prolongée par un agoniste, le RCPG est phosphorylé par une kinase GRK (G protein coupled receptor kinase) (Kohout et Lefkowitz 2003). Les GRK phosphorylent préférentiellement les récepteurs stabilisés dans une conformation active, occupée par un agoniste. Ces phosphorylations se font au niveau de résidus sérines et thréonines de la troisième boucle intracellulaire et/ou de la partie C terminale du RCPG. La phosphorylation par une GRK permet alors le recrutement des β -arrestines (Whalen, Rajagopal et al. 2011). Il existe 4 arrestines et 7 GRK mais les β -arrestin-1 (arrestin-2) et β -arrestin-2 (arrestin-3) et les GRK 2,3,5 sont les plus largement exprimées et régulent la plupart des RCPG (Lefkowitz et Shenoy 2005; Zheng, Loh et al. 2010). La phosphorylation par les GRK du récepteur entraîne le découplage des protéines G par encombrement stérique généré par les β -arrestines et l'internalisation des RCPG par les puits

recouverts de clathrine dans des endosomes (Luttrell 2005; Premont et Gainetdinov 2007). Le récepteur peut ensuite être adressé aux lysosomes et dégradé, ou recyclé à la membrane cellulaire (Bockaert et Pin 1998) [Figure 10]. En effet, les β -arrestines interagissent avec différents éléments de la machinerie d'endocytose comme la protéine hétérotétramérique adaptatrice AP-2 (clathrin adaptor protein 2) et la guanosine triphosphatase ARF6 (ADP-ribosylation factor 6) (Lefkowitz et Shenoy 2005). Les β -arrestines interagissent également avec différentes E3 ligases qui catalysent l'ubiquitination des RCPG entraînant leurs désensibilisations (Whalen, Rajagopal et al. 2011). On peut noter que l'ubiquitination est un procédé réversible : en effet, l'ubiquitination est contrecarrée par des enzymes de déubiquitination (DUB) qui sauvent le récepteur de la dégradation protéasomale (Alonso et Friedman 2013). Ainsi, l'équilibre entre ubiquitination/déubiquitination des RCPG régule leur expression membranaire et la réponse cellulaire. Les récepteurs peuvent également être déphosphorylés dans les endosomes par des phosphatases spécifiques des RCPG ce qui va permettre leur réexpression à la membrane cellulaire (Ferguson 2001). Alors que la désensibilisation des RCPG permet de protéger les cellules d'une sur-stimulation du récepteur, la re-sensibilisation permet de protéger les cellules d'une désensibilisation prolongée du récepteur.

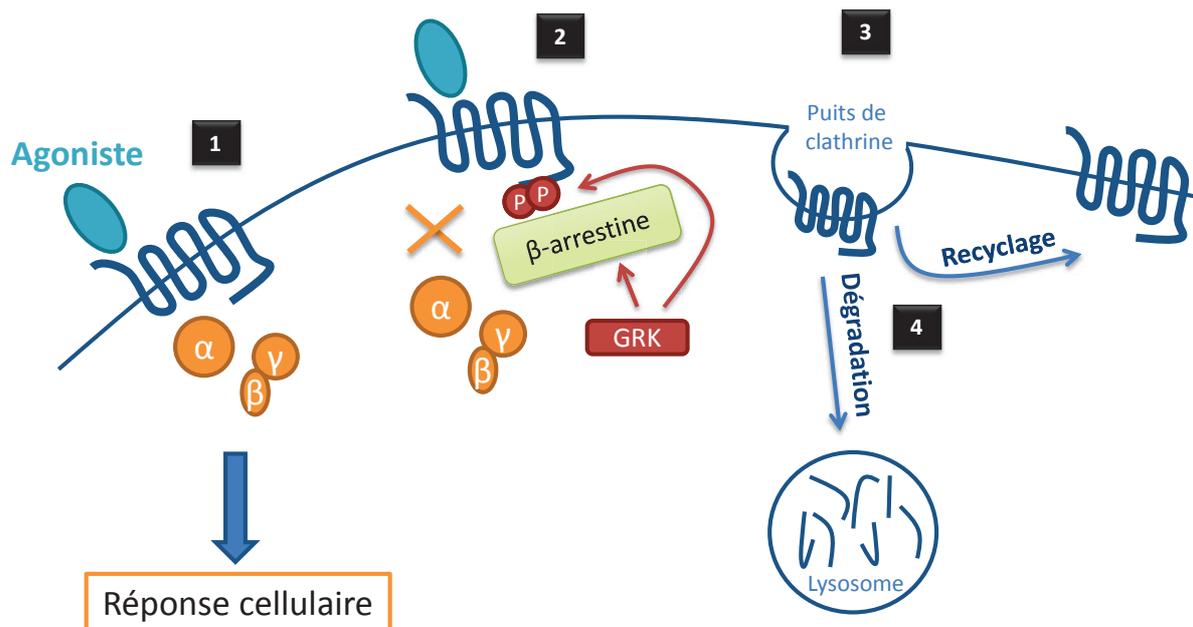


Figure 10 : Désensibilisation homologue des RCPG

(1) Activation du RCPG par un agoniste, couplage aux protéines G et signalisation. (2) Phosphorylation du RCPG et recrutement des β -arrestines par une GRK entraînant le découplage du RCPG d'avec les protéines G et l'arrêt de la signalisation. (3) Internalisation du RCPG par les puits de clathrine dans des endosomes. (4) Dégradation du RCPG ou recyclage à la membrane cellulaire.

Lors de la désensibilisation hétérologue, le RCPG est phosphorylé par une kinase intracellulaire activée via un autre RCPG : la protéine kinase A (PKA) activée par l'AMPc ou la protéine kinase C (PKC) activée par le diacylglycérol (DAG) et le calcium. Les protéines kinases PKA et PKC sont des phosphotransférases qui catalysent le transfert du groupement γ -phosphate de l'ATP (adénosine triphosphate) à des résidus sérine ou thréonine contenus dans des séquences en acides aminés spécifiques (Ferguson 2001).

VI) Voies de signalisation des protéines G hétérotrimériques :

Les protéines G (guanine nucleotide binding proteins) sont des protéines hétérotrimériques régulatrices à activité GTPasique, activées après la liaison de molécules de GTP (guanosine triphosphate). Les protéines G comportent trois sous-unités: G_α de 39 à 52 kDa, G_β d'environ 36 kDa et G_γ de 6 à 9 kDa et sont

présentes à la surface cytoplasmique de la membrane cellulaire (Hamm et Gilchrist 1996; Downes et Gautam 1999). Ces sous-unités sont codées par de nombreux gènes : 16 pour G_α , 5 pour G_β et 12 pour G_γ (Bockaert et Pin 1998; Hurowitz, Melnyk et al. 2000; McCudden, Hains et al. 2005; Wettschureck et Offermanns 2005).

Dans un état inactif, G_α liée à une molécule de GDP (guanosine diphosphate) présente une forte affinité pour le complexe $G_{\beta\gamma}$, la vitesse de dissociation du GDP de la protéine G étant extrêmement faible. Après liaison par un ligand, il y a un ou plusieurs changements conformationnels du RCPG autorisant son interaction avec une protéine G hétérotrimérique formant un complexe ligand-récepteur-protéine G de haute affinité. Cette interaction catalyse un échange entre les molécules de GDP et GTP, les molécules de GTP étant en excès par rapport aux molécules de GDP dans le milieu cellulaire, et entraîne la dissociation de $GTP-G_\alpha$ et $G_{\beta\gamma}$ et avec le récepteur (Savarese et Fraser 1992; Strader, Fong et al. 1994). Ces deux complexes $GTP-G_\alpha$ et $G_{\beta\gamma}$ peuvent alors stimuler ou inhiber l'activité de différents effecteurs enzymatiques et canaux ioniques (Neer 1995; Hamm et Gilchrist 1996; Hamm 1998; Neves, Ram et al. 2002; McCudden, Hains et al. 2005). Le complexe $G_{\beta\gamma}$ est très stable et est généralement considéré comme une seule unité fonctionnelle. En effet, ce dimère ne se dissocie qu'en conditions dénaturantes. Par son activité GTPasique intrinsèque, G_α provoque ensuite l'hydrolyse des molécules de GTP en GDP entraînant un retour à l'état inactif de base par la ré-association avec la sous-unité $G_{\beta\gamma}$ [Figure 11]. Cette activité GTPasique, qui régule la durée d'activation par les différentes molécules effectrices, est différente selon la sous-unité G_α (Cabrera-Vera, Vanhauwe et al. 2003).

Ces protéines G sont régulées par différentes protéines comme les GEF (guanine exchange factor) qui permettent l'échange entre les molécules de GDP et GTP, les RGS (regulators of G protein signaling) qui ont une activité GAP (GTPase activating proteins) et qui facilitent l'hydrolyse de molécules GTP en GDP en augmentant l'activité GTPasique intrinsèque de G_α et les GDI (guanine dissociation inhibitors) qui bloquent la libération de GDP, inhibant alors la signalisation (Kehrl 1998; Preininger et Hamm 2004). Ainsi, le complexe $G_{\beta\gamma}$ lié à $GDP-G_\alpha$ diminue la libération spontanée des molécules GDP et agit comme un GDI. Aussi, la stimulation du RCPG par son ligand facilite la libération du GDP lié à G_α et le complexe ligand-RCPG agit alors comme un GEF (Bockaert et Pin 1998; McCudden, Hains et al. 2005). Il a également

été identifié un groupe de protéines nommées AGS (activators of G-protein signaling) qui interagissent directement avec les sous-unités des protéines G et régulent ainsi leur activation indépendamment de l'activation du récepteur (Blumer, Cismowski et al. 2005). Ces protéines sont classées en trois groupes. Le groupe 1 correspond aux protéines qui activent directement G_{α} , elles sont donc similaires aux GEF. Alors que le groupe 2 inclut les protéines qui modulent l'interaction G_{α} - $G_{\beta\gamma}$ en se liant à G_{α} , le groupe 3 module la même interaction en se liant à $G_{\beta\gamma}$ (Cismowski 2006).

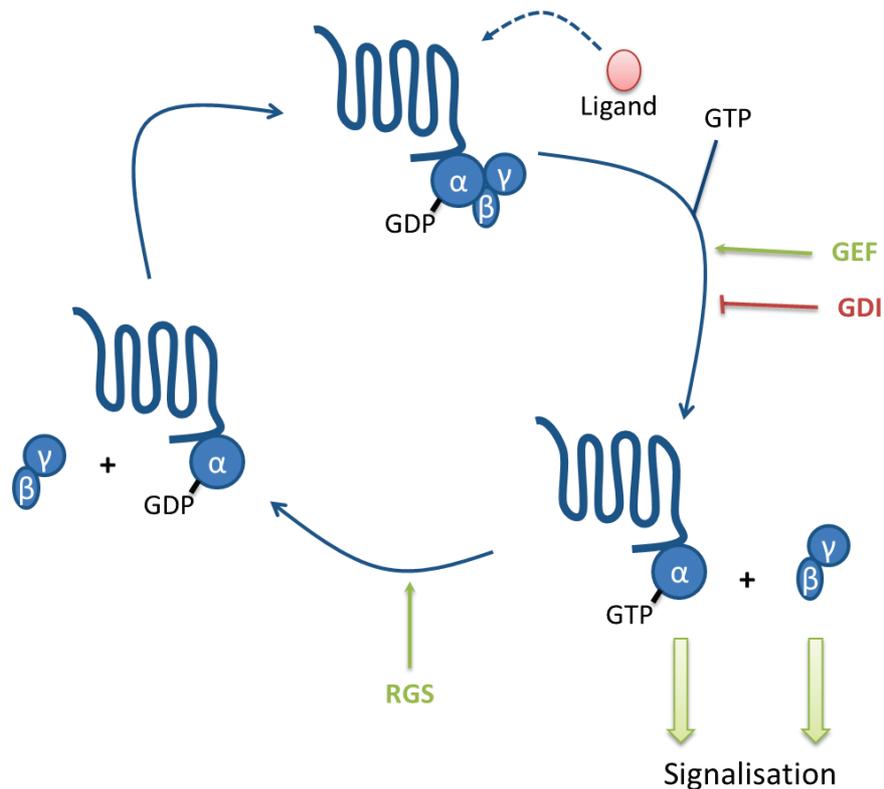


Figure 11 : Cycle des protéines G

La liaison d'un ligand provoque l'interaction de son récepteur avec une protéine G qui catalyse l'échange GDP-GTP entraînant la dissociation du complexe $G_{\beta\gamma}$ de $GTP-G_{\alpha}$ qui reste associée au récepteur. Ces deux complexes peuvent alors signaler. L'activité GTPasique de G_{α} provoque ensuite l'hydrolyse des molécules de GTP en GDP entraînant un retour à l'état inactif de base par la ré-association avec la sous-unité $G_{\beta\gamma}$. Différentes protéines peuvent réguler ce cycle : les GEF (guanine exchange factor), les GDI (guanine dissociation inhibitors) et les RGS (regulators of G protein signaling).

VII) Diversité des protéines G hétérotrimériques :

Il existe 4 grandes classes de protéines G, se distinguant par la séquence en acides aminés de leur sous-unité G_α (Kobilka 1992; Hamm et Gilchrist 1996; Oldham et Hamm 2008).

a. Les protéines G_s .

Les protéines G_s stimulent l'AC qui catalyse la conversion d'ATP en AMPc, ce qui active les signalisations dépendant de PKA et d'ERK (extracellular signal-regulated kinase). Cette signalisation permet la prolifération cellulaire (Kehrl 1998). Les protéines G_s régulent également les canaux calciques (Simon, Strathmann et al. 1991). La famille de protéines G_s inclut les protéines G_{olf} , spécifiquement exprimées dans l'épithélium olfactif, avec lesquelles elles partagent près de 90% de similarité dans leurs séquences en acides aminés (Jones et Reed 1989).

b. Les protéines $G_{i/o}$.

Les protéines $G_{i/o}$ inhibent l'AC, ce qui diminue l'AMPc et activent les canaux chloriques, potassiques et calciques, activant les signalisations dépendant de Rho, Src et CDC42 (cell division control protein 42 homolog) (Simon, Strathmann et al. 1991). La toxine pertussique (PTX) inactive les $G_{i/o}$ en bloquant leur interaction avec le RCPG par l'ADP ribosylation de la cystéine en position 4 du domaine C terminal (Fields et Casey 1997). Elle est ainsi très utilisée pour montrer le couplage d'un RCPG à ces protéines de la classe $G_{i/o}$. Une exception à cette règle est la protéine G_z^3 , qui fait partie de la famille $G_{i/o}$ mais qui n'a pas de résidu cystéine en domaine C terminal qui sert de substrat à l'ADP ribosylation, ce qui la rend insensible à PTX (Casey, Fong et al. 1990).

³ G_z est majoritairement exprimée dans les plaquettes sanguines et dans certaines régions du cerveau.

c. Les protéines G_q .

Les protéines $G_{q/11}$ sont capables d'activer la voie de la phospholipase C (PLC) qui clive la phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) en DAG et inositol triphosphate (IP3) permettant la mobilisation de calcium intracellulaire (Neves, Ram et al. 2002). Aussi, G_q active la signalisation Akt (ou protéine kinase B (PKB)) qui module les cascades de transduction mTOR (mammalian target of rapamycin) et NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells).

d. Les protéines $G_{12/13}$.

Les protéines $G_{12/13}$ sont de petites protéines G qui activent notamment les petites GTPases Ras et Rho et les canaux calciques, sodiques et potassiques. Ils activent ainsi les Rho-GEF qui initient la signalisation de Rho par ROCK (Rho-associated protein kinase) et la MAPK (mitogen-activated protein kinase) p38 et contrôlent notamment le remodelage du cytosquelette, régulant ainsi la migration cellulaire (Neves, Ram et al. 2002).

e. Le dimère $G_{\beta\gamma}$.

Durant la signalisation, $G_{\beta\gamma}$ coordonne les réponses cellulaires, notamment en stabilisant l'interaction des sous-unités α avec les récepteurs et en modulant l'effet des différents G_α activés (Simon, Strathmann et al. 1991). Le dimère $G_{\beta\gamma}$ contrôle aussi des voies de signalisation, et est important pour la régulation des seconds messagers et des canaux ioniques (Clapham et Neer 1997; Cabrera-Vera, Vanhauwe et al. 2003; Jones, Siderovski et al. 2004; McCudden, Hains et al. 2005). Il a notamment un rôle dans l'activation des canaux potassiques et calciques. Ce dimère peut ainsi interagir indépendamment ou en coordination de la sous-unité G_α activée. Il a également été impliqué dans le recrutement des GRK à la membrane, stimulant la désensibilisation des récepteurs (Pitcher, Inglese et al. 1992).

f. Implications de la diversité des protéines G sur l'étude des RCPG.

Un RCPG pouvant se lier à une ou plusieurs protéines G, l'activation d'un récepteur entraîne alors la mobilisation d'une ou plusieurs voies de signalisation avec des cinétiques le plus souvent différentes, ce qui rend complexe l'étude de ces récepteurs (Neer 1995). Selon la conformation stabilisée par les différents ligands des RCPG, les signalisations peuvent également passer par des cascades indépendantes des protéines G, notamment par les β -arrestines via les tyrosine-kinases de la famille Src et des MAPK, ou encore par les GRK (Lefkowitz et Shenoy 2005; Luttrell 2005).

VIII) Notion de ligands :

Les ligands ont d'abord été classés dans deux catégories : les agonistes et les antagonistes selon qu'ils permettent ou bloquent l'activation des RCPG. Les agonistes complets produisent une réponse maximale alors que les agonistes partiels donnent une réponse inférieure à celle des précédents. Cependant, il a été montré que les récepteurs peuvent avoir une activité constitutive, ce qui a ajouté la notion d'agonistes inverses qui diminuent cette activité spontanée et stabilisent les récepteurs dans leur position inactive (Chidiac, Hebert et al. 1994; Samama, Pei et al. 1994; Bond et Ijzerman 2006). Ainsi, les antagonistes neutres n'ont pas d'activité agoniste inverse et représentent environ 15% des antagonistes (Kenakin 2004). Le site de reconnaissance du ligand endogène est nommé orthostérique. Par opposition, le site allostérique représente un domaine distinct de celui du ligand naturel (Galandrin, Oligny-Longpre et al. 2007). Aussi, ces notions doivent tenir compte du contexte. En effet, un même ligand peut être agoniste ou antagoniste pour le même RCPG selon la voie d'activation analysée (on parle alors de ligands biaisés) ou même le type cellulaire étudié (Milligan 2009). Un antagoniste atténue l'effet de l'agoniste et peut être compétitif ou non compétitif selon qu'il se lie sur le même site de fixation que l'agoniste ou sur un site différent.

IX) Oligomérisation :

Il est connu que la plupart des récepteurs, notamment les récepteurs présents à la surface cellulaire, forment des dimères (Heldin 1995). Alors qu'il a longtemps été admis que les RCPG fonctionnaient en tant que monomères, de nombreuses études tendent à démontrer depuis une quinzaine d'années qu'ils sont aussi fonctionnels sous forme oligomérique (Kaupmann, Malitschek et al. 1998; Angers, Salahpour et al. 2000; Rocheville, Lange et al. 2000; Pin, Neubig et al. 2007). Ils forment ainsi des homo-oligomères s'ils sont composés de la même sous-unité et/ou des hétéro-oligomères s'ils forment des oligomères avec d'autres RCPG. Cette oligomérisation peut se faire entre RCPG de même classe ou entre RCPG de classes différentes. Ce complexe correspond à une unité fonctionnelle à part entière et modifie généralement l'affinité des ligands pour les récepteurs alors associés ainsi que le couplage aux protéines G et la signalisation qui en découle (Jordan et Devi 1999; Terrillon et Bouvier 2004).

a. Modulation de l'expression membranaire.

L'hétérodimérisation avec un autre RCPG est un mode de modulation de l'activité des RCPG. Cette hétérodimérisation peut se faire dès la synthèse protéique, bien avant l'expression à la surface de la cellule (Wilson, Wilkinson et al. 2005). L'hétérodimérisation régule notamment la maturation et le transport à la membrane cellulaire de RCPG : pour certains récepteurs, des études ont montré qu'en masquant les signaux de rétention qui interdisent l'export de protéines non matures, l'oligomère permet le transport correct du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique (Marshall, White et al. 1999; Margeta-Mitrovic, Jan et al. 2000). Aussi, des RCPG mutants naturels se comportent souvent comme des dominants négatifs, provoquant la rétention du récepteur sauvage dans le réticulum endoplasmique. Ceci indique notamment le caractère précoce et intracellulaire de la formation de dimères dans la cascade de biosynthèse (Wang et Norcross 2008). Ainsi, le récepteur CCR5 Δ 32 retient le récepteur sauvage CCR5 par dimérisation dans le compartiment intracellulaire (Benkirane, Jin et al. 1997; Rodriguez-Frade, Vila-Coro et al. 1999). Cette hétérodimérisation diminue la densité membranaire en CCR5 et pourrait

permettre d'expliquer la progression plus lente du VIH chez les patients hétérozygotes pour cette mutation (Benkirane, Jin et al. 1997; Chelli et Alizon 2001). Cependant, certaines équipes contredisent ces conclusions en montrant que l'expression réduite de CCR5 à la surface ne serait due qu'à un effet de dosage génique et non à une séquestration du récepteur sauvage (Venkatesan, Petrovic et al. 2002; Springael, Urizar et al. 2005).

La stimulation d'un des RCPG engagés dans des dimères peut également entraîner la co-internalisation des deux récepteurs, comme montré pour de nombreux récepteurs. Il en est ainsi pour les récepteurs à l'adénosine $A_{2A}R$ et à la dopamine D_2R (Hillion, Canals et al. 2002), les récepteurs adrénergiques $\alpha_{2A}AR$ et β_1AR (Xu, He et al. 2003), le récepteur de la somatostatine sst_{2A} et le récepteur aux opioïdes μ (Pfeiffer, Koch et al. 2002).

b. Signalisation par les protéines G.

Le dimère peut parfois être la seule unité fonctionnelle. En effet, il a été montré que les récepteurs au GABA, $GABA_{b1}$ et $GABA_{b2}$, forment un dimère fonctionnel. Alors que le monomère $GABA_{b1}$ ne s'exprime pas à la surface cellulaire, le monomère $GABA_{b2}$ est transporté à la membrane cellulaire mais ne peut lier le GABA (Kaupmann, Malitschek et al. 1998; Bouvier 2001; Galvez, Duthey et al. 2001). Aussi, la mutation du signal de rétention dans le domaine C terminal de $GABA_{b1}$ permet son expression à la membrane mais non sa réponse au ligand, la dimérisation avec $GABA_{b2}$ étant indispensable pour cela (Margeta-Mitrovic, Jan et al. 2000). Le premier récepteur permet ainsi la liaison au ligand, le second permet l'expression à la membrane plasmique et la signalisation via les protéines G.

Aussi, l'hétérodimérisation de RCPG peut entraîner un changement de sélectivité vers les différentes protéines G (George, Fan et al. 2000; Charles, Mostovskaya et al. 2003). Par exemple, l'hétérodimérisation entre CCR5 et CCR2 permet le recrutement des protéines G_q , signalisation différente des cascades de signalisation associées avec les homodimères respectifs qui utilisent G_i (Mellado, Rodriguez-Frade et al. 2001; Rodriguez-Frade, Mellado et al. 2001). La signalisation qui en résulte est l'adhésion cellulaire au lieu de la migration (Maggio, Novi et al. 2005).

L'hétérodimérisation peut également avoir un impact sur la sensibilité aux ligands. Par exemple, l'hétérodimère CCR5-CCR2 donne des réponses calciques pour des concentrations en ligand (CCL5 et MCP-1) 10 à 100 fois plus faibles que ce qui est nécessaire pour les récepteurs seuls (Mellado, Rodriguez-Frade et al. 2001). Les récepteurs aux opioïdes δ et κ forment également des hétérodimères avec des propriétés fonctionnelles et des affinités pour leurs ligands différentes des récepteurs seuls (Jordan et Devi 1999).

Ainsi, l'hétérodimérisation peut modifier la densité membranaire des RCPG, l'affinité des ligands pour leurs récepteurs, la spécificité, l'intensité et la sensibilité de la réponse via différents médiateurs intracellulaires.

De nombreux récepteurs sont encore considérés comme orphelins. Il est alors possible que certains de ces RCPG fonctionnent naturellement sans ligand en étant constitutivement actifs et/ou en modulant l'activité d'autres récepteurs par dimérisation (Davenport, Alexander et al. 2013).

c. Détection des oligomères.

Pour détecter ces oligomères, de plus en plus d'études ont recours à des techniques de BRET (bioluminescence resonance energy transfer) et de FRET (Förster resonance energy transfer) utilisant respectivement, la fusion de protéines bioluminescentes et fluorescentes, aux récepteurs (Angers, Salahpour et al. 2000). Généralement, la fusion de ces molécules se fait au niveau du domaine C terminal du récepteur. Ces techniques sont basées sur le transfert non radioactif d'énergie entre un donneur et un accepteur. Pour la technique de FRET, le donneur et l'accepteur sont des molécules fluorescentes alors que pour la technique de BRET, le donneur est bioluminescent, il s'agit en général de l'enzyme luciférase de *Renilla reniformis* (Rluc) et l'accepteur est fluorescent. Ainsi, si les deux récepteurs sont assez proches (moins de 100 Å) et que le spectre d'émission du donneur chevauche le spectre d'excitation de l'accepteur, on mesure alors un signal émis par l'accepteur à une longueur d'onde caractéristique de la dimérisation des RCPG (Bouvier 2001;

Angers, Salahpour et al. 2002; Marullo et Bouvier 2007; Maurel, Comps-Agrar et al. 2008). Le FRET en temps résolu (Tr-FRET) est une technique de FRET utilisant des molécules fluorescentes ayant de longues durées de vie de fluorescence permettant une forte diminution du bruit de fond qui a un faible temps de vie.

Grâce à ces techniques de transfert d'énergie, de nombreux exemples d'homodimérisation et d'hétérodimérisation parmi les RCPG ont été décrits dans la littérature (Bouvier 2001; Rios, Jordan et al. 2001; Angers, Salahpour et al. 2002; Bai 2004; Breitwieser 2004; Pin, Neubig et al. 2007; Munoz, Holgado et al. 2012).

X) Oligomérisation des corécepteurs du VIH :

a. Homodimérisation et hétérodimérisation de CCR5 et CXCR4.

Il a été montré que CCR5 et CXCR4 forment des homo-oligomères constitutifs, c'est-à-dire qu'ils n'ont donc pas besoin d'être activés par des ligands pour se former (Issafras, Angers et al. 2002; Babcock, Farzan et al. 2003; Toth, Ren et al. 2004; El-Asmar, Springael et al. 2005; Percherancier, Berchiche et al. 2005).

Dans certaines conditions, le monomère semble être l'unité fonctionnelle, dans d'autres cas, c'est l'oligomère qui est le seul à pouvoir signaler. Il a notamment été montré que la forme monomérique de CCR5 donne un récepteur inactif, incapable de signaler (Hernanz-Falcon, Rodriguez-Frade et al. 2004). Cependant, il a également été stipulé que dans certains cas, CD4 ne peut interagir qu'avec les formes monomériques des corécepteurs. Ainsi, à la membrane plasmique des macrophages, CCR5 se trouve sous forme monomérique alors que CXCR4 est sous forme oligomérique, ce qui empêcherait CXCR4 d'interagir correctement avec CD4 et pourrait expliquer la difficulté des virus X4 à infecter les macrophages (Lapham, Zaitseva et al. 1999).

Un autre travail a suggéré que la dimérisation du corécepteur a un effet inhibiteur sur l'infection. Un anticorps anti-CCR5 ciblant la partie N terminale du récepteur a été développé pour bloquer l'infection par le VIH. Alors que cet anticorps n'induit pas de signal et n'interfère pas avec la liaison de la gp120 sur CCR5, il diminue l'infection

par le VIH en induisant l'homodimérisation du récepteur (Vila-Coro, Mellado et al. 2000).

CXCR4 et CCR5 formeraient des hétérodimères constitutifs à la membrane plasmique, modulés par leurs différents ligands. En effet, ceux-ci vont induire des changements conformationnels qui vont soit promouvoir, soit déstabiliser la formation de l'hétérodimère (Isik, Hereld et al. 2008). La stimulation de l'un des récepteurs entraîne l'internalisation du second récepteur (Contento, Molon et al. 2008). L'isoforme CCR5 Δ 32 est capable d'interagir directement avec CCR5 et CXCR4 et de les maintenir à l'intérieur de la cellule, donnant une résistance envers les virus R5, X4 et R5X4 (Agrawal, Lu et al. 2004).

b. Hétérodimérisation des corécepteurs avec CCR2.

En présence simultanée de leurs ligands (CCL5 et MCP-1), CCR5 forme des hétérodimères avec l'isoforme majoritaire de CCR2, CCR2b, récepteur de chimiokines avec lequel il partage 75% d'identité (Mellado, Rodriguez-Frade et al. 2001). La formation d'hétérodimères entre CCR5 et CCR2b se fait avec la même efficacité que la formation d'homodimères. Cet hétérodimère n'est alors capable de lier qu'un seul ligand, on parle alors de compétition de *trans*-liaison. En effet, les ligands de CCR5 empêchent la liaison du ligand MCP-1 (CCL2) de CCR2b, et réciproquement, lorsque les deux récepteurs forment des hétérodimères (El-Asmar, Springael et al. 2005). Aussi, il a été remarqué que la substitution d'un acide aminé conservé dans le premier domaine transmembranaire de CCR2b, CCR2V64I, repousse l'apparition du stade SIDA de 2 à 4 ans chez les patients séropositifs. Ce polymorphisme, retrouvé à une fréquence allélique de 10 à 25%, permettrait alors à CCR2 de s'hétérodimériser avec CCR5 et/ou CXCR4 et diminuerait la quantité de récepteurs disponibles à la surface cellulaire et expliquerait la progression plus lente du VIH (Lee, Doranz et al. 1998; Mellado, Rodriguez-Frade et al. 1999; Mellado, Rodriguez-Frade et al. 2001). Aussi, l'activation de CCR2b par son ligand MCP-1 entraîne la désensibilisation hétérologue des deux corécepteurs CCR5 et CXCR4 (Lee, Doranz et al. 1998). CXCR4 et CCR2 forment également des hétérodimères spontanément (Percherancier, Berchiche et al. 2005).

Certains auteurs ont envisagé de modifier la progression du VIH en agissant sur des récepteurs qui hétérodimérisent avec les corécepteurs des VIH. Une équipe a notamment mis au point un anticorps monoclonal anti-CCR2, CCR2-01, qui permet l'oligomérisation de CCR2 avec CCR5 ou CXCR4, bloquant ainsi l'infection par le VIH en agissant en *trans* sur les récepteurs (Rodriguez-Frade, del Real et al. 2004).

Il a même été montré qu'il peut se former des complexes hétéro-oligomères composés de plus de deux récepteurs différents, comme c'est le cas pour les récepteurs CCR2, CCR5 et CXCR4 (Sohy, Yano et al. 2009). Ainsi, l'action d'un antagoniste spécifique de l'un entraîne une inhibition croisée des deux autres (coopérativité de liaison négative) (Maggio, Novi et al. 2005).

c. Hétérodimérisation des corécepteurs avec les récepteurs aux opioïdes.

CCR5 forme également des hétérodimères avec les trois sous-types des récepteurs aux opioïdes (μ , δ , κ) à la surface des cellules immunitaires (Suzuki, Chuang et al. 2002). En particulier, CCR5 forme des hétérodimères avec les récepteurs aux opioïdes μ et l'activation de l'un ou l'autre des récepteurs a un impact sur le couplage aux protéines G du second par une désensibilisation croisée (Chen, Li et al. 2004).

Il a également été montré que CXCR4 et le récepteur aux opioïdes δ forment des hétérodimères qui sont inactifs, incapables d'engendrer une signalisation lorsqu'ils sont simultanément stimulés par leurs ligands. Ainsi, les récepteurs aux opioïdes δ bloquent la migration des monocytes induite par CXCR4 lorsque les deux récepteurs sont exprimés en même temps (Pello, Martinez-Munoz et al. 2008).

D'autres récepteurs forment également des hétérodimères avec les corécepteurs du VIH et modifient leurs signalisations. C'est le cas notamment du récepteur DARC (duffy antigen/chemokine receptor) avec CCR5 (Chakera, Seeber et al. 2008) et du récepteur CXCR7 avec CXCR4 (Levoye, Balabanian et al. 2009) [Tableau 2].

	Hétérodimérisation	Référence
CCR5	CXCR4	(Isik, Hereld et al. 2008)
	CCR2	(Mellado, Rodriguez-Frade et al. 2001)
	μ OR, κ OR, δ OR	(Suzuki, Chuang et al. 2002)
	DARC	(Chakera, Seeber et al. 2008)
	C5aR	(Huttenrauch, Pollok-Kopp et al. 2005)
	CXCR3	(O'Boyle, Fox et al. 2012)
CXCR4	CCR5	(Isik, Hereld et al. 2008)
	CCR2	(Percherancier, Berchiche et al. 2005)
	δ OR	(Pello, Martinez-Munoz et al. 2008)
	CXCR7	(Levoye, Balabanian et al. 2009)
	BILF1	(Nijmeijer, Leurs et al. 2010)

Tableau 2 : Hétérodimérisation de CCR5 et CXCR4 avec d'autres RCPG

Liste non exhaustive des récepteurs ayant été décrits comme pouvant s'hétérodimériser avec CCR5 ou CXCR4.

d. Hétérodésensibilisation des corécepteurs.

L'activation prolongée d'un récepteur induit la désensibilisation de sa propre activité, appelée désensibilisation homologue, ou de celle d'autres récepteurs présents dans la même cellule, nommée désensibilisation hétérologue. Il faut distinguer l'hétérodimérisation de l'hétérodésensibilisation qui est caractérisée par la modulation d'un RCPG par le ligand d'un second RCPG sans qu'il n'y ait besoin de contact entre les deux récepteurs. Cette désensibilisation est possible via une cascade de signalisation commune aux deux récepteurs co-exprimés. La désensibilisation empêche ainsi les effets délétères d'une activation prolongée et/ou excessive.

L'activation de certains RCPG par leurs ligands influence alors l'infection et la propagation du VIH. En effet, la stimulation des récepteurs aux opioïdes μ et δ par leurs ligands induit la désensibilisation hétérologue de CCR5 sans modifier les fonctions de CXCR4, et permet ainsi une susceptibilité réduite aux virus R5 sans affecter les virus X4 (Steele, Szabo et al. 2002; Szabo, Wetzel et al. 2003). De même, le récepteur à l'adénosine A_{2A} bloque l'effet du ligand CCL5 sur le chimiotactisme et diminue la susceptibilité des monocytes à l'infection par des virus

R5 (Zhang, Yang et al. 2006). La stimulation de récepteurs aux formyl peptides (FPR) avec différents ligands provoque la désensibilisation de CXCR4 et CCR5 atténuant leurs fonctions biologiques et diminuant l'infection par le VIH (Shen, Li et al. 2000; Le, Wetzel et al. 2001; Li, Wetzel et al. 2001). L'activation de CXCR1 par l'IL-8 induit également la désensibilisation hétérologue de CCR5 et modifie la réponse de CXCR4 à son ligand CXCL12 lorsqu'ils sont coexprimés (Richardson, Tokunaga et al. 2003) [Tableau 3].

	Hétérodésensibilisation	Références
CCR5	CXCR4	(Hecht, Cahalon et al. 2003)
	μ OR, δ OR	(Rogers, Steele et al. 2000; Szabo, Wetzel et al. 2003)
	A2AR	(By, Durand-Gorde et al. 2010)
	FPR	(Shen, Li et al. 2000; Le, Wetzel et al. 2001; Li, Wetzel et al. 2001)
	CXCR1	(Richardson, Tokunaga et al. 2003)
	VPAC1	(Grimm, Newman et al. 2003)
	CCR2	(Lee, Doranz et al. 1998)
CXCR4	CCR5	(Honczarenko, Le et al. 2002; Hecht, Cahalon et al. 2003; Basu et al. 2003)
	FPR	(Li, Wetzel et al. 2001)
	CXCR1	(Richardson, Tokunaga et al. 2003)
	A2AR	(By, Durand-Gorde et al. 2010)
	κ OR	(Finley, Chen et al. 2008)
	ORL1	(Kaminsky et Rogers 2011)
	CXCR3	(Giegold, Ogrissek et al. 2013)
	CCR4	(Zhang, Tian et al. 2011)
CCR2	(Lee, Doranz et al. 1998)	

Tableau 3 : Hétérodésensibilisation de CCR5 et CXCR4 avec d'autres RCPG

Liste non exhaustive des récepteurs ayant été décrits comme pouvant entraîner l'hétérodésensibilisation de CCR5 ou de CXCR4.

La désensibilisation hétérologue des corécepteurs au VIH peut également se produire par des récepteurs ne faisant pas partie de la famille des RCPG. En effet, il existe une hétérodésensibilisation réciproque entre CD4 et CCR5 lorsqu'ils sont respectivement stimulés par IL-16 et CCL4 (Mashikian, Ryan et al. 1999). Aussi, la stimulation du récepteur Toll-like TLR2 par l'acide lipotéichoïque (LTA) entraîne

l'internalisation de CCR5 et inhibe alors la migration vers CCL5 (Fox, Letellier et al. 2011).

C. Le récepteur 1 de la sphingosine-1-phosphate S1P1

I) Synthèse et métabolisme de la sphingosine-1-phosphate :

La sphingosine-1-phosphate (S1P) est un dérivé de la famille des sphingolipides qui sont des composants structuraux importants des membranes cellulaires eucaryotes. Il est maintenant reconnu que les métabolites sphingolipidiques, et plus particulièrement S1P, jouent un rôle important dans la régulation de nombreuses fonctions biologiques. La synthèse sphingolipidique commence à la membrane du réticulum endoplasmique où 4 enzymes agissent ensemble pour générer des céramides de longueurs différentes (Gault, Obeid et al. 2010) et où l'étape limitante est catalysée par la sérine palmitoyltransférase. La céramide est générée par cette synthèse *de novo* ou à partir de la sphingomyéline par une sphingomyélinase dans la membrane plasmique. Le précurseur de S1P, la sphingosine, est ensuite produit après deacétylation de la céramide par une céramidase. La reconversion de la sphingosine en céramide se fait par la céramide synthase. S1P est synthétisée dans la plupart des tissus et sa concentration intracellulaire est étroitement régulée par des enzymes [Figure 12]. En effet, il y a un équilibre entre sa synthèse par des sphingosine kinases (SphK1 et SphK2), sa reconversion en sphingosine par des S1P phosphatases (SPP1 et SPP2) et sa dégradation par la S1P lyase en phosphoéthanolamine et hétéradécéanal (Mandala 2001; Spiegel et Milstien 2003b) qui peuvent être ensuite métabolisés en glycérol et phospholipides. Il existe également des lipide-phosphate phosphatases LPP1,2 et 3 qui peuvent déphosphoryler S1P. LPP3 permet notamment le maintien d'un faible taux de S1P dans le thymus favorisant la sortie des lymphocytes T matures dans la circulation (Breart, Ramos-Perez et al. 2011). Alors que S1P induit la prolifération cellulaire et la survie, la céramide et la sphingosine sont des métabolites pro-apoptotiques; leurs quantités relatives régulent la survie et le développement cellulaire en réponse à des variations environnementales et cellulaires (Kim, Takabe et al. 2009). La SphK1 est notamment un régulateur important de ce « rhéostat sphingolipidique » et est surexprimée dans de nombreux cancers (French, Schrecengost et al. 2003). De nombreuses cytokines inflammatoires comme l'IL-1, le TNF α (tumor necrosis factor α) et le VEGF (vascular endothelial growth factor) peuvent activer la SphK1 pour convertir la sphingosine en S1P (Brinkmann 2007).

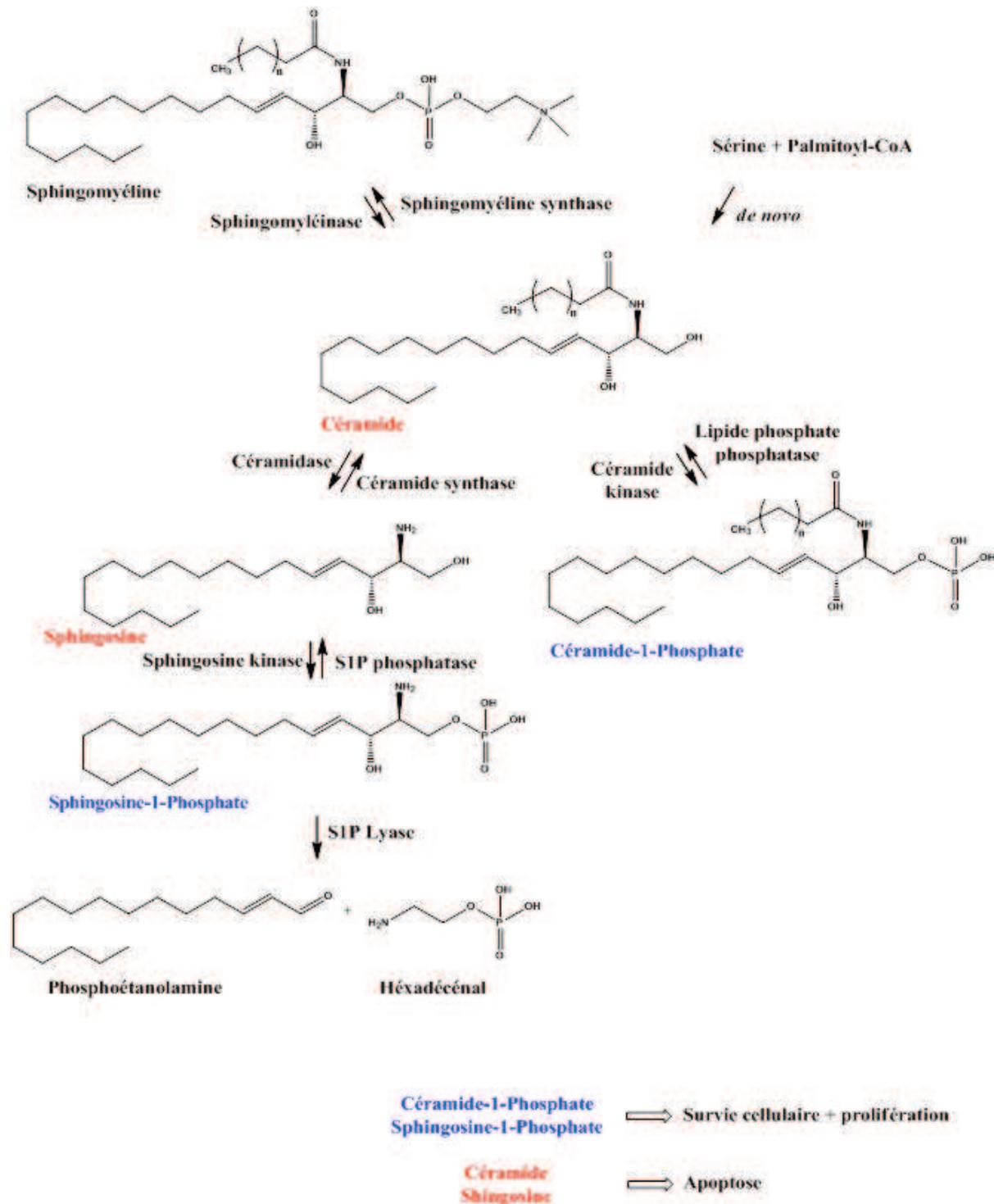


Figure 12 : Schéma de synthèse de la sphingosine-1-phosphate

La première étape de la synthèse de S1P est la formation de la céramide *de novo* ou à partir de la sphingomyéline par une sphingomyéline synthase. La déacétylation de la céramide par une céramidase permet la formation de la sphingosine qui est ensuite phosphorylée par des sphingosines kinases (SphK1 ou SphK2) pour obtenir S1P. Il existe un équilibre étroitement régulé entre sa formation, sa dégradation et sa reconversion en sphingosine.

II) Sources de S1P :

S1P est présent en quantité très faible dans la plupart des tissus (de l'ordre du nanomolaire), sauf dans le sang où il se trouve à une concentration comprise entre 100 nM et 1 μ M et dans la lymphe à une concentration de 30 à 300 nM (Rosen et Goetzl 2005; Pappu 2007). La faible concentration de S1P dans les tissus est due en partie à la forte activité de dégradation de la S1P lyase (Brewer 2012). Toutes les cellules sont capables de générer du S1P durant le métabolisme physiologique normal de la sphingomyéline mais les érythrocytes et les cellules endothéliales sont considérés comme la source majeure de S1P plasmatique dans les conditions normales (Yang, Yatomi et al. 1999; Pappu 2007; Venkataraman, Lee et al. 2008). Les plaquettes, qui contiennent de grandes quantités de SphK1 active et qui manquent d'enzyme de dégradation S1P lyase, contribuent à la synthèse accrue de S1P durant leur activation (Sano, Baker et al. 2002). Durant l'inflammation, les mastocytes sont également capables de produire S1P (Brinkmann 2007). Il faut également noter que S1P peut être produit extracellulairement à partir de la sphingosine et de l'ATP par la SphK1 relarguée constitutivement par l'endothélium vasculaire (Ancellin, Colmont et al. 2002).

III) Export de S1P :

S1P, molécule amphiphile, est partiellement soluble en solution aqueuse et plus de 98.5% de S1P est alors lié à des lipoprotéines, en particulier à des lipoprotéines de haute densité HDL, et à l'albumine (Murata, Sato et al. 2000). Ayant une tête polaire, S1P ne peut pas traverser les membranes hydrophobes sans assistance. Ainsi, son transport est régulé par différents transporteurs de la famille des ATP-Binding Cassette (ABC) (Kobayashi, Nishi et al. 2006; Mitra, Oskeritzian et al. 2006). Ces transporteurs contiennent deux domaines de liaison des nucléotides liant et hydrolysant l'ATP et deux domaines transmembranaires constitués chacun d'un groupe d'hélices alpha créant six ponts disulfures et formant un canal utilisé pour le transport de substrat à travers la membrane. L'inhibition d'expression par siRNA de différents transporteurs de la famille ABC (ABCA1, ABCC1, ABCG2 et ABCB1) diminue le relargage de S1P (Honig, Fu et al. 2003; Mitra, Oskeritzian et al. 2006;

Sato, Malchinkhuu et al. 2007; Takabe, Kim et al. 2010; Hisano, Nishi et al. 2012). Aussi, un transporteur de la famille des spinster : Spns2 (Spinster homolog 2), par un mécanisme indépendant de l'ATP, est également responsable de l'export de S1P des cellules pour maintenir une quantité suffisante de S1P dans le sang, la lymphe et les ganglions lymphatiques (Kawahara, Nishi et al. 2009; Fukuhara, Simmons et al. 2012; Hisano, Kobayashi et al. 2012; Nijnik, Clare et al. 2012; Nagahashi, Kim et al. 2013). Il a également été décrit que Spns2 est capable de transporter de nombreux analogues de S1P, comme le ligand FTY720p (Hisano, Kobayashi et al. 2011).

IV) Rôles de S1P :

S1P est un second messenger intracellulaire qui contrôle notamment l'homéostasie calcique (Ghosh, Bian et al. 1994; Spiegel et Milstien 2003b). S1P peut également agir directement sur des cibles moléculaires dans le noyau pour influencer l'expression de certains gènes (Maceyka, Harikumar et al. 2011; Pyne et Pyne 2011). Ainsi, S1P produit par la kinase SphK2 peut réguler, dans certains cas, l'acétylation d'histones et la transcription génique. En effet, S1P se lie et inhibe les histones deacétylases HDAC1 et son homologue HDAC2 dans des complexes répresseurs situés au niveau des promoteurs des gènes codant pour l'inhibiteur de kinase dépendant de la cycline p21 et pour le régulateur transcriptionnel c-fos. L'augmentation de l'acétylation des histones entraîne ainsi l'expression de p21 et de c-fos (Hait, Allegood et al. 2009). Ceci montre que S1P produit dans le noyau par SphK2 influence l'équilibre dynamique de l'acétylation des histones et ainsi la régulation de certains gènes cibles spécifiques.

S1P est également un ligand d'affinité de l'ordre du nanomolaire de 5 récepteurs RCPG de classe A: les récepteurs S1P₁₋₅ (Spiegel et Milstien 2003b; Rosen, Gonzalez-Cabrera et al. 2009). Ces récepteurs, S1PR, parfois exprimés simultanément dans les cellules, sont couplés à différentes protéines G hétérotrimériques [Figure 13]. Ainsi, S1P, qui agit de manières paracrine et autocrine, est un médiateur de la migration cellulaire, de l'adhésion, de la prolifération, de la survie, de la maturation, de l'angiogenèse et de la perméabilité vasculaire (Hla 2003; Spiegel et Milstien 2003a; Spiegel et Milstien 2003b).

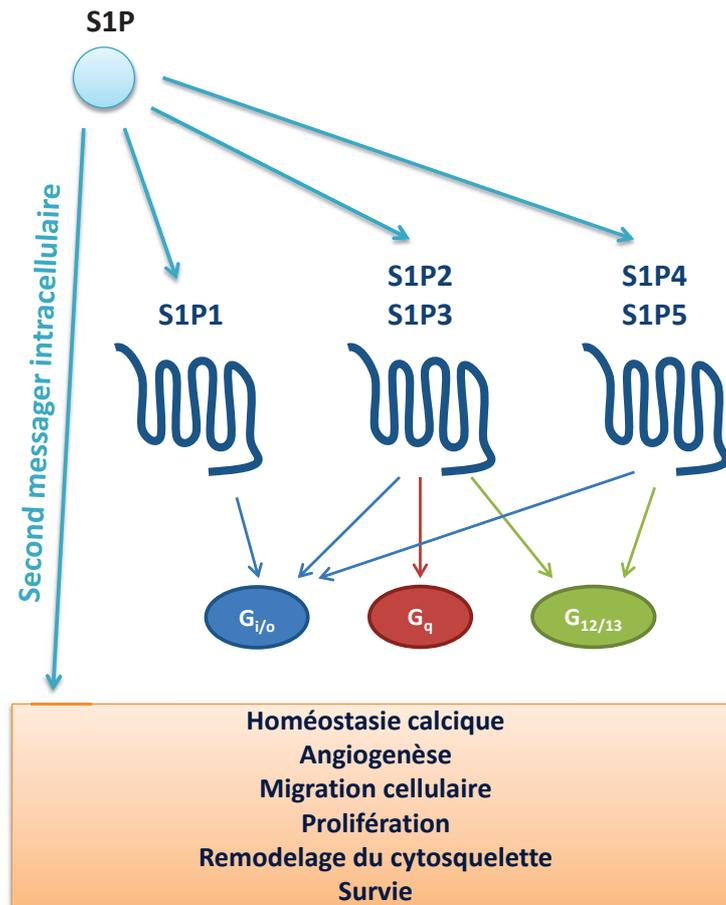


Figure 13 : Fonctions de S1P en tant que messenger secondaire et ligand des S1PR

De part ses fonctions de second messenger intracellulaire ou de ligand des récepteurs S1PR, S1P régule de nombreuses fonctions comme l'homéostasie calcique, l'angiogenèse, la migration cellulaire, la prolifération, le remodelage du cytosquelette et la survie cellulaire.

Les différents récepteurs de la Sphingosine-1-Phosphate :

a. S1P1/EDG1.

S1P1 (ou EDG1 : endothelial differentiation gene 1) est un récepteur exprimé à la surface de nombreux types cellulaires dont les cellules endothéliales, et la plupart des cellules du système immunitaire incluant les lymphocytes T et B, les cellules NK (natural killer), les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles (Zhang, Contos et al. 1999; Liu, Wada et al. 2000; Matloubian, Lo et al. 2004; Choi, Lee et al. 2008). L'ARNm de S1P1 est trouvé dans de nombreux organes comme le cerveau, les poumons, la rate, les reins, le foie et le cœur (Kluk et Hla 2002; Brinkmann 2007).

La protéine S1P1 humaine contient 381 acides aminés et partage 94% de sa séquence avec le récepteur murin (Chun, Hla et al. 2010). La structure cristallographique du récepteur S1P1 lié à un antagoniste a récemment été obtenue et est d'une grande aide, notamment pour le développement de nouveaux ligands spécifiques de S1P1 (Hanson, Roth et al. 2012). Ce récepteur est associé exclusivement à la protéine $G_{\alpha i}$. Sa stimulation accroît l'activité de PLC, via la sous-unité $G_{\beta/\gamma}$, qui augmente le calcium intracellulaire libre, d'ERK qui induit la prolifération, de la phosphatidylinositol-3-kinase (Pi3K) et de la petite GTPase Rac qui permettent la migration et la vasodilatation, et de la protéine kinase Akt qui entraîne la survie. Par ailleurs, la stimulation de S1P1 inhibe l'AC qui entraîne la diminution de l'AMPc [Figure 14] (Okamoto, Takuwa et al. 1998; Windh, Lee et al. 1999; Kluk et Hla 2002).

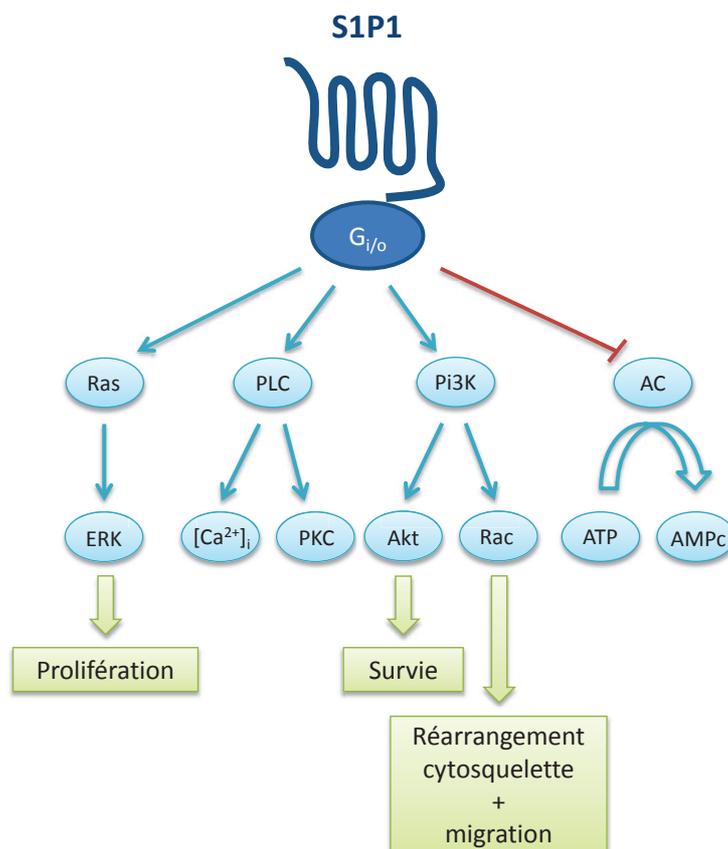


Figure 14 : Cascade de signalisation de S1P1

Le récepteur S1P1 est couplé à la protéine $G_{\alpha i}$ et régule ainsi de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la survie, le remodelage du cytosquelette et la migration cellulaire.

Une étude de knock-out chez la souris a tout d'abord montré le rôle de S1P1 dans la maturation vasculaire (Liu, Wada et al. 2000). En effet, les souris S1P1^{-/-} meurent au stade embryonnaire (entre les jours 12.5 et 14.5) d'une hémorragie massive due à un défaut de recrutement des cellules musculaires lisses. Pour étudier l'effet de S1P1 et contrer l'effet létal de son KO, les équipes ont eu recours au système de recombinaison Cre/Lox⁴ pour inactiver le gène *S1P1* spécifiquement dans le type cellulaire souhaité (Allende, Yamashita et al. 2003; Allende, Dreier et al. 2004). Ce système, ainsi que l'étude de son expression dans des cellules primaires, a mis en évidence le rôle de S1P1 dans l'angiogénèse, dans l'intégrité de la barrière endothéliale et dans la migration des cellules T et B (Lee, Thangada et al. 1999; Liu, Wada et al. 2000; Garcia, Liu et al. 2001; Allende, Yamashita et al. 2003; Allende, Dreier et al. 2004; Matloubian, Lo et al. 2004; Singleton, Dudek et al. 2005) [Figure 15][Tableau 4].

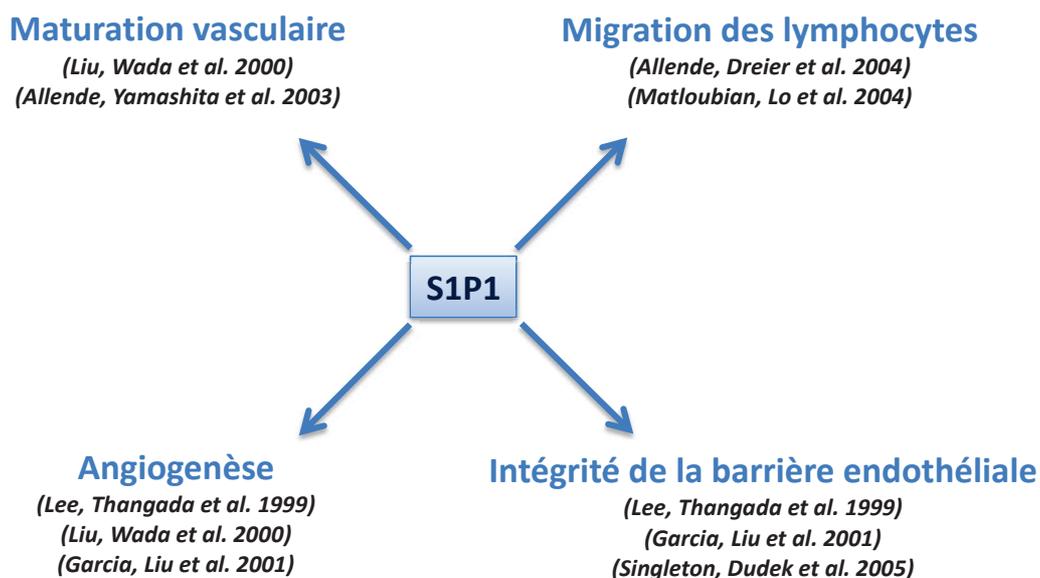


Figure 15 : Rôles majeurs de S1P1

Les fonctions majeures de S1P1 sont le contrôle de la sortie des lymphocytes T des organes lymphoïdes secondaires et des thymocytes du thymus, de la maturation vasculaire, de l'angiogénèse et de l'intégrité de la barrière endothéliale.

⁴ Dans le système de recombinaison Cre/Lox, on croise une souris LoxP/LoxP (dont le gène d'intérêt est inséré entre deux sites loxP par recombinaison homologe) avec une souris Cre (dont le site codant pour la protéine Cre se trouve sous le contrôle d'un promoteur spécifique du type cellulaire choisi). Lorsqu'elle est exprimée, la protéine recombinase Cre coupe l'ADN au niveau des sites loxP entraînant une délétion du gène d'intérêt. On obtient alors dans certaines populations l'inactivation du gène spécifiquement dans le type cellulaire choisi.

S1P1 est également régulé par le facteur de transcription Krüppel-like factor 2 (KLF2) qui active sa transcription dans les cellules T (Bai, Hu et al. 2007). On peut également noter que lors de la stimulation des cellules T, le marqueur d'activation CD69 (cluster of differentiation 69) forme des complexes avec S1P1 entraînant alors son internalisation, ce qui empêche la sortie des lymphocytes des ganglions lymphatiques. Aussi, lors de la maturation des thymocytes, il y a tout d'abord expression de CD69 permettant la sélection des thymocytes puis, la surexpression de KLF2 permet l'expression de S1P1 entraînant la réduction d'expression de CD69 membranaire et la sortie des T naïfs du thymus (Spiegel et Milstien 2011).

b. S1P2/EDG5.

L'expression de S1P2 est détectée dans de nombreux organes comme le cœur, les poumons, le thymus, les intestins et le cerveau (Zhang, Contos et al. 1999; Kluk et Hla 2002). S1P2 est notamment le récepteur dominant dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Okamoto, Takuwa et al. 2000). S1P2 est exprimé à la surface des mastocytes, des macrophages, des cellules dendritiques et des éosinophiles (Rosen et Goetzl 2005).

La protéine S1P2 humaine contient 353 acides aminés et est très conservée parmi les différentes espèces (Chun, Hla et al. 2010). L'analyse séquentielle a montré que S1P2 partage 50 à 60% d'homologie avec S1P1 (Kluk et Hla 2002). S1P2 transduit ses signaux via les protéines $G_{\alpha i}$, G_q et $G_{12/13}$. Sa stimulation augmente notamment l'activité de PLC, de la kinase c Jun Nterm (JNK) membre de la famille MAPK et d'ERK et régule négativement l'activité de Rac (Gonda, Okamoto et al. 1999; Windh, Lee et al. 1999). S1P2 module ainsi la prolifération, la survie et la migration cellulaire.

Bien que les souris déficientes en S1P2 naissent sans défaut physiologique ou anatomique apparent, elles développent spontanément et occasionnellement des attaques mortelles entre 3 et 7 semaines d'âge (MacLennan, Carney et al. 2001; Choi, Lee et al. 2008; Akahoshi, Ishizaki et al. 2011). De plus, S1P2 étant essentiel pour le développement de l'oreille interne, cette déficience entraîne la surdité des souris (Herr, Grillet et al. 2007).

L'activation de S1P2 s'oppose généralement aux effets de l'activation de S1P1. Ainsi, S1P2 inhibe via $G_{12/13}$ la migration cellulaire induite par les récepteurs S1P1 et S1P3 via G_i (Okamoto, Takuwa et al. 2000). De même, la stimulation de S1P2 et S1P3 via $G_{12/13}$ active la GTPase Rho et la kinase associée à Rho, ROCK, ce qui perturbe les jonctions cellulaires et diminue les adhésions intercellulaires alors que la stimulation de S1P1 via G_i induit des jonctions serrées ce qui stabilise les connexions intercellulaires et augmente les fonctions de la barrière endothéliale (Brinkmann 2007; Zhang, Yang et al. 2013) [Tableau 4].

c. S1P3/EDG3.

S1P3 est exprimé dans de nombreux tissus comme les poumons, la rate, le cœur, les intestins et les reins (Zhang, Contos et al. 1999). Il est exprimé à la surface des éosinophiles, de quelques cellules B et de quelques cellules dendritiques (Rosen et Goetzl 2005).

La protéine S1P3 humaine contient 378 acides aminés et partage 92% d'homologie avec le récepteur murin (Chun, Hla et al. 2010). La séquence en acides aminés de S1P3 est similaire à 50% avec celles de S1P1 et S1P2 (Kluk et Hla 2002). S1P3 est associé à différentes protéines G comme les protéines G_{α_i} , G_q et $G_{12/13}$. Sa stimulation est donc comparable à celle de S1P2 à l'exception d'un effet activateur de Rac (Windh, Lee et al. 1999).

Les souris déficientes en S1P3 se développent normalement et n'ont pas d'anomalie phénotypique apparente à part une légère diminution de taille (Ishii, Friedman et al. 2001; Choi, Lee et al. 2008) [Tableau 4].

d. S1P4/EDG6.

S1P4 a une expression plus limitée que les précédents S1PR. Son ARNm a été détecté dans les poumons, le thymus, la moelle osseuse et la rate et aucune expression n'a été trouvée dans le cerveau, le cœur, le foie, les reins et la peau (Kluk et Hla 2002). Il est majoritairement exprimé à la surface des lymphocytes T et B, des

cellules hématopoïétiques, des macrophages, des cellules NK et des cellules dendritiques (Graler, Bernhardt et al. 1998; Rosen et Goetzl 2005).

La protéine S1P4 humaine contient 384 acides aminés et partage 82% d'homologie avec le récepteur S1P4 murin (Chun, Hla et al. 2010). S1P4 active ERK et PLC via les protéines $G_{\alpha i}$ et $G_{12/13}$.

La déficience de S1P4 chez la souris n'affecte ni la structure des organes lymphoïdes secondaires ni le nombre de lymphocytes dans le sang périphérique. Alors que cette déficience n'affecte pas significativement la migration des lymphocytes T, elle modifie la migration des cellules dendritiques et la sécrétion de cytokines (Schulze, Golfier et al. 2011) [Tableau 4].

e. S1P5/EDG8.

S1P5 est surtout présent à la surface des cellules du système nerveux central, en particulier les oligodendrocytes, et à la surface des monocytes et des cellules NK (Im, Heise et al. 2000; Rosen et Goetzl 2005; Walzer, Chiossone et al. 2007).

La protéine S1P5 humaine contient 398 acides aminés (Chun, Hla et al. 2010). S1P5 transduit ses signaux via les protéines $G_{\alpha i}$, et $G_{12/13}$ (Malek, Toman et al. 2001). Via $G_{\alpha i}$, S1P5 inhibe l'AC et via $G_{12/13}$, il inhibe ERK et active JNK.

Les souris déficientes en S1P5 n'ont pas de phénotype particulier apparent (Choi, Lee et al. 2008). Des études *in vitro* de délétion de S1P5 dans différents types cellulaires ont montré son rôle dans la survie et la migration des oligodendrocytes et dans la migration des cellules NK vers les sites d'inflammation (Novgorodov, El-Alwani et al. 2007; Walzer, Chiossone et al. 2007) [Tableau 4].

	S1P1	S1P2	S1P3	S1P4	S1P5
Signalisation (protéine G)	Gi	Gi, Gq, G12/13	Gi, Gq, G12/13	Gi, G12/13	Gi, G12/13
Rôles physiologiques	Migration des lymphocytes, maturation vasculaire, angiogenèse, intégrité barrière	Prolifération, survie, migration	Prolifération, survie, migration	Migration des DC	Survie, migration des oligodendrocytes et des NK
Expression (tissus)	Large	Large	Large	Poumons, thymus, moelle osseuse, rate	Système nerveux central et cellules NK
Souris KO	Léthal	Quelques attaques, surdité	Diminution de taille	Migration des DC et sécrétion de cytokines modifiées	Pas de phénotype apparent

Tableau 4 : Récapitulatif des caractéristiques des différents S1PR

V) Les ligands des S1PR :

a. Différents agonistes et antagonistes des S1PR.

De nombreuses molécules ont été développées en tant qu'agonistes ou antagonistes de S1PR [Tableau 5]. La plus étudiée est FTY720p, agoniste de S1P1,3,4 et 5. SEW2871, non structuralement lié à S1P, est un agoniste spécifique de S1P1 qui induit la lymphopénie chez la souris (Sanna, Liao et al. 2004). Comme S1P, SEW2871 entraîne l'internalisation de S1P1 puis son recyclage, contrairement à FTY720p qui entraîne l'internalisation puis la dégradation de S1P1. CYM-5442 est également un agoniste spécifique de S1P1 qui n'a pas besoin de phosphorylation pour se lier à son récepteur, contrairement à FTY720 (Welch, Sim-Selley et al. 2012). KRP-203, structuralement semblable à FTY720, est, sous sa forme phosphorylée, un agoniste de S1P1 et S1P4 et S1P5. Par son effet sur S1P1, KRP-203p induit également une lymphopénie (Huwiler et Pfeilschifter 2008). Lorsqu'il est phosphorylé par la SphK2, VPC01091p est un agoniste de S1P1 et S1P4, un agoniste partiel de S1P5 et un antagoniste de S1P3 (Welch, Sim-Selley et al. 2012). W146 est un antagoniste compétitif spécifique de S1P1 alors que son énantiomère W140 est un isomère inactif. VPC23019 est un analogue de S1P qui agit en tant qu'antagoniste compétitif de S1P1 et S1P3 (Davis, Clemens et al. 2005). VPC23019 est un

antagoniste de S1P1 et S1P3 et inhibe la migration cellulaire induite par les agonistes de S1P1 (Huwiler et Pfeilschifter 2008).

On peut également neutraliser le S1P endogène par un anticorps monoclonal spécifique, le Sphingomab. Cet anticorps induit une lymphopénie par inactivation du S1P dans les organes lymphoïdes secondaires (Sensken, Nagarajan et al. 2011) et est efficace pour le traitement de nombreuses tumeurs solides chez la souris (Visentin, Vekich et al. 2006).

	S1P1	S1P2	S1P3	S1P4	S1P5	Références
FTY720p	Antagoniste fonctionnel		Agoniste	Agoniste	Agoniste	(Brinkmann, Davis et al. 2002)
S1P, dihydroS1P	Agoniste	Agoniste	Agoniste	Agoniste	Agoniste	(Kluk et Hla 2002)
KRP-203p	Agoniste			Agoniste	Agoniste	(Huwiler et Pfeilschifter 2008; Song, Matsuda et al. 2008)
AFD-R	Agoniste		Agoniste	Agoniste	Agoniste	(Brinkmann, Davis et al. 2002)
AUY954	Agoniste					(Pan, Mi et al. 2006; Zhang, Zhang et al. 2009)
VPC23153	Agoniste partiel		Agoniste partiel			(Welch, Sim-Selley et al. 2012)
VPC01091p	Agoniste		Antagoniste	Agoniste	Agoniste partiel	(Im 2010)
SEW2871	Agoniste					(Sanna, Liao et al. 2004)
CYM-5442	Agoniste					(Gonzalez-Cabrera, Jo et al. 2008)
CYM-5181	Agoniste					(Im 2010)
RPC-1063	Agoniste					(Welch, Sim-Selley et al. 2012)
BAF312	Agoniste				Agoniste	(Fryer, Muthukumarana et al. 2012)
CYM-5520			Agoniste			(Satsu 2013)
NIBR-0213	Antagoniste					(Quancard, Bollbuck et al. 2012)
VPC23019	Antagoniste		Antagoniste	Agoniste	Agoniste partiel	(Davis, Clemens et al. 2005)
VPC25239	Antagoniste		Antagoniste	Agoniste	Agoniste partiel	(Davis, Clemens et al. 2005)
VPC44116	Antagoniste		Antagoniste		Agoniste partiel	(Awad, Ye et al. 2006; Im 2010)
VPC03090	Antagoniste		Antagoniste		Antagoniste partiel	(Kennedy, Zhu et al. 2011)
BML-241	Antagoniste		Antagoniste			(Huwiler et Pfeilschifter 2008)
W123	Antagoniste					(Huwiler et Pfeilschifter 2008)
W146	Antagoniste					(Gonzalez-Cabrera, Jo et al. 2008)
TASP0251078	Antagoniste					(Fujii, Ohtake et al.)
CAY10444			Antagoniste			(Welch, Sim-Selley et al. 2012)
JTE 013		Antagoniste				(Ohmori, Yatomi et al. 2003)

Tableau 5 : Agonistes et antagonistes des S1PR

b. FTY720.

L'effet de S1P sur la migration lymphocytaire a été identifié grâce au travail sur le Fingolimod FTY720 (2-amino-2-[2-(4-octylphenyl)ethyl]propane-1,3-diol) (Brinkmann, Cyster et al. 2004). FTY720 est une molécule immunomodulatrice approuvée par la FDA en Septembre 2010 et utilisée contre la sclérose en plaque sous le nom Gilenya®, commercialisée par Novartis (Skoura et Hla 2009; Chun et Brinkmann 2011). Cette maladie auto-immune est caractérisée par la démyélinisation et la dégénération des cellules du système nerveux central. FTY720 a été développé en tant qu'analogue du composé naturel myriocine (ISP-1) mais avec un effet moins toxique et plus immunosuppresseur. Contrairement à la myriocine, FTY720 n'inhibe pas l'activité de la sérine palmitoyltransférase et n'induit pas l'apoptose aux concentrations physiologiques utilisées. FTY720 n'inhibe pas l'activation, la prolifération ni la formation de T mémoires (Pinschewer, Ochsenbein et al. 2000; Chun et Brinkmann 2011). Après une rapide mono-phosphorylation énanti-spécifique par la kinase SphK2, FTY720p, analogue structural de S1P, devient un agoniste de forte affinité de S1P1 (0.3 nM), S1P3 (3.1 nM), S1P4 (0.6 nM) et S1P5 (0.3 nM) mais ne se lie pas à S1P2 (Brinkmann 2007). En tant qu'« antagoniste fonctionnel » de S1P1, il entraîne la phosphorylation et la polyubiquitinylation en C terminal du récepteur, l'endocytose via la cascade dépendant de la β -arrestine puis la dégradation par protéolyse de S1P1 (Graler et Goetzl 2004; Matloubian, Lo et al. 2004; Oo, Thangada et al. 2007; Oo, Chang et al. 2011). En effet, après internalisation, les récepteurs peu ubiquitinylés, comme dans le cas du récepteur S1P1 stimulé par S1P, recyclent du compartiment endosomal tardif à la membrane plasmique alors que les récepteurs très ubiquitinylés sont conduits aux lysosomes puis dégradés, comme dans le cas de S1P1 stimulé par FTY720p [Figure 16].

On observe alors une lymphopénie et une séquestration des cellules T dans les organes lymphoïdes, empêchant ainsi l'infiltration intracérébrale des lymphocytes T auto-réactifs et la démyélinisation (Chiba, Yanagawa et al. 1998; Mandala, Hajdu et al. 2002). FTY720p agit également en tant qu'agoniste de S1P1 pour augmenter les fonctions de la barrière endothéliale, réduire la transmigration des lymphocytes et ainsi induire la lymphopénie (Singer, Tian et al. 2005). De plus, les lymphocytes T de souris S1P1^{-/-} ne circulent plus dans les vaisseaux lymphatiques et s'accumulent

dans les organes lymphoïdes. Cette étude a alors confirmé le rôle majeur de S1P1 dans la régulation du trafic des cellules T. Il a alors été proposé que le S1P présent dans le sang et la lymphe stimule S1P1 exprimé sur les lymphocytes, entraînant leur sortie du thymus vers le sang et des ganglions lymphatiques vers la lymphe (Brinkmann, Cyster et al. 2004; Matloubian, Lo et al. 2004). Grâce à sa nature lipophile, FTY720 traverse la barrière hémato-encéphalique et internalise S1P1 dans les cellules neuronales et les astrocytes. Par son effet immunosuppresseur, FTY720 est également utilisé contre le rejet lors des transplantations d'organes et est en essai pour le traitement d'allergies et de plusieurs autres maladies inflammatoires (Brinkmann 2007).

On peut également noter que, selon l'agoniste utilisé, on active l'une ou l'autre voie de signalisation. Ainsi, alors que S1P stimule les voies de signalisation passant par les protéines G_i , G_q et $G_{12/13}$ via S1P3, FTY720p ne stimule que la protéine G_i et antagonise l'effet de S1P sur la voie G_q (Sensken, Staubert et al. 2008). De même, alors que S1P3 est internalisé par S1P, il ne l'est pas par FTY720p (Sensken, Staubert et al. 2008). Ceci confirme l'existence de plusieurs états d'activation des récepteurs stabilisés par tel ou tel ligand qui peuvent stimuler différentes voies de signalisation.

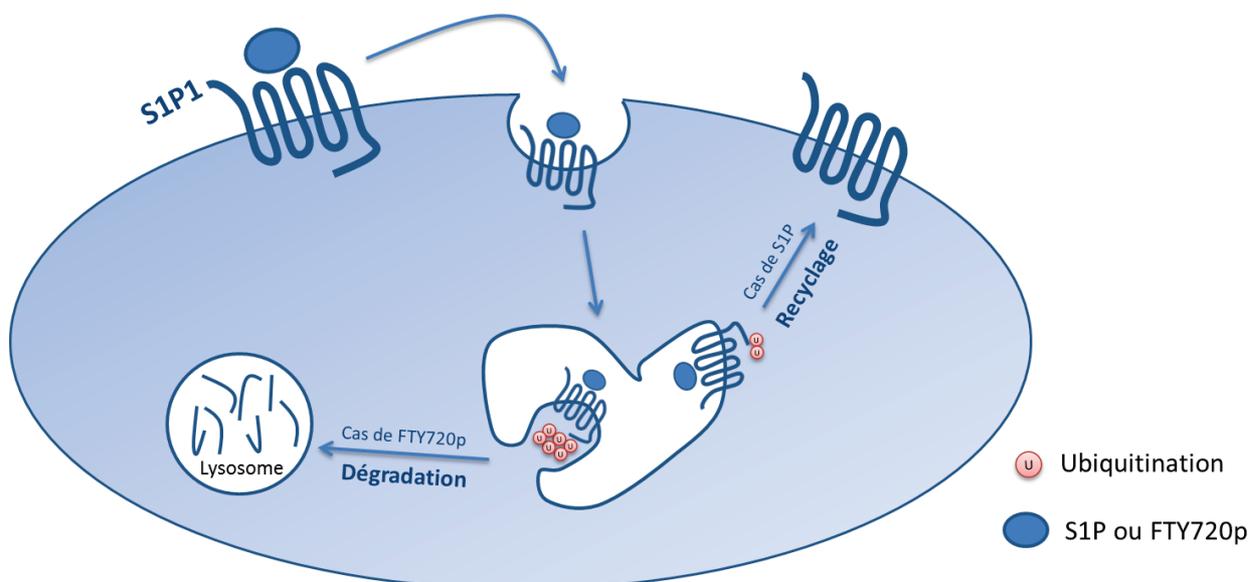


Figure 16 : Modulation de l'expression de S1P1 par ses ligands

S1P entraîne l'internalisation de S1P1 puis son recyclage alors que FTY720p induit sa dégradation. Cette différence semble provenir d'une ubiquitination différente en C terminal du récepteur selon le ligand utilisé.

VI) S1PR et migration des cellules du système immunitaire :

Les lymphocytes naïfs circulent continuellement dans le corps pour atteindre les organes lymphoïdes secondaires, sites d'initiation de la réponse immunitaire. Ils passent ensuite de 8h à 24h à explorer les organes lymphoïdes à la recherche d'antigènes. La plupart des lymphocytes naïfs ne détectent pas d'antigène spécifique et ressortent dans la circulation pour surveiller un autre organe lymphoïde. Si un lymphocyte naïf rencontre un antigène, il est alors séquestré dans l'organe lymphoïde secondaire pendant plus longtemps pour permettre une prolifération et une différenciation en cellules effectrices. Ces lymphocytes activés quittent ensuite le tissu lymphoïde et migrent vers les sites d'inflammations pour exercer leurs fonctions effectrices. La sortie des lymphocytes des organes lymphoïdes est essentielle pour l'immuno-surveillance des organes. De même, les thymocytes ont besoin de sortir du thymus pour exercer leurs fonctions (Cyster 2005; Cyster et Schwab 2011; Brewer 2012).

a. Export des lymphocytes T hors des organes lymphoïdes.

Par l'intermédiaire des S1PR, S1P joue un rôle important dans la migration des cellules immunitaires. De nombreuses études ont tout d'abord montré que S1P1, exprimé à la surface des lymphocytes T, permet la sortie de ces lymphocytes du thymus et des organes lymphoïdes secondaires vers la lymphe et le sang (Allende, Dreier et al. 2004; Matloubian, Lo et al. 2004; Thangada, Khanna et al. 2010; Spiegel et Milstien 2011). En effet, cette migration est autorisée grâce à une faible concentration en S1P dans les organes lymphoïdes secondaires et à une plus forte concentration dans la lymphe et le sang périphérique (Hla, Venkataraman et al. 2008). L'expression transitoire de S1P1 sur les lymphocytes activés au sein des organes lymphoïdes secondaires permet donc leur remise en circulation dans la lymphe et le sang, compartiments où le récepteur est ensuite internalisé sous l'effet de la liaison avec S1P (Liu, Thangada et al. 1999). Plus précisément, la réexpression de S1P1 et la diminution d'expression coordonnée de CCR7 apparaît dans les cellules T activées qui ont réalisé plusieurs divisions cellulaires, favorisant une sortie rapide des cellules effectrices nouvellement générées (Pham, Okada et al. 2008;

Brinkmann, Billich et al. 2010). Ainsi, les signaux chimiotactiques opposés de S1P1 et de CCR7 déterminent le temps de transit des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires. De plus, *in vivo*, l'administration de l'agoniste S1P, qui internalise S1P1 à la surface des lymphocytes, entraîne rapidement une lymphopénie et la séquestration des lymphocytes dans les organes lymphoïdes secondaires, réduisant le nombre de lymphocytes dans le sang de 10 à 100 fois en quelques heures (Cyster 2005; Pham, Okada et al. 2008). Il semble également exister une migration passive des lymphocytes à travers des jonctions plus ou moins serrées de la barrière endothéliale. En effet, S1P1 joue un rôle dans le réarrangement du cytosquelette des cellules endothéliales et dans la formation des jonctions adhérentes intercellulaires (Marsolais et Rosen 2009). Par action de S1P sur le récepteur S1P1 à la surface des cellules endothéliales, les jonctions adhérentes se referment, empêchant la sortie des lymphocytes des organes lymphoïdes. Inversement, les antagonistes de S1P1 augmentent la perméabilité et permettent la migration cellulaire à travers les ganglions lymphatiques (Garcia, Liu et al. 2001; Sanchez, Estrada-Hernandez et al. 2003; Sanna, Wang et al. 2006) [Figure 17].

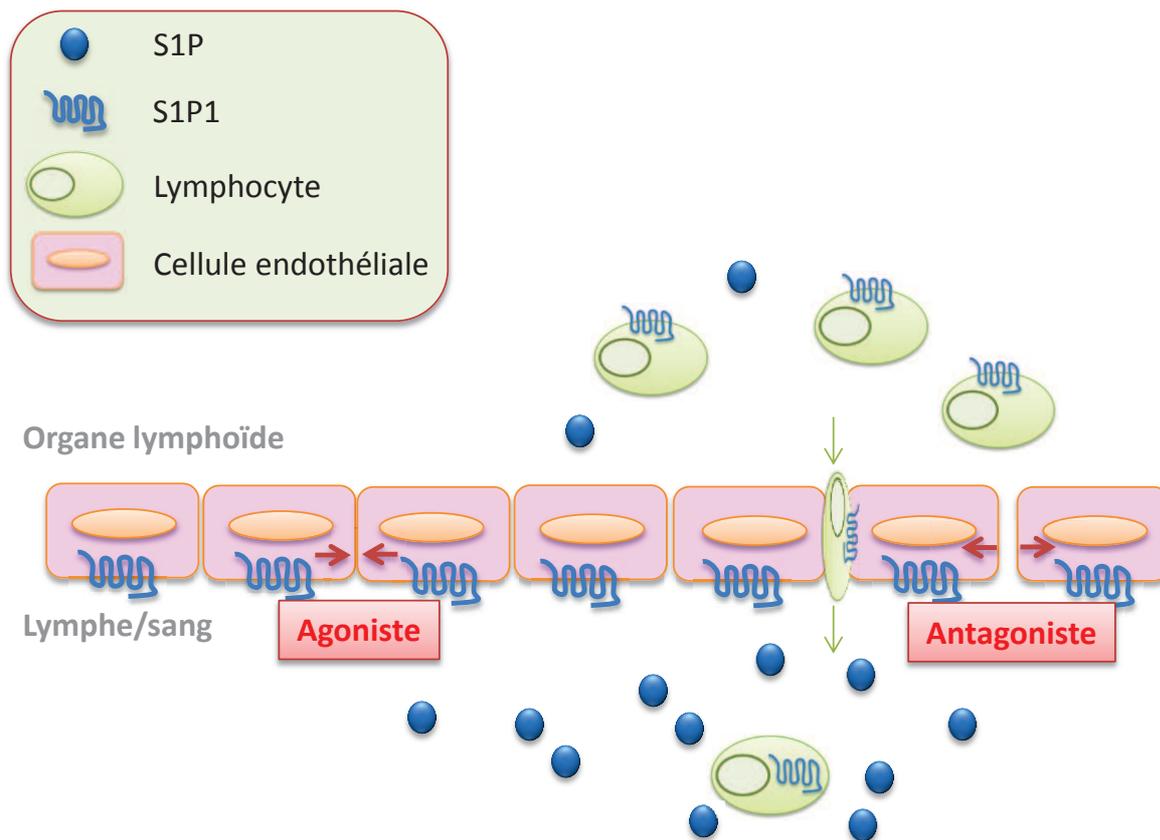


Figure 17 : sortie des lymphocytes des organes lymphoïdes

Le gradient de concentration de S1P entre les organes lymphoïdes et la lymphe permet la sortie des lymphocytes des organes lymphoïdes secondaires. S1P1 est ensuite internalisé dû à la forte concentration de S1P.

b. Localisation des lymphocytes B dans les organes lymphoïdes.

S1P est également important pour la localisation des lymphocytes dans les tissus lymphoïdes. La modulation cyclique de l'expression membranaire de S1P1 est notamment utilisée par les cellules B pour naviguer entre la zone marginale de la rate et les follicules lymphoïdes (Cinamon, Matloubian et al. 2004; Brewer 2012). Par ce mécanisme, les cellules B de la zone marginale transportent les antigènes du sang aux follicules où les cellules dendritiques folliculaires les présentent aux lymphocytes circulants. Une forte concentration en S1P dans la zone marginale entraîne l'internalisation de S1P1 à la surface des cellules B qui utilisent alors CXCR5 et son ligand CXCL13 pour migrer [Figure 18]. Les cellules B de la zone marginale migrent donc vers les follicules où CXCL13 est fortement exprimé car produit par les cellules dendritiques folliculaires. Dans cette zone où la concentration en S1P est faible,

S1P1 est alors ré-exprimé induisant le retour des cellules B dans la zone marginale (Rivera, Proia et al. 2008; Graler 2010; Spiegel et Milstien 2011). S1P3, qui est fortement exprimé à la surface des cellules B de la zone marginale a également un rôle dans le positionnement des lymphocytes B dans cette zone (Cinamon, Zachariah et al. 2008).

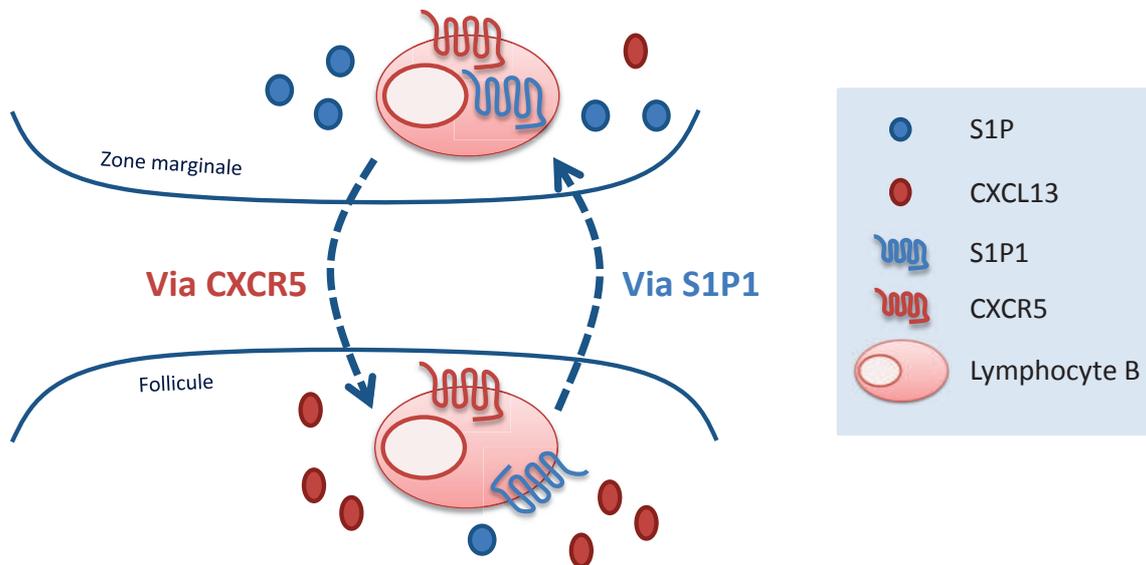


Figure 18 : Modulation de l'expression de S1P1 dans les cellules B de la zone marginale

Au sein d'un ganglion, les cellules B migrent entre la zone marginale et les follicules grâce à une expression transitoire de S1P1 selon la concentration de S1P, et l'utilisation de CXCR5 et de son ligand CXCL13.

c. Export des cellules NK des organes lymphoïdes.

Alors que la sortie des lymphocytes des organes lymphoïdes secondaires est régulée par l'expression de S1P1, il a été montré que S1P5, dont l'expression est dépendante de T-bet (ou TBX21 : T-box transcription factor), permet la sortie des cellules NK des organes lymphoïdes et de la moelle osseuse (Jenne, Enders et al. 2009). Une autre étude a également montré le rôle de ce récepteur dans la migration des cellules NK. En effet, alors que CXCR4 permet le maintien des cellules NK dans la moelle osseuse, S1P5 entraîne leur sortie. Ainsi, durant la différenciation des cellules NK, l'expression de CXCR4 est diminuée alors que celle de S1P5 est augmentée. Ces deux processus nécessaires à la sortie des cellules NK matures de la moelle osseuse sont coordonnés mais indépendants l'un de l'autre (Mayol, Biajoux et al. 2011).

d. Migration des autres cellules du système immunitaire.

S1P permet également la migration des cellules dendritiques par l'intermédiaire de S1P1 et S1P3 (Czeloth, Bernhardt et al. 2005; Maeda, Matsuyuki et al. 2007; Lan, Tokita et al. 2008). En particulier, S1P1 est nécessaire à la migration des cellules dendritiques matures, présentatrices d'antigènes, des tissus périphériques aux ganglions lymphatiques (Rathinasamy, Czeloth et al. 2010).

Par stimulation de différents S1PR, S1P joue un rôle dans la migration de nombreuses autres cellules comme les mastocytes (Jolly, Bektas et al. 2004), les monocytes (Ulrych, Bohm et al. 2011), les macrophages (Keul, Lucke et al. 2011), les éosinophiles (Roviezzo, Del Galdo et al. 2004) et les neutrophiles (Allende, Bektas et al. 2011). En effet, une étude a montré que la suppression de S1P4 diminue la neutrophilie et l'inflammation de souris déficientes en S1P lyase, impliquant S1P4 dans la migration des neutrophiles du sang vers les tissus (Allende, Bektas et al. 2011). Aussi, le traitement par FTY720 diminue la circulation des monocytes en bloquant leur sortie des organes hématopoïétiques (rate et moelle osseuse), par un effet indépendant de S1P3 (Lewis, Haxhinasto et al. 2013).

VII) Hétérodimérisation de S1P1 :

Il a été montré que de nombreuses cellules expriment plusieurs S1PR à leur surface. Ces récepteurs peuvent alors coopérer entre eux pour signaler suite à leur activation par S1P. Des études ont alors évalué la capacité de ces récepteurs à former des homodimères et des hétérodimères. Il a notamment été montré que S1P1 forme des homodimères, et des hétérodimères avec S1P2 et S1P3 (Van Brocklyn, Behbahani et al. 2002). Il a également été décrit que S1P1 forme des hétérodimères avec les récepteurs de la famille LPA (lysophosphatidic acid receptor) : LPA1, 2 et 3 et avec GPR4 et OGR1 (Zaslavsky, Singh et al. 2006).

Aucune interaction de S1P1 avec les corécepteurs CCR5 et CXCR4 n'a été décrite jusqu'alors.

Objectifs de la thèse

Dans l'infection par le VIH, les antirétroviraux ont été une révolution et ont permis un allongement considérable de la durée de vie des patients. Cependant, aucun traitement ne permet aujourd'hui d'éradiquer complètement le virus. Il semble alors essentiel de trouver et de développer de nouvelles approches thérapeutiques qui pourraient être combinées avec les antirétroviraux actuellement sur le marché.

Alors que les virions R5 utilisant le corécepteur CCR5 pour infecter les cellules sont détectés en début d'infection et sont retrouvés généralement tout au long de la maladie, les virions X4 utilisant le récepteur CXCR4 n'apparaissent que dans les étapes tardives et sont associés à une perte plus importante des lymphocytes T CD4. Dans la catégorie des inhibiteurs d'entrée ciblant les corécepteurs, seul le Maraviroc, antagoniste de CCR5, est approuvé en tant qu'antirétroviral et a déjà montré son efficacité antirétrovirale. Il semble donc utile de trouver d'autres approches pour cibler l'un ou l'autre des corécepteurs.

La première partie de cette thèse concerne le corécepteur CXCR4 et, plus particulièrement, étudie les deux isoformes de ce corécepteur : CXCR4-A et CXCR4-B. Nous avons voulu étudier les fonctions de ces deux isoformes présentes à la surface des PBMC en tant que corécepteurs du VIH et en tant que récepteurs de chimiokines.

Nous avons également voulu étudier les fonctions d'un RCPG qui modifie l'infection par les virions R5. Avant mon arrivée dans le laboratoire, l'équipe a réalisé un crible pour trouver les RCPG présents à la surface des lymphocytes T CD4 et des macrophages, interagissant avec CCR5 et capables de diminuer l'infection par le VIH. Parmi d'autres RCPG, la protéine S1P1 est sortie de cette étude. Ce récepteur, par son action sur la sortie des thymocytes matures du thymus et des lymphocytes des organes lymphoïdes secondaires, joue un rôle important dans l'immunité cellulaire. Ainsi, la deuxième partie de ma thèse porte sur l'effet de l'expression de S1P1 dans des lignées cellulaires et dans des cellules primaires sur l'infection par le VIH.

Matériels et méthodes

Cellules

Les lignées HOS CD4⁺ (Human OsteoSarcoma, AIDS Reagent Program, Rockville, MD), HEK 293T (simian virus 40 T antigen-transformed human embryonic kidney 293T, Genethon), HeLa-LTR-Luc (exprimant le gène rapporteur intégré *luciférase* sous le contrôle du promoteur LTR du VIH) (Tread, du Chene et al. 2006) et HeLa-P4 (cellules exprimant CXCR4 et possédant le gène *LacZ* sous le contrôle du promoteur LTR du VIH) (Clavel et Charneau 1994) ont été cultivées en milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF (sérum de veau foetal), 2 mmol/L L-glutamin (Lonza, ref. BE17-605E), 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Lonza, ref. DE17-602E) à 37°C et 5% CO₂. Les lignées humaines MT2 (lignée transformée par HTLV-1, virus T lymphotrope humain de type 1), MOLT (MOLT-4, lignée lymphocytaire T), H9 (cellules lymphocytaires T), SUPT1 (cellules lymphocytaires T), Jurkat (cellules lymphocytaires T), U937 (lignée monocytaire), THP1 (lignée monocytaire) et CEM (lignée lymphocytaire T) ont été cultivées en milieu RPMI supplémenté comme le DMEM, à 37°C sous 5% de CO₂.

Les PBMC humaines ont été isolées à partir de sang de donneurs sains par centrifugation de densité sur milieu de séparation des lymphocytes (Eurobio, ref. CMSMSL01-01) et cultivées à 2x10⁶ cellules/ml en milieu RPMI supplémenté comme le DMEM, à 37°C sous 5% de CO₂.

Pour obtenir des macrophages et des cellules dendritiques, les monocytes ont été isolés à partir de PBMC à l'aide de billes magnétiques anti-CD14 (Miltenyi, ref 130-050-201). La pureté des cellules CD14⁺ a été vérifiée par cytométrie de flux (FACSCalibur, BD Bioscience, Rungis, France) à l'aide d'un anticorps anti-CD14 (BD Biosciences, ref. 555395). Après s'être débarrassé des cellules non-adhérentes, les cellules ont été lavées et cultivées pendant 5 jours dans un milieu RPMI supplémenté comme précédemment auquel a été ajouté 10 ng/ml de GM-CSF (recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor, Immunotools, ref. 11343123) pour obtenir des macrophages ou pendant 7 jours avec 10 ng/ml de GM-CSF et 50 ng/ml IL4 (Immunotools, ref. 11340043) pour obtenir des cellules dendritiques. Pour obtenir des lymphocytes de ganglions, d'amygdale ou de rate, ces derniers ont été percés à l'aide d'une aiguille et rempli plusieurs fois de PBS pour en extraire les lymphocytes. Ces derniers ont ensuite été lavés dans du RPMI et

maintenu en culture comme précédemment. Les expressions membranaires de CD4, CCR5, CXCR4 et S1P1 ont été évaluées par cytométrie de flux (FACScalibur, BDBiosciences). Pour cela, 2×10^5 cellules ont été resuspendues dans du PBS supplémenté avec 0,2% BSA (bovine serum albumin, Sigma, ref. A4378) et marquées à l'aide des anticorps monoclonaux de souris anti-humain CD4-PE (Beckman Coulter, ref. A07751), anti-CCR5-PE-Cy5 (2D7, BD Pharmingen, ref. 556889), anti-CXCR4 (12G5, BD Pharmingen, ref. 555972) et anti-S1P1 (R&D, ref. MAB2016), respectivement, pendant 1h sur glace à une concentration finale de 10 µg/ml. Après lavage, les cellules marquées S1P1 et CXCR4 ont été incubées avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris IgG (H+L)-FITC (Beckman Coulter, ref. PN IM0819) au 1/100 pendant 1h sur glace. Les cellules ont ensuite été lavées, fixées dans une solution de fixation (BD Cell Fix, BD Biosciences, ref. 340181) et analysées au cytomètre FACSCalibur.

Tests des molécules pharmacologiques

Les molécules suivantes ont été utilisées aux cours des expériences : S1P (Enzo, vendu par Covalab ref. SL-140), FTY720-P (Echelon, ref. B-0721), FTY720 (Cayman, vendu par Interchim ref. BM8045), SEW2871 (Cayman, ref. 10006440), KRP-203p (Cayman, ref. 10010427), VPC23019 (Avanti, ref. 857360), W146 (Cayman, ref. 10009109), AMD3100 (Sigma, ref. A5602) et CXCL12 α (Peprotech, ref. 30028A).

Molécule	M	Solvant
S1P	379,5 g/mol	MeOH/H ₂ O (9/1)
FTY720p	387,5 g/mol	MeOH/H ₂ O (9/1)
FTY720	343,9 g/mol	H ₂ O
SEW2871	440 g/mol	EtOH
KRP-203p	523 g/mol	DMF
VPC23019	372 g/mol	DMSO
W146	456 g/mol	EtOH
AMD3100	794,5 g/mol	H ₂ O
SDF-1α	8 kDa	H ₂ O

Transduction

Pour produire des vecteurs VIH exprimant les gènes *CCR5*, *LacZ* et *S1P1*, les plasmides pWPXL-CCR5 (Desmetz, Lin et al. 2007), pHRCMV-LacZ (Naldini, Blomer et al. 1996) et pWPXL-S1P1 ont été co-transfectés avec le plasmide de packaging (ou d'empaquettement) pAX2 (qui inclut les gènes *gag*, *pol*, *rev* et *tat*) et le plasmide pMD2G qui code pour l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire, dans des cellules 293T par la méthode du phosphate de calcium. Pour construire le plasmide pWPXL-S1P1, la séquence codante de *S1P1* a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pCDNA3.1-S1P1 puis le fragment BamH1-Spe1 obtenu cloné dans le vecteur lentiviral pWPXL (addgene.org).

L'ADNc de CXCR4 a été obtenu du Dr. Nathaniel Landau par AIDS Research and Reference Reagent Program (Rockville, MD). Il a été amplifié en utilisant les oligonucléotides appropriés pour avoir CXCR4-A (correspondant à la séquence PubMed NM_001008540 du nucléotide 297 à 1375) et CXCR4-B (correspondant à la séquence PubMed NM_003467 du nucléotide 36 à 1154) et inséré en amont d'un promoteur CMV dans le vecteur lentiviral pHR-BX. Les plasmides pHR-CXCR4-A et pHR-CXCR4-B ont ensuite été co-transfectés comme précédemment pour obtenir les vecteurs pHIV-CXCR4-A et pHIV-CXCR4-B. Les surnageants ont été récoltés 2 jours après transfection et concentrés par ultracentrifugation sur sucrose (Sigma Aldrich, ref. S7903) pendant 1h30 à 17000 g et 4°C.

Les cellules HOS ont été plaquées dans une plaque de culture 24-puits et premièrement transduites avec le vecteur pHIV-CCR5 (Lin, Mettling et al. 2002) dans 8 µg/ml de polybrène (Sigma, ref. 107689). Les cellules ont ensuite été centrifugées à 200 g pendant 90 min à 30°C. La lignée obtenue a été re-transduite avec le vecteur pHIV-S1P1 ou le vecteur pHIV-LacZ avec des quantités égales de virus en équivalent p24 dans une solution à 8 µg/ml de polybrène (Sigma, ref. 107689). 24h après la transduction, les cellules ont ensuite été lavées et amplifiées.

Les cellules HOS ont également été transduites avec les mêmes quantités de vecteurs en équivalent p24 par pHIV-CXCR4-A et pHIV-CXCR4-B pour exprimer l'une ou l'autre des isoformes de CXCR4.

De même, les cellules HEK 293T CD4⁺ ont été transduites avec les vecteurs pHIV-S1P1 ou pHIV-LacZ, pHIV-CXCR4-A ou pHIV-CXCR4-B, avec les mêmes quantités en équivalent p24.

L'expression membranaire des récepteurs CCR5 et S1P1 a été évaluée en cytométrie de flux (FACScalibur, BDBiosciences) après marquage des cellules avec les anticorps monoclonaux de souris anti-humain CD195 (BD Pharmingen, ref. 556889) et anti-S1P1 (R&D, ref. MAB2016), respectivement. L'expression membranaire des récepteurs CXCR4-A et CXCR4-B a été évaluée à l'aide de l'anticorps anti-CXCR4 12G5 qui reconnaît les deux isoformes (BD Pharmingen, ref. 555972).

Les cellules HeLa-LTR-Luc ont également été transduites avec la même quantité en p24 des vecteurs pHIV-S1P1 et pHIV-LacZ. 24h après la transduction, les cellules ont été lavées et 96h après transduction, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a été évaluée dans ces extraits cellulaires à l'aide d'un kit de luciférase par lecture de la luminescence (Promega, ref. E1500). De même, les cellules HeLa-LTR-Luc ont été transduites avec les mêmes quantités des vecteurs pHIV-S1P1 et pHIV-LacZ ou des vecteurs pHIV-CXCR4-A et pHIV-CXCR4-B. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 24h avec 1 µg/ml de CXCL12 (Peprotech, ref. 30028A) et l'activité luciférase a été mesurée comme précédemment.

Production des virions pseudotypés et infection avec ces virus non répliatifs

Pour produire les virions non répliatifs R5-Luc, X4-Luc et VSV-GLuc, des cellules HEK 293T ont été co-transfectées à un ratio moléculaire 2:1 avec le plasmide de transfert pNL4.3 Luc.R⁻E⁻ qui porte un gène viral *env* défectif ainsi que le gène de la luciférase Firefly inséré dans le gène viral *nef* (AIDS Reagent Program), et soit avec le plasmide pCMV-AD8-*env* qui code pour l'enveloppe R5 du prototype AD8 HIV-1 (Choe, Farzan et al. 1996), soit avec le plasmide d'enveloppe X4, VB34 (NL4.3-Env), ou soit avec le plasmide d'enveloppe VSV-G, pMD2G (AIDS Research and Reference Reagent Program), respectivement. Les virions ont ensuite été collectés 48h après la transfection, filtrés (0,45 µm) puis utilisés tels quels ou concentrés sur

sucrose (Sigma Aldrich, ref. S7903) par centrifugation pendant 1h30 à 17000 g à 4°C.

Pour l'infection par des virus non répliquants, les cellules HOS et HEK 293T CD4⁺ ont été cultivées à une densité de 0.25×10^6 cellules/ml en triplicatas en plaque 96-puits, puis infectées avec différentes concentrations des virus R5-Luc, X4-Luc ou VSV-G Luc. Si nécessaire, les cellules ont été incubées avec différentes molécules aux concentrations indiquées pendant 1h avant l'infection. 24h après l'infection, les cellules ont été lavées deux fois avec du milieu de culture, et remises en culture pendant 48h. Les cellules ont alors été lavées une fois au PBS, lysées avec 50 µl de tampon, puis l'activité luciférase Firefly a été mesurée dans un luminomètre à l'aide du kit Promega (Luciferase Assay System, Promega, ref. E1500). La viabilité cellulaire a été quantifiée par un compteur automatique de cellules (Countess Automated Cell Counter, Invitrogen, ref. C10310) à l'aide de lames de comptage prévues à cet effet et de bleu trypan à 0,4% (Sigma, ref. T8154). Aucune différence n'a été détectée entre la viabilité des cellules traitées et des cellules traitées par un témoin négatif durant les périodes d'infection.

Transduction puis infection 24h après transduction des cellules HOS

Les cellules HOS CCR5⁺ ont été cultivées à 1×10^5 cellules/ml en triplicatas en plaques 96-puits et transduites comme précédemment à l'aide des vecteurs pHIV-S1P1 ou pHIV-LacZ avec des quantités égales de virus en équivalent p24 dans une solution à 8 µg/ml de polybrène (Sigma, ref. 107689). 24h après la transduction, les cellules, qui n'expriment pas encore S1P1 à leur surface, ont été lavées et infectées avec 50 ng/ml de R5-Luc. Les cellules ont ensuite été lavées 1h après l'infection et laissées en culture pendant 72h. Les cellules ont encore été lavées une fois au PBS, lysées avec 50 µl de tampon, puis l'activité luciférase Firefly a été mesurée dans un luminomètre comme décrit précédemment (Luciferase Assay System, Promega, ref. E1500).

Obtention des virions réplicatifs et infection

Le virus primaire HIV-R5 Ad8 a été obtenu par AIDS Research and Reference Reagent Program et a été amplifié dans les cellules HOS CD4⁺ CCR5⁺ (AIDS Research and Reference Reagent Program, Bethesda, Maryland, USA). Le virus primaire HIV-X4 NL4.3 a été obtenu par transfection de l'ADN HIV-X4 (AIDS Research and Reference Reagent Program) dans des HEK 293T par la méthode du phosphate de calcium. Le virus a ensuite été amplifié sur la lignée humaine CEM.

Les cellules HOS ont été plaquées dans une plaque 24-puits à une densité de 0.04×10^6 cellules/ml. Les cellules ont été infectées en triplicatas avec 10 ng/ml de virus réplicatif HIV-R5 ou HIV-X4 pendant 24h, lavées avec du PBS et cultivées pendant 10 jours ou plus avec ajustement du nombre de cellules deux fois par semaine. La production virale a été quantifiée par mesure de la concentration en gag p24 dans le surnageant de culture par utilisation d'un kit commercial ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay, Innotest HIV Antigen mAb, Ingen, ref. 80563).

Les PBMC ont été activées par incubation pendant 72h dans du milieu de culture additionné de 1 µg/ml phytohéماغglutinine M (PHA, Sigma, ref. 61764) et 100 U/ml d'IL2 (Peprotech, ref. 200-02), puis après un lavage au RPMI, incubées en plaques 96-puits en triplicatas à une densité de 1×10^6 cellules/ml. Les cellules ont ensuite été infectées avec les concentrations indiquées des virus réplicatifs HIV-R5 ou HIV-X4 pendant 18h, puis lavées deux fois au PBS et incubées pendant 11 jours en ajustant le nombre de cellules à chaque prélèvement du surnageant de culture deux fois par semaine. La production virale a été suivie dans le surnageant de culture par mesure de la concentration de la protéine gag p24 par ELISA au moyen d'un kit commercial (Innotest HIV Antigen mAb, Ingen, ref. 80563).

Test des molécules VLP-vpx puis infection des cellules dendritiques par un virus réplicatif HIV-R5

Pour pouvoir infecter des cellules dendritiques, il est nécessaire de dégrader le facteur de restriction SamHD1, à l'aide de vpx (Laguet, Sobhian et al. 2011). Des particules VLP-vpx ont été récupérées (M. Benkirane, CNRS, Montpellier) et testées

sur des cellules THP1. Pour cela, les cellules THP1 ont été différenciées en macrophages par incubation pendant 24h avec 30 ng/ml de Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA, SIGMA, ref. P8139). Les cellules adhérentes ont ensuite été pré-incubées pendant 2h avec les particules VLP-vpx ou les particules vides VLP-vide puis infectées avec 125 ng/ml de VSV-G-Luc. 24h après l'infection, l'activité luciférase Firefly a été mesurée dans un luminomètre comme décrit précédemment (Luciferase Assay System, Promega, ref. E1500).

Pour évaluer l'effet de S1P1 sur l'infection de cellules dendritiques, les cellules ont été isolées et différenciées comme précédemment. Les cellules dendritiques ont ensuite été plaquées à une densité de 0.5×10^6 cellules/ml dans une plaque 24-puits en triplicatas et pré-incubées 3h avant l'infection avec les particules VLP-vpx comme décrit par Laguette (Laguette, Sobhian et al. 2011) et incubées 1h avant l'infection avec 100 nM de FTY720p (Echelon, ref. B-0721). Les cellules ont ensuite été infectées avec 5 ng/ml de virus répliquatif HIV-R5. Les cellules ont ensuite été lavées et cultivées en RPMI. Deux fois par semaine, FTY720p ou son diluant (Méthanol/H₂O 9/1) a été ajouté au surnageant et la production virale a été suivie dans le surnageant de culture par mesure de la concentration de la protéine gag p24 par ELISA au moyen d'un kit commercial (Innotest HIV Antigen mAb, Ingen, ref. 80563). La viabilité cellulaire a été quantifiée dans un compteur automatique de cellules (Countess Automated Cell Counter, Invitrogen, ref. C10310) à l'aide de lames de comptage prévues à cet effet et de bleu trypan à 0,4% (Sigma, ref. T8154). Aucune différence n'a été détectée entre la viabilité cellulaire des cellules traitées et des cellules traitées par un témoin négatif durant les périodes d'infection.

Infection des HOS S1P1 et HOS LacZ par un virus ou par des cellules infectées

Pour voir s'il existe une différence entre les HOS S1P1 et HOS LacZ selon que l'infection se fait par un virus ou de cellules à cellules, des cellules MOLT ont été infectées à une densité de 0.2×10^6 cellules/ml avec 10 ng/ml de HIV-R5 Ad8 pendant 18h puis lavées et cultivées à la même densité pendant 6 jours. L'infection de ces cellules a été contrôlée à l'aide moyen du kit commercial Innotest (Innotest HIV Antigen mAb, Ingen, ref. 80563). Les cellules HOS S1P1 et HOS LacZ ont ensuite

été infectées comme précédemment avec 10 ng/ml de HIV-R5 Ad8 (infection de virus à cellules) ou avec 100.000 MOLT/ml (infection de cellules à cellules) pendant 5h puis lavées deux fois et remises en culture. Le surnageant a été récupéré à 24h, 48h et 72h après infection. Pour l'infection par un virus, l'ARN viral a été quantifié par RTqPCR (mpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 RT-qPCR). Pour l'infection de cellules à cellules, l'infection a été mesurée par ELISA p24 dans le surnageant de culture (Innotest (Innotest HIV Antigen mAb, Ingen, ref. 80563).

Evaluation des rétrotranscrits viraux précoces et tardifs par qPCR

Les cellules HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B ont été infectées avec 50 ng/ml de virus répliquatif HIV-X4 pendant 17h, dans les mêmes conditions que précédemment. Les cellules HOS S1P1 et HOS LacZ ont été infectées avec 350 ng/ml de virus répliquatif HIV-R5 pendant 23h pour permettre de voir apparaître les transcrits viraux tardifs. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS puis re-suspendues dans un tampon de lyse (10 mmol/l Tris pH 8.0; 0.5 mmol/l EDTA; 0.0001 % SDS; 0.001% Triton; 100 µg/ml Protéinase K). Les lysats cellulaires ont ensuite été traités pendant 3h à 50°C et 10 min à 95°C. Pour la détection des transcrits viraux précoces et tardifs, l'ADN a été amplifié avec les oligonucléotides appropriés à 70°C (5'-agcctgggagctctctggcta-3' et 5'-cagacgggcacacactactttg-3' pour les transcrits viraux précoces ou 5'-caataaagcttgcccttgagtgtca-3' et 5'-cgagagatctcctctggctta-3' pour les transcrits viraux tardifs) dans un LightCycler480 (Roche) et évalué par la méthode du SYBR Green selon les recommandations du fabricant. L'ADN viral a été normalisé par le S14 génomique cellulaire à 64°C (5'-accagtcacacggcagatg-3' et 5'-ggggaaggaaaagaaggaagaa-3'). Les courbes de contrôle ont été établies en analysant une gamme de dilution du plasmide témoin positif. Le cycle de PCR pour lequel le signal d'amplification entre dans une phase exponentielle a été utilisé pour quantifier l'ADN cellulaire.

Evaluation des quantités d'ARNm CXCR4-A et CXCR4-B

Les PBMC de 6 donneurs sains ont été isolées comme précédemment par centrifugation de densité sur milieu de séparation des lymphocytes (Eurobio, ref. CMSMSL01-01). 5 millions de PBMC par donneur ont été congelées dans une solution 90% SVF - 10% DMSO (PBMC non infectées). 5 millions ont été infectées avec 350 ng de virus répliatif HIV-R5 et 5 millions ont été infectées avec 350 ng de virus répliatif HIV-X4 à une densité de 2×10^6 cellules/ml dans du RPMI pendant 18h puis lavées deux fois dans du PBS. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 6 jours à une densité de 2×10^6 cellules/ml et l'ARNm de ces PBMC a ensuite été extrait par un kit Roche (High pure RNA isolation kit, Roche, ref. 11828665001) selon les recommandations du fabricant. De même, les ARNm de 2 millions de cellules de lignées cellulaires et de 5 millions de PBMC de donneurs infectés ont été extraits par la même méthode.

Une transcription inverse a ensuite été réalisée à l'aide d'amorces aléatoires (Promega, ref. C1181) et de la rétrotranscriptase Superscript III RT (Invitrogen, ref. 18080) à 50°C pendant 30 min puis 55°C pendant 30 min et 70°C pendant 15 min. Une PCR a ensuite été effectuée dans un LightCycler480 (Roche) à l'aide des oligonucléotides appropriés : 5'-cttgctgaattggaagtgaatg-3' et 5'-ggtagggcaggaagattttattg-3' pour la détection de CXCR4-A et 5'-cagcaggtagcaaagtgcg-3' et 5'-atggagtcatagtcccctgagc-3' pour la détection de CXCR4-B. Nous avons utilisé le S14 génomique cellulaire pour normaliser les échantillons (5'-accagtcacacggcagatg-3' et 5'-ggggaaggaaaagaagaa-3'). Les PCR de CXCR4-A et de S14 ont été réalisées à 64°C alors que celles de CXCR4-B ont été faites à 69°C.

siRNA puis infection

Les cellules HeLa-P4 ont été cultivées dans des plaques 24-puits à une densité de 0.025×10^6 cellules/ml puis transfectées avec 2nM de siCXCR4-B (5'-gcagcagguagcaaaguga-3') ou d'un siRNA témoin négatif (ON-TARGET plus Non-targeting Pool, Thermo-scientific, ref. D-001810-10-05) par INTERFERin (Polyplus transfection, ref. 409-50), selon les conditions d'utilisation du fabricant. L'efficacité du

siRNA contre CXCR4-B a été évaluée par cytométrie de flux à l'aide de l'anticorps anti-CXCR4 12G5 (BD Pharmingen, ref. 555972) et par RTqPCR comme décrit précédemment.

72h après transfection, les cellules ont été infectées en triplicatas avec 10 ng/ml de HIV-X4 NL4.3 pendant 24h, lavées avec du PBS et cultivées avec ajustement du nombre de cellules deux fois par semaine. La transfection siRNA a été répétée une fois par semaine pour avoir une meilleure efficacité. La production virale a été quantifiée par mesure de la concentration en gag p24 dans le surnageant de culture par utilisation d'un kit commercial ELISA (Innotest HIV Antigen mAb, Ingen, ref. 80563).

De même, les cellules HOS S1P1 ont été cultivées à une densité de 0.4×10^6 cellules/ml et transfectées avec 5 nM de siS1P1 (mélange : 5'-gcauaaacugaccucggu-3' + 5'-gcucaagaccguaauuau-3' + 5'-cagcuaaccugcucuuguc-3' + 5'-gauaucaucguccggcauu-3') ou un siRNA témoin négatif (ON-TARGET plus Non-targeting Pool, Thermo-scientific, ref. D-001810-10-05) par INTERFERin (Polyplus transfection, ref. 409-50), selon les recommandations du fabricant. L'efficacité du siRNA contre S1P1 a été évaluée par cytométrie de flux à l'aide d'un anticorps anti-S1P1 (R&D, ref. MAB2016).

72h après transfection, les cellules ont été infectées avec 150 ng/ml de virus non répliquatif R5-Luc et l'activité luciférase Firefly a été mesurée dans un luminomètre comme décrit précédemment (Luciferase Assay System, Promega, ref. E1500). En parallèle, les cellules ont été infectées avec 10 ng/ml de virus répliquatif HIV-R5 pendant 24h, lavées avec du PBS et cultivées avec ajustement du nombre de cellules deux fois par semaine. Lors de l'infection par un virus répliquatif, la transfection siRNA a été répétée une fois par semaine pour avoir une meilleure efficacité. La production virale a été quantifiée deux fois par semaine par mesure de la concentration en gag p24 dans le surnageant de culture par utilisation du kit commercial ELISA (Innotest HIV Antigen mAb, Ingen, ref. 80563).

Commutation de R5 vers X4

Des PBMC de donneurs sains activées par PHA et IL2 ont été infectées par une souche R5 primaire. Nous avons réalisé une coculture entre ces PBMC infectées une semaine auparavant et les cellules HOS CXCR4-A ou HOS CXCR4-B. Le nombre de cellules HOS a été ajusté deux fois par semaine avec ajout de cellules non infectées et des PBMC de donneurs sains activées 72h ont été ajoutées une fois par semaine. La production virale a été quantifiée par mesure de la concentration en gag p24 dans le surnageant de culture par utilisation du kit commercial ELISA (Innotest HIV Antigen mAb, Ingen, ref. 80563). La commutation de R5 vers X4 a été évaluée à l'aide de cellules MT2 cultivées à une densité de 0.10×10^6 cellules/ml et mises en contact pendant une semaine avec le surnageant des cellules HOS CXCR4-A ou HOS CXCR4-B infectées, comme décrit par Koot (Koot, Vos et al. 1992).

Modèle animal de souris immunologiquement humanisées

Des souris SCID de génotype $cb17/lcr-Prkdc^{scid}/Crl$ ont été hébergées dans une animalerie A3/L3 dans des cages avec couvercle à filtre dans un portoir ventilé. Après une semaine d'acclimatation, les animaux ont été reconstitués immunologiquement par injection intra-péritonéale de 30×10^6 PBMC obtenues par centrifugation de densité sur les leucocytes d'un anneau de cytophère d'un donneur sain volontaire. La reconstitution a été évaluée au 13^{ème} jour par dosage des Immunoglobulines (Ig) humaines présentes dans le sérum des souris par test ELISA à l'aide de l'anticorps anti-human whole Ig-PO, (MP Biomedical, cat n°55230). Les souris dont la concentration en Ig totale était supérieure à 100 µg/ml ont été conservées pour l'expérience. Elles ont été infectées 14 jours après la reconstitution avec la souche HIV R5 JR-CSF à 1000 TCID₅₀ dans 100 µl final. Chez 6 souris, un gavage journalier avec 100 µl de FTY720 (Cayman, vendu par Interchim ref. BM8045) dissout à 60 µg/ml dans de l'eau distillée (0.3 mg/kg/jour) a été débuté 1 jour avant l'infection et continué pendant 12 jours. Les souris non traitées, au nombre de 8, ont été gavées avec le même volume d'eau distillée. 50 µl de sang ont été prélevés rétro-orbitalement après anesthésie à l'isoflurane et dilués avec 1 ml de plasma humain pour doser la charge virale au 6^{ème}, 9^{ème} et 12^{ème} jour après

l'infection. Les virémies ont été évaluées par quantification de l'ARN viral dans le plasma des souris en qPCR avec le test AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 (Roche Diagnostics, ref. 05212294190). Les valeurs inférieures à 20 copies d'ARN/ml (soit 400 copies/ml de sérum de souris) étant inférieures au seuil de détection du kit ont été considérées égales à zéro.

Test de chimiotactisme

La migration des cellules vers un ligand a été évaluée à l'aide d'une membrane poreuse selon un test déjà utilisé (Desmetz, Lin et al. 2006). Les cellules HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B ont été ajoutées dans la partie supérieure d'inserts de culture en polycarbonate de 6.5 mm de diamètre contenant des pores de 8 μ m. Dans la partie inférieure a été ajouté le milieu contenant différentes concentrations de ligand chimioattracteur CXCL12 aux différentes concentrations indiquées ou du SVF à 10% (contrôle positif). La migration a été autorisée pendant 4 heures puis les cellules ont été comptées par cytométrie de flux (MACSQuant, Miltenyi).

Analyses statistiques

Toutes les expériences *in vitro* ont été réalisées au moins trois fois. Les valeurs obtenues ont été exprimées en moyenne \pm SD. Les différences d'infection, de migration, d'expression du LTR et d'expression des ARNm des isoformes de CXCR4 ont été analysées avec le test de Student *t* non apparié. Les corrélations de Spearman ont été utilisées pour évaluer le lien entre les ARNm des isoformes de CXCR4, la virémie et le FPR.

**Projet I : Deux isoformes de CXCR4 confèrent une infectabilité
différente par VIH-1 X4: mécanisme, conséquence sur la
commutation de R5 vers X4 et preuve de concept d'une stratégie
thérapeutique**

A. Introduction

Chez environ 40% des individus infectés par le VIH, on observe une apparition de souches X4 en plus des souches R5 dans les étapes tardives de l'infection (Schuitemaker, Koot et al. 1992; Connor, Sheridan et al. 1997; Michael et Moore 1999). Cette commutation est associée à une perte plus rapide des lymphocytes T CD4 et à une évolution accélérée de la maladie vers le stade SIDA (Tersmette, de Goede et al. 1988; Connor et Ho 1994; Schramm, Penn et al. 2000). Il a été montré que la densité membranaire en CXCR4 à la surface des cellules T CD4 est augmentée chez les patients infectés et est inversement corrélée au taux de cellules T CD4 (Lin, Portales et al. 2005). *In vitro*, un tel phénomène facilite la commutation de R5 vers X4 (Fiser, Vincent et al. 2010). De plus, une densité plus importante en CXCR4 à la surface des cellules T CD4 est observée chez les patients X4 comparés aux patients R5 (Lin, Portales et al. 2005). Ces données suggèrent que, *in vivo*, la surexpression membranaire de CXCR4 pourrait être un des facteurs favorisant l'émergence de souches X4.

Alors qu'il existe un inhibiteur d'entrée ciblant CCR5, le Maraviroc qui a obtenu une autorisation de mise sur le marché en 2007, aucun inhibiteur viral ne cible CXCR4. En effet, ce récepteur a un rôle important dans la migration des lymphocytes, dans l'hématopoïèse, et dans la vascularisation; ce qui rend impossible l'inhibition totale de CXCR4 (Murdoch 2000). De plus, chez certains patients traités par Maraviroc, on observe une émergence de souches X4, qui est un effet indésirable (Chidiac, Katlama et al. 2008; Baatz, Struck et al. 2011; Recordon-Pinson, Raymond et al. 2013). Il apparaît donc nécessaire de pouvoir éviter cette émergence lors des traitements antirétroviraux utilisant notamment le Maraviroc.

Il semble donc important, d'une part, de déterminer les facteurs responsables de cette commutation, et d'autre part, de cibler l'entrée de ces virions X4.

Il a été montré dans la littérature, qu'il existe deux isoformes de CXCR4, CXCR4-A et CXCR4-B qui diffèrent de 9 acides aminés en NH₂ terminal [Figure 6], [Figure 7] et

[Annexe 1]. Ces deux isoformes semblent être différentes dans leurs réponses à leur ligand CXCL12 (Gupta et Pillarisetti 1999), notamment en termes de chimiotactisme. Le but de cette première partie de thèse est d'évaluer les fonctions en tant que corécepteur du VIH de ces deux isoformes.

B. Résultats

I) Expression des deux isoformes de CXCR4 :

a. Dans les PBMC humaines.

Il n'est actuellement pas connu s'il existe une variabilité interindividuelle du ratio CXCR4-B / CXCR4-A. La proportion de chaque isoforme de CXCR4 exprimée au niveau des cellules du sang périphérique de sujets sains a donc été évaluée. Pour cela, des PBMC ont été isolées à partir de sang de 11 donneurs sains. Les ARNm des PBMC ont été extraits, puis par RTqPCR, les ARNm des deux isoformes ont été quantifiés à l'aide de couples d'oligonucléotides conçus pour cette expérience⁵.

Les oligonucléotides ont été testés sur les vecteurs pHIV-CXCR4-A et pHIV-CXCR4-B. Pour obtenir ces vecteurs, l'ADNc de CXCR4 a été amplifié en utilisant les oligonucléotides appropriés pour avoir CXCR4-A⁶ et CXCR4-B⁷ et inséré en amont d'un promoteur CMV dans le vecteur lentiviral pHR-BX. Les plasmides pHR-CXCR4-A et pHR-CXCR4-B ont ensuite été co-transfectés avec le plasmide d'empaquettement pAX2 (qui inclut les gènes *gag*, *pol*, *rev* et *tat*) et le plasmide pMD2G qui code pour l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire dans des cellules 293T pour obtenir les vecteurs pHIV-CXCR4-A et pHIV-CXCR4-B.

Le couple d'amorces A permet d'amplifier uniquement l'isoforme CXCR4-A et le couple d'amorces B permet d'amplifier exclusivement l'isoforme CXCR4-B [Figure 19]. Les qPCR montrent l'amplification d'un fragment unique avec chaque amorce. Les ADN obtenus ont été purifiés et vérifiés par séquençage. Les fragments amplifiés sont de 160 bp pour CXCR4-A et de 144 bp pour CXCR4-B ; leur T_m est sensiblement différent.

⁵ Couple d'amorces A pour la détection de CXCR4-A : 5'-cttgctgaattggaagtgaatg-3' et 5'-ggtgggcaggaagattttattg-3' et couple d'amorces B pour la détection de CXCR4-B : 5'-cagcaggtagcaaagtgacg-3' et 5'-atggagtcatagcccctgagc-3'.

⁶ Oligonucléotides correspondants à la séquence PubMed NM_001008540 du nucléotide 297 à 1375.

⁷ Oligonucléotides correspondants à la séquence PubMed NM_003467 du nucléotide 36 à 1154.

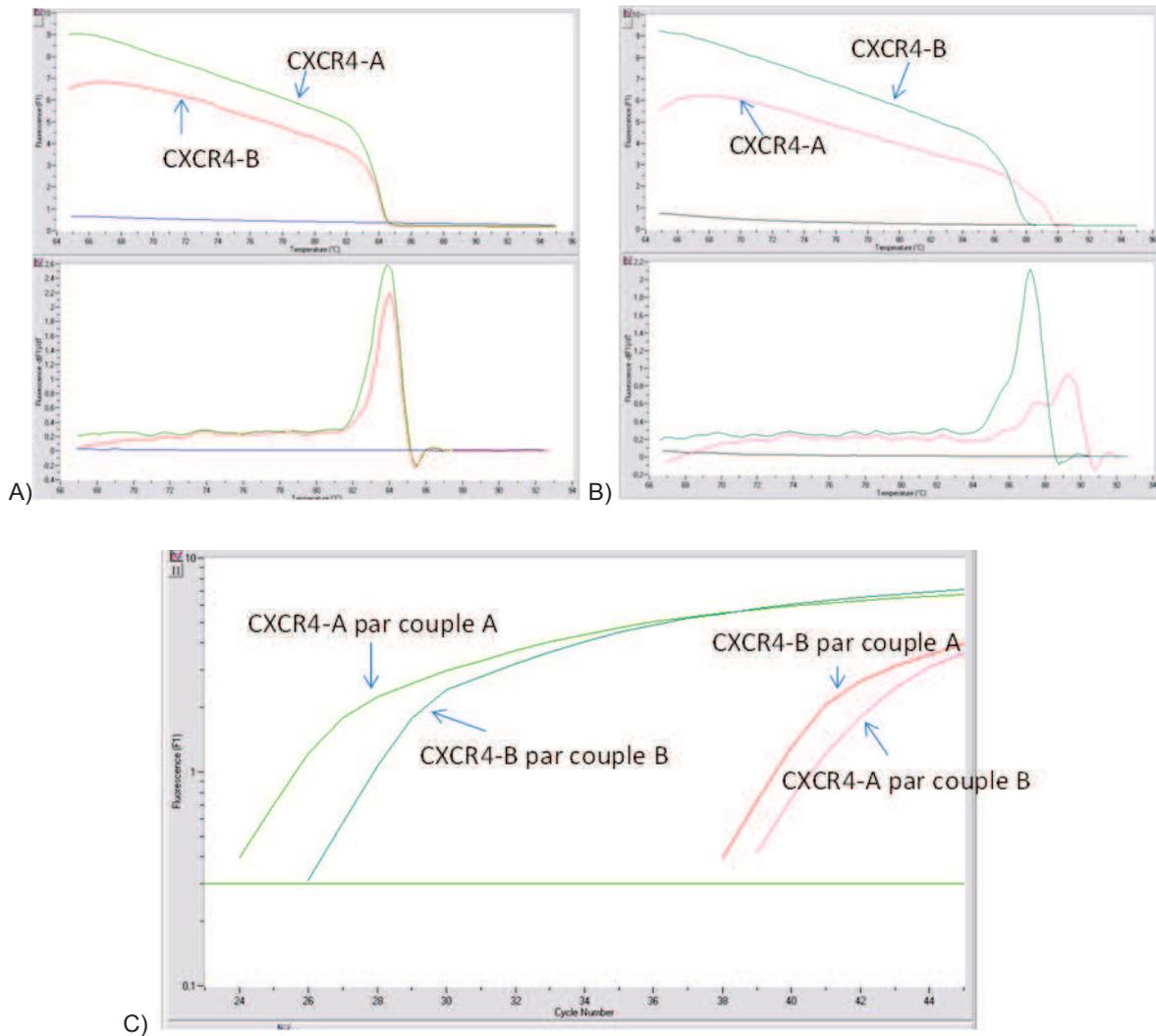


Figure 19 : Amplification des isoformes CXCR4-A et CXCR4-B par les couples A et B.

A) Courbe de fusion de CXCR4-A et CXCR4-B obtenus à partir des vecteurs pHIV-CXCR4-A et pHIV-CXCR4-B amplifiés par le couple d'amorces A. B) Courbe de fusion de CXCR4-A et CXCR4-B amplifiés par le couple d'amorces B. C) qPCR de CXCR4-A et CXCR4-B amplifiés par les couples d'amorces A et B.

Ces couples d'oligonucléotides ont alors été testés sur les PBMC de donneurs sains. Tous les donneurs testés possèdent les deux isoformes, avec l'isoforme CXCR4-B plus exprimée que l'isoforme CXCR4-A ; le ratio des deux variant, en général, d'un facteur 2 à un facteur 5 [Figure 20]. Dans nos expériences, ce ratio peut augmenter jusqu'à un facteur 10.

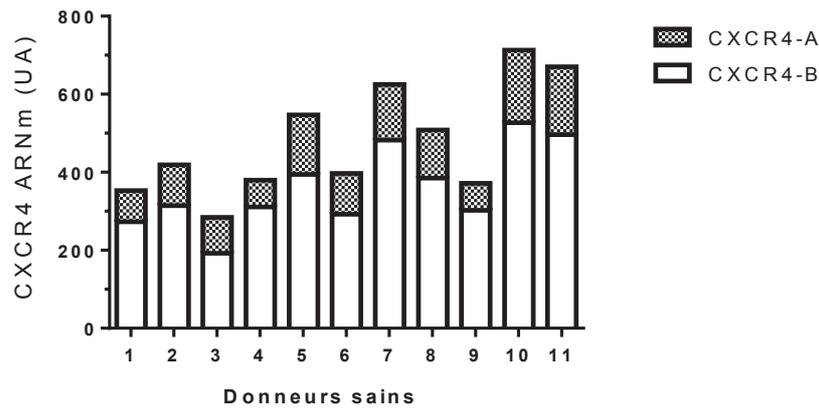


Figure 20 : Quantification de l'ARNm de CXCR4 (CXCR4-A + CXCR4-B) dans les PBMC de donneurs sains.

L'ARNm de PBMC de 11 donneurs a été extrait à l'aide d'un kit Roche puis la proportion des deux isoformes de CXCR4 a été mesurée par RTqPCR.

b. Expression des deux isoformes dans différentes lignées cellulaires.

Nous avons ensuite évalué par la même méthode, l'expression des deux isoformes de CXCR4 dans différentes lignées cellulaires connues pour exprimer le récepteur CXCR4.

Toutes les lignées exprimant CXCR4 testées possèdent les deux isoformes :

- Lignées lymphocytaires T : MT2, SUPT-1, Jurkat, H9, MOLT.
- Lignées monocytaires : THP1, U937.
- Autres lignées : HeLa-P4⁸ (cancer du col de l'utérus), HEK 293T X4⁹ (cellules embryonnaires du rein).

Nous avons retrouvé, comme dans les PBMC, que l'isoforme CXCR4-B est plus exprimée que l'isoforme CXCR4-A [Figure 21] et [Figure 22]. Nous avons notamment obtenu un facteur 50 entre l'expression de CXCR4-B et celle de CXCR4-A dans la lignée lymphocytaire MT2 et un facteur 10 dans la lignée HeLa-P4.

⁸ Cellules HeLa exprimant CXCR4 et possédant le gène *lacZ* sous le contrôle du promoteur LTR du VIH.

⁹ Cellules HEK 293T stablement transfectées pour exprimer CXCR4.

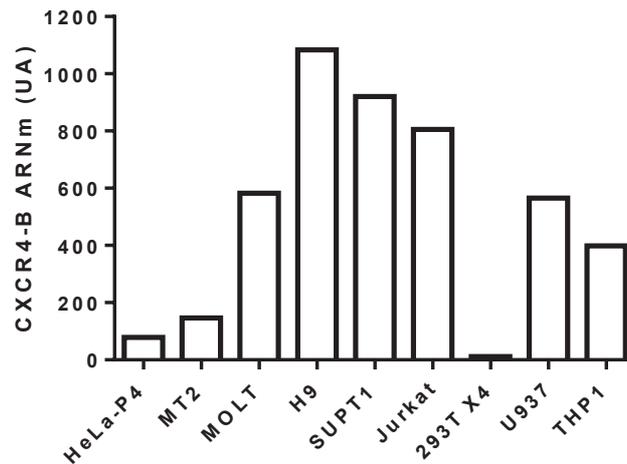


Figure 21 : ARNm de CXCR4-B dans différentes lignées cellulaires.

L'ARNm de différentes lignées cellulaires a été extrait à l'aide d'un kit Roche puis la quantité de CXCR4-B a été mesurée par RTqPCR à l'aide du couple de nucléotides adéquat.

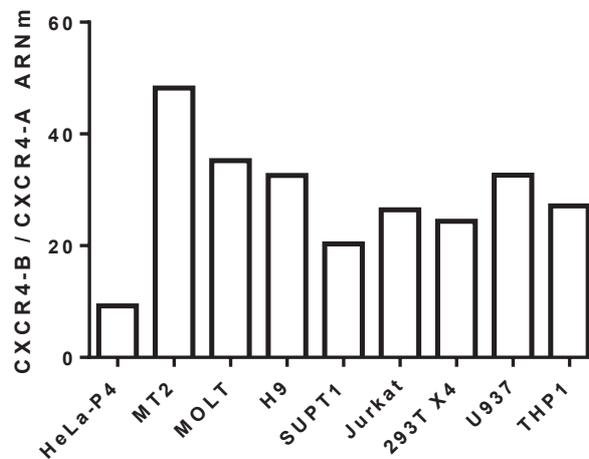


Figure 22 : Ratio des ARNm CXCR4-B / CXCR4-A dans différentes lignées cellulaires.

L'ARNm de différentes lignées cellulaires a été extrait comme précédemment à l'aide d'un kit Roche puis le ratio CXCR4-B / CXCR4-A a été évalué par RTqPCR.

c. Expression des deux isoformes dans une lignée HOS.

Pour pouvoir comparer les fonctions des deux isoformes de CXCR4, les ADNc des ARNm codant pour CXCR4-A et CXCR4-B ont été clonés par PCR dans le laboratoire puis insérés dans un vecteur de transfert de gène dérivé de VIH-1.

Des cellules HOS (Human Osteo Sarcoma) CD4⁺ CCR5⁺ ont été transduites avec différentes quantités de ces vecteurs. Après vérification par cytométrie de flux, nous avons ainsi obtenu les lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B exprimant des densités similaires des deux isoformes à la surface cellulaire (intensité moyenne de fluorescence de 29 et 23 pour CXCR4-A et CXCR4-B, respectivement) [Figure 23].

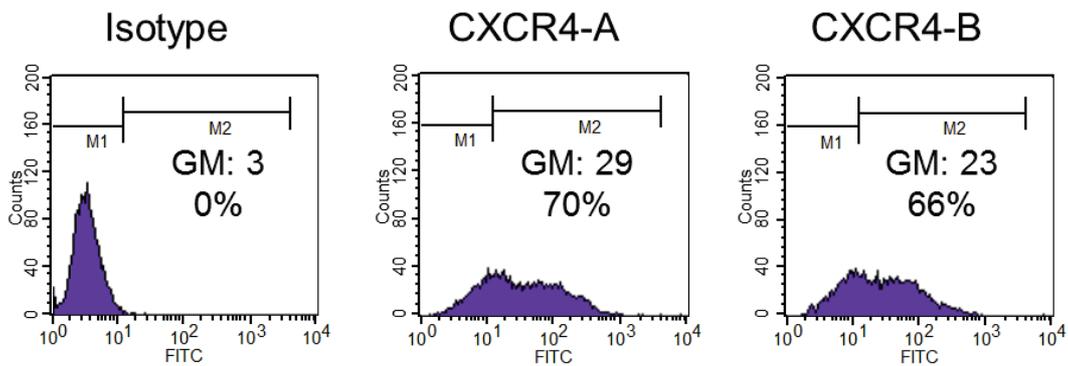


Figure 23 : Expression à la membrane cellulaire des isoformes de CXCR4 dans des cellules HOS transduites.

Une lignée HOS a été transduite avec des quantités équivalentes de vecteurs pHIV-CXCR4-A ou pHIV-CXCR4-B. L'expression¹⁰ des deux isoformes à la surface des deux lignées a ensuite été évaluée par cytométrie de flux à l'aide de l'anticorps anti-CXCR4 12G5 qui reconnaît les deux isoformes.

Ces deux lignées ont été utilisées tout au long de ce projet pour évaluer l'efficacité de ces deux isoformes de CXCR4 en tant que corécepteur du VIH et récepteur de chimiokines.

¹⁰ GM : intensité moyenne de fluorescence.

II) Différence d'infectabilité entre les lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B :

- a. Différence d'infectabilité par un virus non répliatif observée pour chacune des deux isoformes.

L'infectabilité de ces deux lignées a tout d'abord été testée à l'aide de virions X4 défectifs, capables d'un seul cycle de réplication, dont l'intensité peut être mesurée en quantifiant l'activité luciférase dans les cellules infectées. En effet, le gène de la luciférase a été fusionné au gène *nef* dans le génome de ces virus rendus défectifs par mutation dans le gène *env*. Ainsi, l'activité luciférase est proportionnelle à l'infection.

Les cellules ont été exposées aux quantités de virus X4-Luc indiquées et la production virale a été mesurée 72h plus tard. La Figure 24 montre que l'isoforme CXCR4-A rend les cellules HOS moins infectables que l'isoforme CXCR4-B. Ainsi, dans ces conditions de culture, lorsque les cellules sont infectées avec 100 ng de virus X4-Luc, la différence de production virale après un cycle de réplication est de 69% +/- 4% ($p=0.0009$).

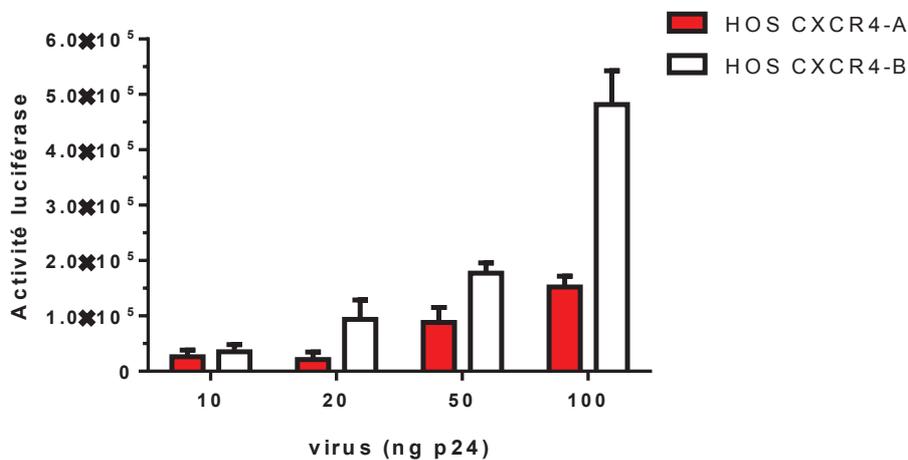


Figure 24 : Infection des lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B par un virus X4 non répliatif.

Les lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B ont été infectées par une gamme de virus non répliatif X4-Luc. 24h après l'infection, les cellules ont été lavées puis l'activité luciférase a été évaluée dans les lysats cellulaires 72h après infection.

En revanche l'infectabilité des deux lignées par des virions non répliatifs R5, R5-Luc, n'est pas significativement différente [Figure 25].

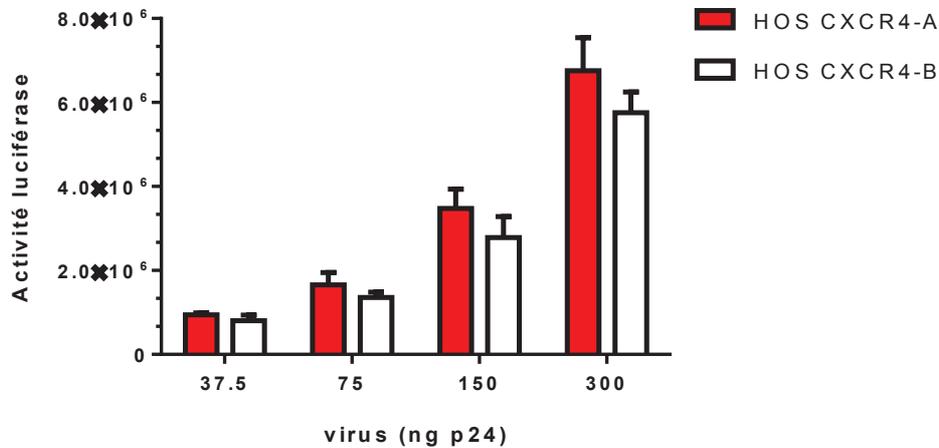


Figure 25 : Infection des lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B par un virus R5 non répliatif.

Les cellules HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B ont été infectées par une gamme de virus non répliatif R5-Luc. 24h après l'infection, les cellules ont été lavées puis l'activité luciférase a été évaluée dans les lysats cellulaires 72h après infection.

Pour confirmer les résultats obtenus dans les lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B, des cellules HEK 293T $CD4^+$ $CXCR4^-$ ont été transduites pour exprimer un niveau comparable de CXCR4-A ou CXCR4-B, mesuré comme précédemment par cytométrie de flux [Figure 26].

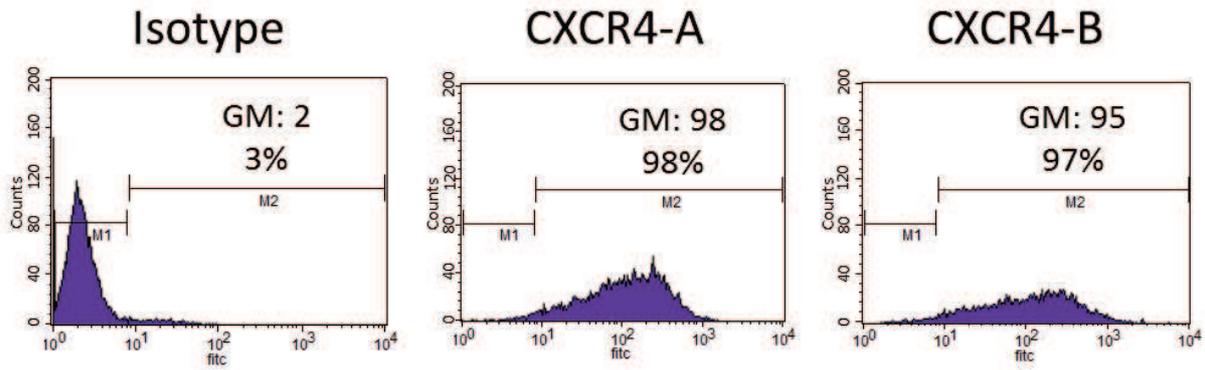


Figure 26 : Expression à la membrane cellulaire des isoformes de CXCR4 dans des lignées HEK 293T CD4⁺ transduites.

Les cellules 293T CD4⁺ ont été transduites avec des quantités équivalentes en vecteurs pHIV-CXCR4-A ou pHIV-CXCR4-B. L'expression¹¹ des deux isoformes à la surface des deux lignées ainsi obtenues a ensuite été évaluée par cytométrie de flux à l'aide de l'anticorps anti-CXCR4 12G5 qui reconnaît les deux isoformes.

Comme ce qui avait été obtenu avec les cellules HOS, l'infection par un virus X4-Luc de cellules 293T CD4⁺ CXCR4-B a été supérieure à celle de cellules 293T CD4⁺ CXCR4-A, avec une différence d'infection de 56% +/- 7% (p=0.0011) après un seul cycle de réplication virale lorsque les cellules ont été infectées avec 200 ng virus X4 non répliquatif [Figure 27].

¹¹ GM : intensité moyenne de fluorescence.

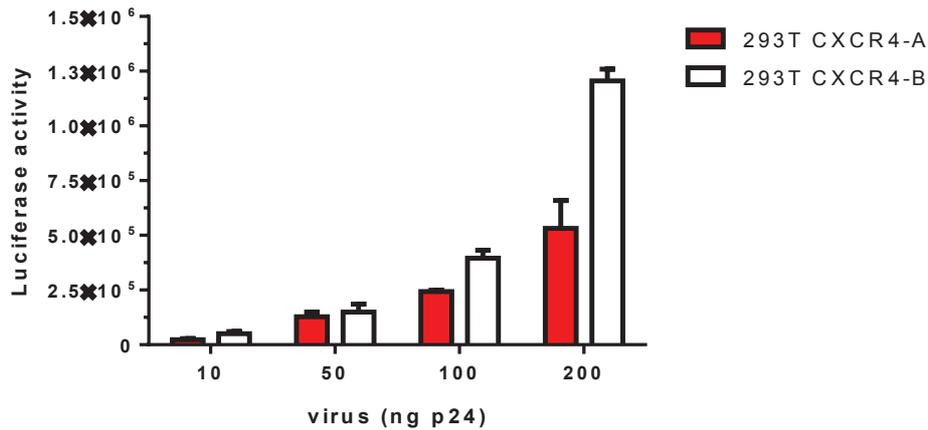


Figure 27 : Infection des lignées 293T CD4⁺CXCR4-A et 293T CD4⁺CXCR4-B par un virus X4 non répliatif.

Les lignées 293T CXCR4-A et 293T CXCR4-B ont été infectées par une gamme de virus non répliatif X4-Luc. 24h après l'infection, les cellules ont été lavées puis l'activité luciférase a été évaluée dans les lysats cellulaires 72h après infection.

b. Viabilité.

Pour s'assurer que la différence d'infection observée entre les lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B n'était pas due à une différence de viabilité, ces cellules ont été infectées, comme précédemment, avec 100 ng d'un virus X4 non répliatif. L'infection a été contrôlée par mesure de l'activité luciférase dans les lysats cellulaires 72h après infection [Figure 28]. En parallèle, la viabilité a été évaluée après 3 jours d'infection par comptage des cellules mortes au bleu trypan [Figure 29].

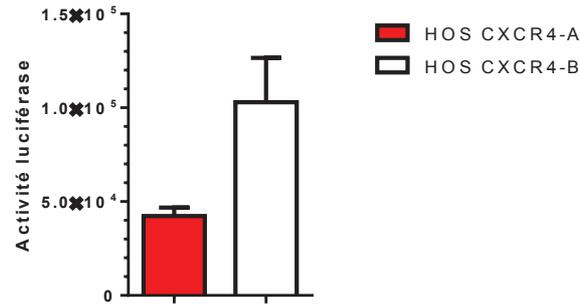


Figure 28 : Infection des lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B par un virus X4 non répliatif.

Les lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B ont été infectées par 100 ng d'un virus X4-Luc. 24h après infection, les cellules ont été lavées puis l'infection a été contrôlée comme précédemment par mesure de l'activité luciférase dans les lysats cellulaires 72h après infection.

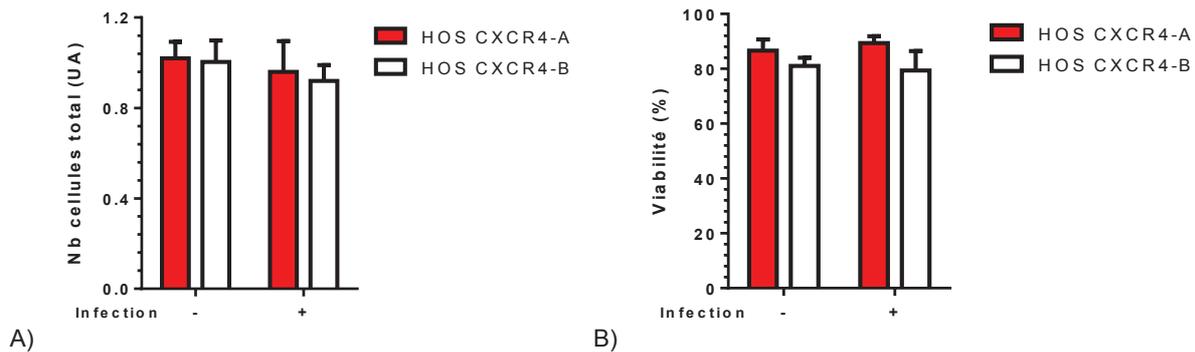


Figure 29 : Viabilité des HOS CXCR4-A et des HOS CXCR4-B infectées par X4Luc.

Les lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B ont été infectées par 100 ng d'un virus X4-Luc puis lavées 24h après infection. 72h après infection, le nombre total de cellules (A) et la viabilité cellulaire (B) ont été quantifiés dans les lignées infectées ou non infectées, à l'aide d'un compteur automatique de cellules et de lames de comptage prévues à cet effet après marquage des cellules mortes au bleu trypan à 0,4%.

Dans ces conditions, nous avons observé une différence d'infection de 59% +/- 7% ($p=0.0120$) entre la lignée HOS CXCR4-A et la lignée HOS CXCR4-B. La viabilité cellulaire a été identique pour les deux lignées HOS infectées ou non infectées par un virus non répliatif X4-Luc. La différence observée en infection entre les lignées exprimant l'une ou l'autre des isoformes de CXCR4 n'était donc pas due à une différence de viabilité.

c. Effet du ligand de CXCR4 sur l'infection des deux lignées HOS.

Le ligand CXCL12 étant connu pour inhiber l'infection de virus X4 (Oberlin, Amara et al. 1996), nous avons voulu savoir s'il existait pour cet effet une différence selon l'isoforme de CXCR4 utilisée. Pour cela, ce ligand a été incubé pendant 1h avec les deux lignées cellulaires HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B puis les cellules ont été infectées comme précédemment avec un virus X4-Luc non répliatif [Figure 30].

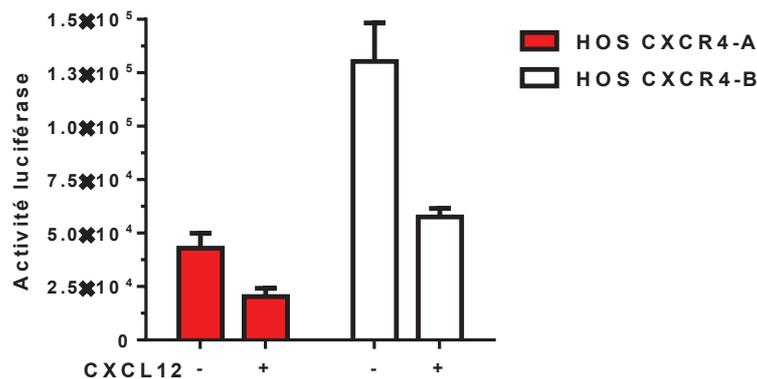


Figure 30 : Effet de CXCL12 sur l'infection par un virus X4 non répliatif.

Les lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B ont été pré-incubées avec $2.5 \mu\text{g/ml}$ de CXCL12 pendant 1h puis les cellules ont été infectées avec 100 ng d'un virus X4-Luc. 24h après l'infection, les cellules ont été lavées puis l'infection a été contrôlée comme précédemment par mesure de l'activité luciférase dans les lysats cellulaires 72h après l'infection.

CXCL12 a eu le même effet inhibiteur ($53\% \pm 10\%$ et $56\% \pm 6\%$ pour CXCR4-A et CXCR4-B, respectivement, $p=0.8097$) sur l'infection par un virus non répliatif X4 des lignées HOS exprimant l'une ou l'autre des isoformes de CXCR4. Ceci montre que l'effet inhibiteur de CXCL12 sur l'infection par X4 est semblable quelle que soit l'isoforme de CXCR4 exprimée.

- d. Différence d'infectabilité assurée par les deux isoformes par un virus répliatif.

L'infectabilité des deux lignées HOS a ensuite été évaluée avec un virus répliatif HIV-X4 (souche NL4.3). Pour cela, les lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B ont été infectées par la même quantité de virus répliatif de souche X4 puis l'infection a été suivie dans le temps par mesure de la production de la protéine virale p24 dans le surnageant de culture. Comme dans le cas de l'infection par un virus non répliatif X4, nous avons obtenu une infection plus performante avec la lignée exprimant CXCR4-B par rapport à la lignée exprimant l'isoforme CXCR4-A [Figure 31].

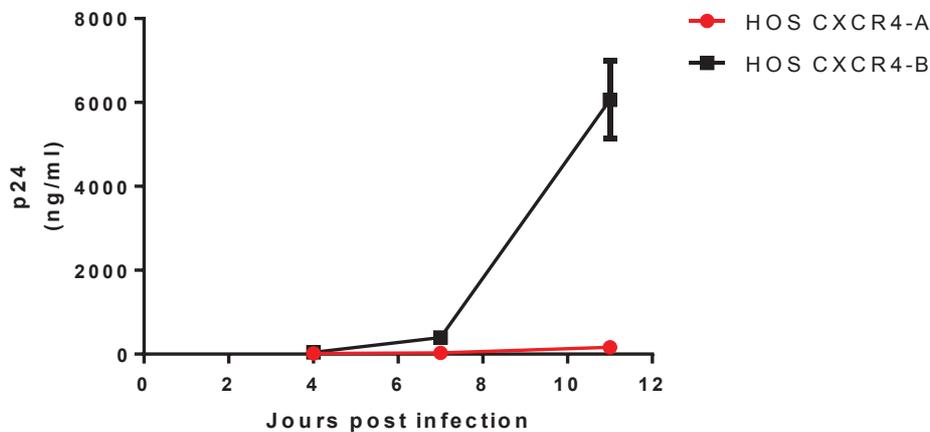


Figure 31 : Infection des HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B par un virus X4 répliatif.

Les cellules HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B ont été infectées en triplicatas avec 10 ng/ml de virus répliatif HIV-X4 pendant 24h, lavées avec du PBS et cultivées pendant 11 jours avec ajustement du nombre de cellules deux fois par semaine. La production virale a été quantifiée par mesure de la concentration en gag p24 dans le surnageant de culture.

Ces résultats confirment que l'isoforme CXCR4-A est moins fonctionnelle en tant que corécepteur des virus HIV-X4 que l'isoforme CXCR4-B. Dans ces conditions, après 11 jours d'infection, nous avons observé une différence d'infection d'un facteur 37 +/- 20 fois ($p=0.0004$) entre les lignées HOS CXCR4-B et HOS CXCR4-A.

Afin d'évaluer l'effet de ces isoformes sur l'infection par des souches R5, l'infection de ces lignées par un virus répliatif HIV-R5 Ad8 a ensuite été mesurée [Figure 32].

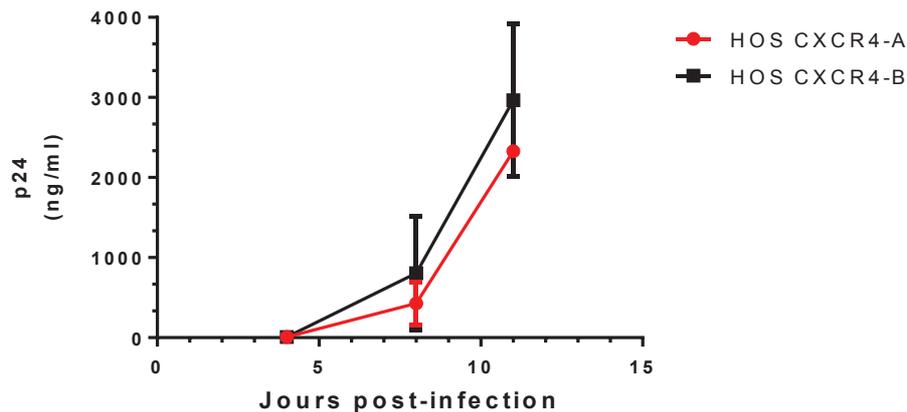


Figure 32 : Infection des HOS CXCR4-A et des HOS CXCR4-B par un virus R5 répliquatif.

Les cellules HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B ont été infectées en triplicatas avec 10 ng/ml de virus répliquatif HIV-R5 pendant 24h, lavées avec du PBS et cultivées pendant 11 jours avec ajustement du nombre de cellules deux fois par semaine. La production virale a été quantifiée par mesure de la concentration en gag p24 dans le surnageant de culture.

Contrairement à ce qui a été obtenu avec un virus répliquatif X4, il n'y a pas eu de différence significative suite à l'infection des lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B avec un virus HIV-R5 répliquatif ($p=0.3149$ à 11 jours après l'infection).

A part une différence de corécepteur d'entrée, le cycle viral des virus R5 et X4 est identique. Etant donné que l'infection des lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B est différente par un virus HIV-X4 mais identique par un virus HIV-R5, ceci suggère donc que la différence d'infection par un virus HIV-X4 entre les deux isoformes serait due à une différence d'entrée du virus.

III) Etape du cycle rétroviral où se joue la différence d'infectabilité :

a. Entrée du virus et rétrotranscription selon l'isoforme.

Pour évaluer l'étape du cycle viral qui est différente selon l'isoforme utilisée, les lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B ont été infectées par un virus répliquatif HIV-X4 pendant 17h, puis les cellules ont été lavées et lysées et une qPCR a été

réalisée en utilisant des oligonucléotides permettant de détecter les transcrits précoces ou tardifs (Lin, Mettling et al. 2002). En effet, les transcrits viraux précoces sont un indicateur de l'entrée du virus dans les cellules alors que les transcrits viraux tardifs évaluent le cycle viral jusqu'à la fin de l'étape de rétrotranscription. En n'infectant les cellules que pendant 17h, on considère qu'un seul cycle viral a été entamé, ce qui permet l'évaluation de l'entrée du virus par PCR. En contrôle positif d'inhibition de l'entrée des virus, l'antagoniste de CXCR4 AMD3100 a été utilisé.

Pour vérifier l'infection des deux lignées, la quantité de protéine virale p24 dans le surnageant a été mesurée 72h après l'infection [Figure 33].

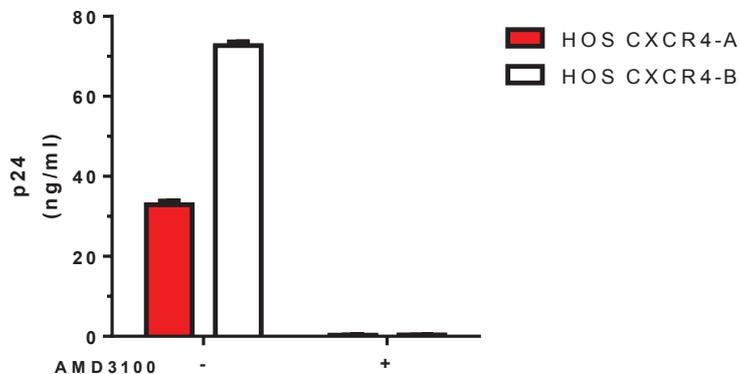


Figure 33 : Infection des lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B par 100 ng de virus HIV-X4.

Les cellules HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B ont été pré-incubées pendant 1h avec ou sans AMD3100 à 1 μ M puis infectées en triplicatas avec 50 ng/ml de virus répliquatif HIV-X4 pendant 17h, lavées avec du PBS puis cultivées en milieu DMEM. La production virale a été contrôlée après 3 jours d'infection par mesure de la concentration en gag p24 dans le surnageant de culture.

Comme précédemment, nous avons observé une différence d'infection de 55% +/- 1% ($p < 0.0001$) entre les lignées HOS CXCR4-B et HOS CXCR4-A 72h après l'infection. L'antagoniste AMD3100 reconnaît bien les deux isoformes de CXCR4 et a inhibé complètement l'infection de ces deux lignées par un virus X4 ($p < 0.0001$ pour les deux lignées).

Les rétrotranscrits viraux précoces ont ensuite été quantifiés par qPCR à l'aide des oligonucléotides appropriés¹², comme publié précédemment (Lin, Mettling et al. 2002) [Figure 34].

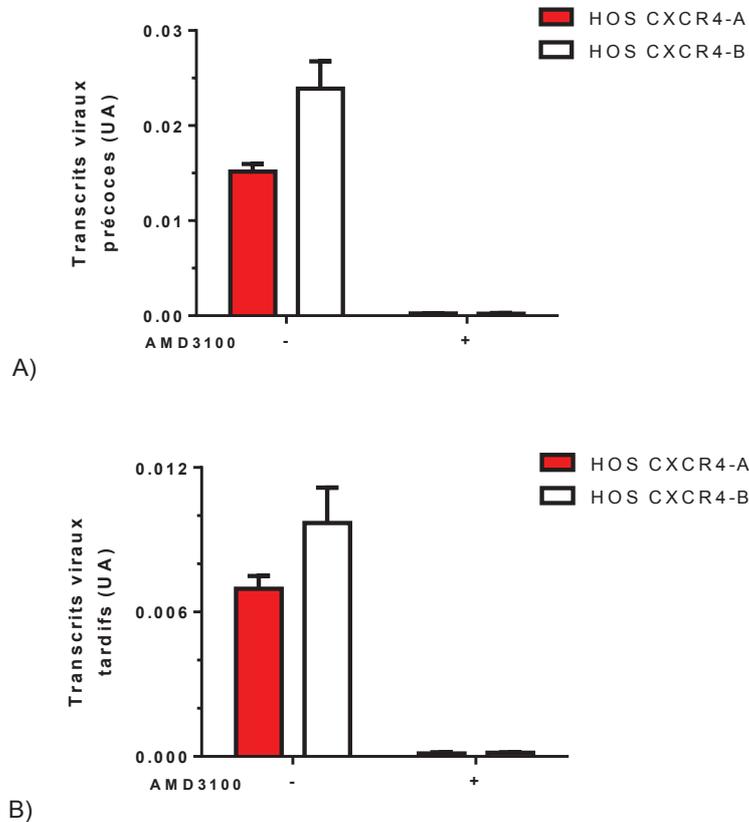


Figure 34 : Evaluation des rétrotranscrits viraux précoces et tardifs.

Les cellules HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B ont été pré-incubées pendant 1h avec ou sans AMD3100 à 1 μ M puis infectées en triplicatas avec 50 ng/ml de virus répliatif HIV-X4 pendant 17h, lavées avec du PBS puis resuspendues dans un tampon de lyse. Les transcrits viraux précoces (A) et tardifs (B) ont ensuite été quantifiés par PCR à l'aide d'oligonucléotides appropriés.

La quantification des rétrotranscrits viraux précoces des deux lignées HOS infectées par un virus HIV-X4 répliatif pendant 17h montrent une différence d'entrée entre la lignée CXCR4-B et la lignée CXCR4-A de 37% +/- 6% ($p=0.0071$). De plus, nous avons bien observé une inhibition de l'entrée du virus avec l'antagoniste de CXCR4, AMD3100 ($p<0.0001$). La différence constatée entre les rétrotranscrits précoces n'est

¹² Couples 5'-agcctgggagctctctggcta-3' et 5'-cagacgggcacactactttg-3' pour les transcrits viraux précoces et couples 5'-caataaagcttgcttgagtgtca-3' et 5'-cgagagatctctctggcttta-3' pour les transcrits viraux tardifs.

pas accentuée au niveau des rétrotranscrits tardifs (29% +/- 8%, $p=0.0388$). Ceci confirme donc que la différence d'infection entre les lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B provient d'une différence d'entrée du virus dans la cellule et qu'il n'y a pas d'incidence de l'isoforme sur l'efficacité de la rétrotranscription.

b. Effet des isoformes de CXCR4 sur l'expression génique du promoteur viral.

Des cellules HeLa CXCR4⁻ transfectées de manière stable avec le gène *luciférase* sous contrôle du promoteur LTR du VIH-1 (HeLa-LTR-Luc) ont été transduites par les mêmes quantités des vecteurs pHIV-CXCR4-A ou pHIV-CXCR4-B. L'expression membranaire des deux isoformes a été contrôlée par cytométrie de flux 48h après transduction [Figure 35].

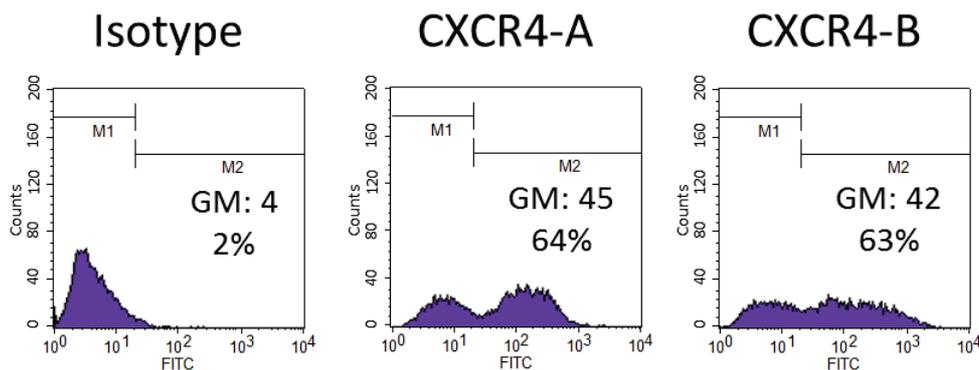


Figure 35 : Expression à la membrane cellulaire des isoformes de CXCR4 dans des HeLa-LTR-Luc transduites.

Les cellules HeLa-LTR-Luc ont été transduites avec des quantités équivalentes en vecteurs pHIV-CXCR4-A ou pHIV-CXCR4-B. L'expression¹³ des deux isoformes à la surface des deux lignées ainsi obtenues a ensuite été évaluée par cytométrie de flux à l'aide de l'anticorps anti-CXCR4 12G5 qui reconnaît les deux isoformes.

Les cellules ont alors été stimulées pendant 24h par le ligand CXCL12 puis l'activité luciférase a été mesurée comme précédemment. Nous avons ainsi évalué l'effet activateur de CXCL12 via les isoformes de CXCR4 sur la LTR [Figure 36].

¹³ GM : intensité moyenne de fluorescence.

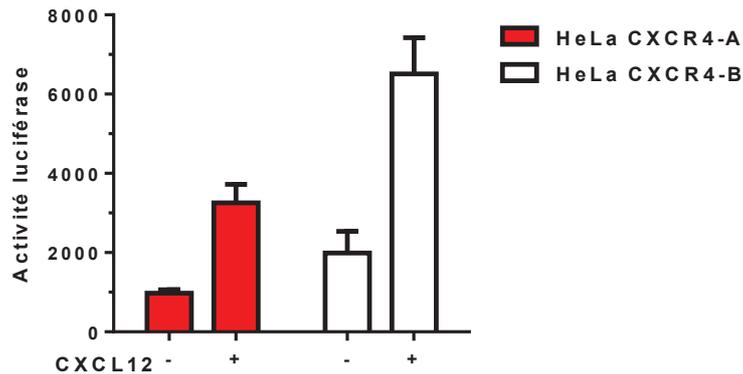


Figure 36 : Effet de la liaison de CXCL12 à chacune des isoformes de CXCR4 sur l'activation de la LTR.

Les cellules HeLa-LTR-Luc CXCR4-A et HeLa-LTR-Luc CXCR4-B ont été incubées pendant 24h avec 1 µg/ml de CXCL12 puis l'activité luciférase a été évaluée comme précédemment dans les lysats cellulaires par lecture de la luminescence.

L'augmentation de la transcription de la luciférase par CXCL12 a été la même via les deux isoformes (augmentation d'un ratio 3.33 +/- 0.51 et 3.27 +/- 0.8 pour CXCR4-A et CXCR4-B, respectivement. $p=0.9526$). La liaison de CXCL12 à chacune des deux isoformes a donc eu le même effet sur le promoteur du VIH.

IV) Etude d'une fonction de récepteurs de chimiokines des deux isoformes de CXCR4 :

Le chimiotactisme induit par les deux isoformes de CXCR4 vers la chimiokine CXCL12 a ensuite été évalué à l'aide d'un test déjà utilisé (Desmetz, Lin et al. 2006). Les cellules ont été ajoutées dans la partie supérieure d'inserts de culture et le milieu contenant différentes concentrations de CXCL12 ou du sérum de veau fœtal à 10% (témoin positif) a été ajouté dans la partie inférieure. La migration a ensuite été autorisée pendant 4h puis la quantité de cellules ayant migré dans la partie inférieure des inserts a été évaluée par cytométrie de flux [Figure 37].

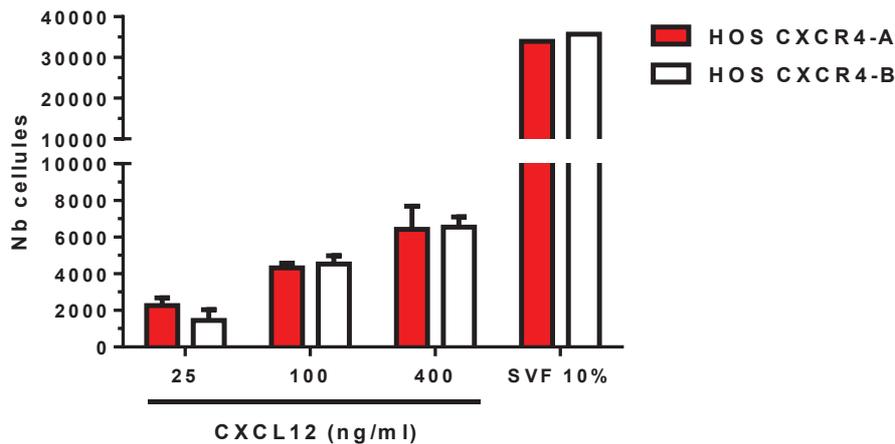


Figure 37 : Effet de CXCL12 sur le chimiotactisme de CXCR4-A et CXCR4-B.

100.000 cellules HOS CXCR4-A ou HOS CXCR4-B ont été ajoutées dans la partie supérieure d'inserts de culture en polycarbonate de 6.5 mm de diamètre ayant des pores de 8 μ m. Dans la partie inférieure a été ajouté le milieu contenant différentes concentrations de ligand chimioattracteur CXCL12 aux différentes concentrations indiquées ou du sérum de veau fœtal à 10% (témoin positif). La migration a été autorisée pendant 4h puis les cellules ayant migré dans la partie inférieure ont été comptabilisées par cytométrie de flux.

La migration des cellules HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B a été identique vers les différentes concentrations de CXCL12 testées (par exemple, $p=0.9073$ pour CXCL12 à 400 ng/ml entre les deux lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B). Les deux isoformes de CXCR4 semblent donc être équivalentes pour le chimiotactisme vers leur ligand naturel CXCL12.

V) Capacité des deux isoformes de CXCR4 à permettre une commutation de R5 vers X4 :

Dans le laboratoire, il a été précédemment montré qu'une forte densité membranaire en CXCR4 était favorable à la commutation de R5 vers X4 (Fiser, Vincent et al. 2010). De même, si CXCR4-B permet une plus forte infectabilité par les souches X4, il est logique de penser que cette isoforme pourrait également permettre plus facilement que CXCR4-A l'émergence de virions X4 au cours d'une infection par R5. Pour tester cette hypothèse, les lignées HOS CXCR4-A et HOS CXCR4-B ont été

mises en coculture avec des PBMC infectées avec un virus R5 répliquatif, provenant du plasma d'un patient. Nous avons choisi un patient ayant un faible FPR¹⁴ (22.5%), laissant supposer que ce patient possède des souches R5 qui ne nécessitent pas beaucoup de mutations pour se transformer en souches X4. L'apparition dans le surnageant de culture de souches capables d'utiliser CXCR4 comme corécepteur a alors été déterminée par un test sur des cellules MT2, qui ne forment de syncytia qu'en présence de souches utilisant CXCR4, comme décrit précédemment (Koot, Vos et al. 1992).

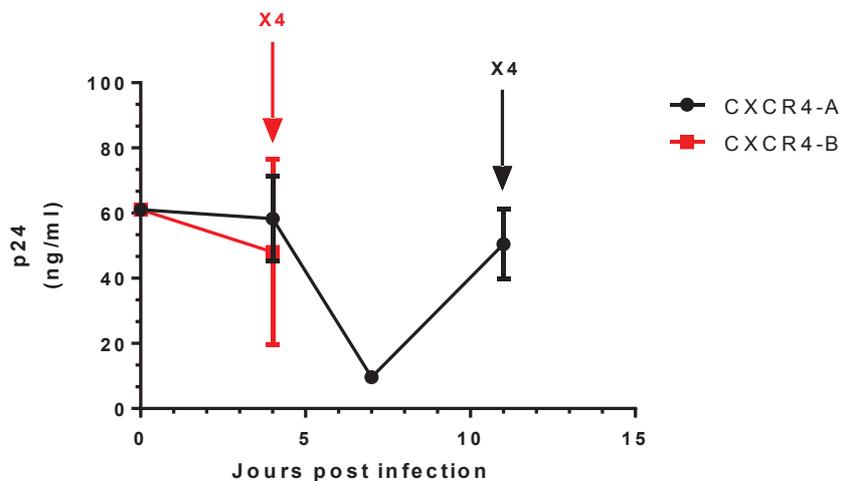


Figure 38 : Commutation de R5 vers X4

Des PBMC de donneurs sains ont été infectées à une densité de 2×10^6 cellules/ml avec le plasma d'un patient R5 et cultivées pendant une semaine. Une coculture entre les PBMC infectées et les cellules HOS CXCR4-A ou HOS CXCR4-B a ensuite été réalisée. Le nombre de cellules HOS a été ajusté deux fois par semaine par ajout de cellules HOS CXCR4-A ou HOS CXCR4-B non infectées. Des PBMC de donneurs sains activés 72h ont été ajoutées une fois par semaine. La production virale a été quantifiée par mesure de la concentration en gag p24 dans le surnageant de culture. La commutation de R5 vers X4 a été évaluée à l'aide de cellules MT2 cultivées à une densité de 0.10×10^6 cellules/ml et mises en contact pendant une semaine avec le surnageant des cellules HOS CXCR4-A ou HOS CXCR4-B infectées.

¹⁴ Le FPR (False Positive Rate) est un score qui prédit l'utilisation du corécepteur CCR5 par le séquençage de la partie V3 de la gp120. Plus cette valeur est élevée et plus la chance d'utiliser CCR5 comme corécepteur est grande. On considère que les patients ayant un FPR inférieur à 10 possèdent des souches utilisant CXCR4 comme corécepteur.

Nous avons observé une apparition de souches X4 plus rapide dans les cellules HOS CXCR4-B infectées par un virus HIV-R5 que dans les cellules HOS CXCR4-A (4 jours après infection pour CXCR4-B et 11 jours après infection pour CXCR4-A).

VI) Stratégie d'inhibition de l'isoforme CXCR4-B :

Etant donnée l'efficacité de CXCR4-B comme corécepteur des virions HIV-X4, il pourrait être intéressant de développer un moyen thérapeutique d'inhiber cette isoforme. Effectivement, l'inhibition totale de l'expression de CXCR4 par thérapie génique ou son blocage par des antagonistes n'est pas envisageable à long terme étant donné les rôles physiologiques vitaux de ce récepteur de chimiokines, notamment en ce qui concerne la domiciliation des cellules souches hématopoïétiques (Zou, Kottmann et al. 1998). Dans la mesure où nous avons établi que les deux isoformes sont physiologiquement équivalentes vis-à-vis du chimiotactisme, une solution alternative pourrait être de cibler uniquement l'isoforme la plus performante comme corécepteur viral.

Dans le but d'établir une telle preuve de concept, nous avons utilisé un siRNA de 19 bases ciblant la séquence de l'ARNm codant pour CXCR4-B¹⁵ qui est absente de l'ARNm codant pour CXCR4-A. Pour cela, des cellules HeLa-P4 ont été transfectées avec 2 nM de siRNA visant CXCR4-B ou un siRNA témoin négatif. 48h après la transfection, les cellules ont été analysées par cytométrie pour évaluer l'expression membranaire de CXCR4 [Figure 39]. L'ARN des cellules a ensuite été extrait puis l'expression des deux isoformes de CXCR4 a été mesurée par RTqPCR comme précédemment [Figure 40].

¹⁵ siRNA ciblant CXCR4-B : 5'-gcagcagguagcaaaguga-3'.

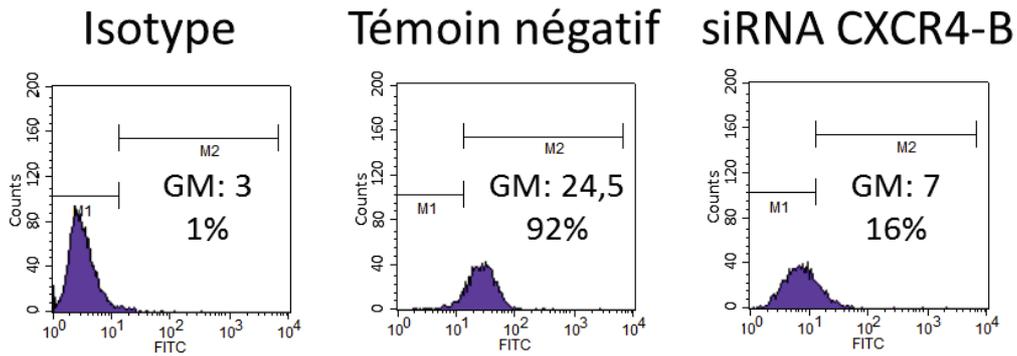


Figure 39 : Expression membranaire de CXCR4 après transfection de siRNA ciblant CXCR4-B.

Les cellules HeLa-P4 ont été transfectées avec 2 nM de siRNA ciblant CXCR4-B ou un siRNA témoin négatif. 48h après la transfection, l'expression¹⁶ de CXCR4 a été évaluée à la membrane cellulaire des deux lignées par cytométrie de flux à l'aide de l'anticorps anti-CXCR4 12G5 qui reconnaît les deux isoformes.

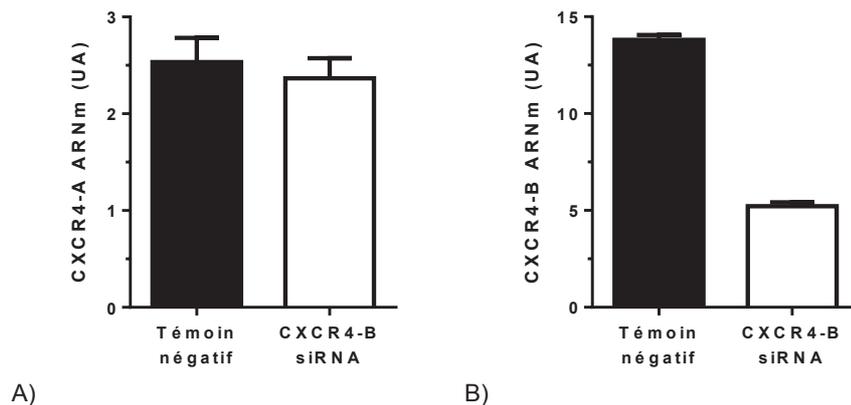


Figure 40 : Expression des ARNm des isoformes de CXCR4 après transfection de siRNA ciblant CXCR4-B.

Les cellules HeLa-P4 ont été transfectées avec 2 nM de siRNA ciblant CXCR4-B ou un siRNA témoin négatif. 48h après la transfection, l'ARNm des cellules a été extrait puis la quantité des deux isoformes d'ARNm CXCR4-A (A) et CXCR4-B (B) a été évaluée par RTqPCR.

Par cytométrie de flux, nous avons montré une baisse de l'expression de CXCR4 totale à la surface des cellules HeLa-P4. La RTqPCR a révélé une diminution partielle de la quantité d'ARNm CXCR4-B (inhibition de 63% +/- 4%, $p < 0.0001$).

¹⁶ GM : intensité moyenne de fluorescence.

L'ARNm CXCR4-A n'a pas été affecté par le siRNA spécifique de CXCR4-B ($p=0.4267$).

L'effet de cette inhibition a été testé sur l'infection des cellules HeLa-P4 par un virus HIV-X4 répliatif. Pour cela, les cellules HeLa-P4 ont été transfectées comme précédemment par siRNA puis infectées, 72h après la transfection, par un virus HIV-X4 répliatif. Deux fois par semaine, la transfection a été reproduite pour maintenir un taux maximum d'inhibition de l'isoforme CXCR4-B et la production virale a été évaluée par mesure de la protéine p24 dans le surnageant cellulaire [Figure 41].

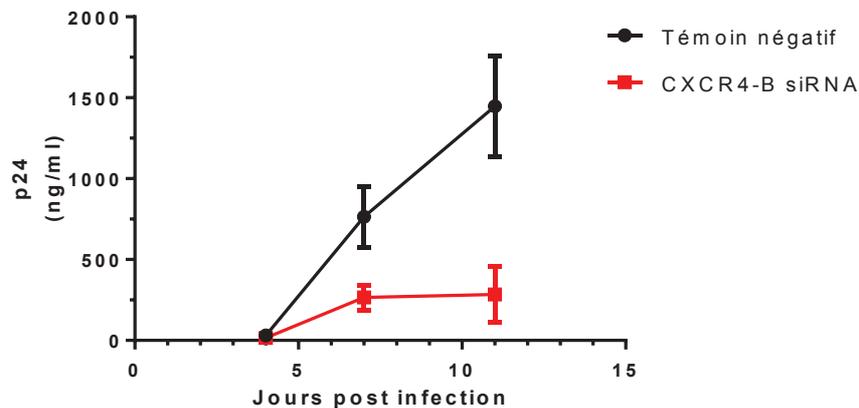


Figure 41 : Effet de l'inhibition d'expression de CXCR4-B sur l'infectabilité d'un virus répliatif HIV-X4.

Les cellules HeLa-P4 ont été transfectées avec 2 nM de siRNA ciblant CXCR4-B ou un siRNA témoin négatif. 72h après la transfection, les cellules ont été infectées en triplicatas avec 10 ng/ml de virus répliatif HIV-X4 pendant 24h, lavées avec du PBS et cultivées pendant 11 jours avec ajustement du nombre de cellules et transfection avec les siRNA deux fois par semaine. La production virale a été quantifiée par mesure de la concentration en gag p24 dans le surnageant de culture.

La suppression de l'isoforme CXCR4-B par le siRNA spécifique a entraîné une diminution de 81% +/- 9% ($p=0.0048$) de l'infection par un virus répliatif HIV-X4, 11 jours après le début de l'infection.

Il semble donc possible de cibler spécifiquement l'isoforme CXCR4-B pour diminuer l'infection par un virus HIV-X4 tout en gardant l'expression de CXCR4-A, ce qui permettrait de ne pas bloquer complètement les fonctions physiologiques de CXCR4.

VII) Les isoformes CXCR4 dans les PBMC humaines :

- a. Effet de l'activation et de l'infection sur la proportion des deux isoformes de CXCR4 *in vitro*.

L'effet de l'infection par différents virus réplicatifs (R5 et X4) sur le rapport en ARNm de CXCR4-B / CXCR4-A a ensuite été testé sur des PBMC de donneurs sains.

Dans des expériences préliminaires, nous avons observé une forte diminution des ARNm de CXCR4-A et de CXCR4-B lorsque les cellules ont été activées avec PHA/IL2 pendant 48h avant l'infection. Pour éviter cet effet, les cellules ont donc été infectées sans activation préalable. Pour cela, les PBMC de 6 donneurs sains ont été purifiées, puis 5 millions de PBMC par donneur ont été congelées, 5 millions ont été infectées avec un virus réplicatif HIV-R5 et 5 millions ont été infectées avec un virus réplicatif HIV-X4. L'ARN a été extrait au 6^{ème} jour d'infection, après évaluation de la production virale dans le surnageant de culture [Tableau 6]. La quantité en ARNm des deux isoformes de CXCR4 a ensuite été quantifiée comme précédemment par RTqPCR [Figure 42].

Donneurs	Infection R5 (ng p24)	Infection X4 (ng p24)
1	0,96	3,63
2	0,68	8,19
3	1,48	5,79
4	0,92	4,68
5	0,96	29,43
6	0,8	4,8

Tableau 6 : Quantification de la production virale par le dosage de la protéine p24 dans le surnageant.

Les PBMC de 6 donneurs sains ont été isolées par centrifugation de densité sur milieu de séparation des lymphocytes. 5 millions de PBMC par donneur ont été infectées avec 350 ng de virus réplicatif HIV-R5 ou HIV-X4. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 6 jours et la production virale a été quantifiée par mesure de la protéine p24 dans le surnageant de culture.

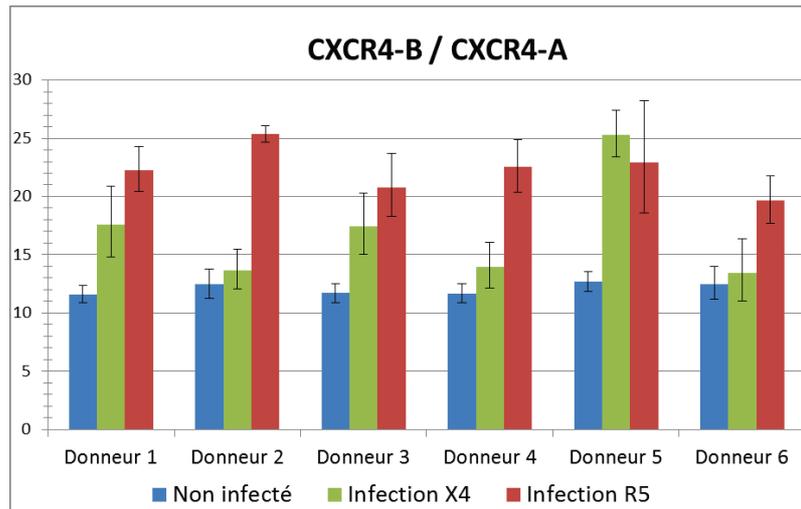


Figure 42 : Expression des isoformes CXCR4 dans des PBMC infectées ou non par un virus R5 ou X4.

5 millions de PBMC de donneurs sains ont été congelées (PBMC non infectées), 5 millions ont été infectées avec un virus répliquatif HIV-R5 ou HIV-X4. Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 6 jours puis l'ARNm de ces PBMC a été extrait. Les ratios CXCR4-B / CXCR4-A ont été évalués comme précédemment par RTqPCR.

Nous avons observé que l'infection virale augmentait le ratio CXCR4-B / CXCR4-A d'un facteur 1.84 ± 0.16 ($p < 0.0001$) lors de l'infection par un virus répliquatif HIV-R5. L'infection par un virus HIV-X4 a augmenté également ce ratio, mais dans de moindres proportions (augmentation d'un facteur 1.40 ± 0.35 , $p = 0.0444$).

b. Proportions des isoformes de CXCR4 chez les personnes infectées par le VIH.

Donneur	Souches	Traitement	CXCR4-A	CXCR4-B	CXCR4-B / CXCR4-A	T4	T4 (%)	T4/T8	Virémie	FPR
EFS 1	-		8,03E+01	2,73E+02	3,40E+00					
EFS 2	-		1,05E+02	3,14E+02	2,99E+00					
EFS 3	-		9,26E+01	1,92E+02	2,08E+00					
EFS 4	-		6,89E+01	3,11E+02	4,51E+00					
EFS 5	-		1,53E+02	3,94E+02	2,57E+00					
EFS 6	-		1,05E+02	2,92E+02	2,78E+00					
EFS 7	-		1,43E+02	4,82E+02	3,38E+00					
EFS 8	-		1,23E+02	3,85E+02	3,12E+00					
EFS 9	-		6,99E+01	3,02E+02	4,32E+00					
EFS 10	-		1,86E+02	5,27E+02	2,83E+00					
EFS 11	-		1,74E+02	4,96E+02	2,85E+00					
VIH 1	R5	oui	6,66E+01	1,78E+02	2,68E+00	296	23,3	0,45	20	55,7
VIH 2	R5	oui	8,61E+01	2,78E+02	3,23E+00	542	35,3	1,16	indéetectable	94,5
VIH 3	R5	non	6,13E+01	1,41E+02	2,30E+00	315	19,2	0,33	12550	89,1
VIH 4	R5	oui	5,02E+01	9,57E+01	1,91E+00	622	26,4	0,57	101	94,5
VIH 5	R5	oui	6,24E+01	2,08E+02	3,32E+00	689	24,9	0,49	39	39,8
VIH 6	R5	non	1,66E+02	7,02E+02	4,22E+00	317	18	0,25	52100	31,7
VIH 7	R5	non	1,20E+02	4,86E+02	4,06E+00	1030	32,1	0,61	4364	83
VIH 8	R5	oui	1,17E+02	3,99E+02	3,41E+00	729	49	1,29	indéetectable	75,6
VIH 9	R5	non	1,00E+02	4,02E+02	4,01E+00	401	23	0,43	34700	49,3
VIH 10	R5	non	1,26E+02	5,51E+02	4,37E+00	619	26	0,47	17500	44,5
VIH 11	R5	non	9,45E+01	3,42E+02	3,62E+00	365	20	0,33	14900	57,1
VIH 12	R5	oui	4,95E+01	2,47E+02	5,00E+00	616	41,7	1,16	indéetectable	31
VIH 13	X4	oui	7,27E+01	1,45E+02	2,00E+00	812	37,5	0,83	54	7,8
VIH 14	X4	oui	5,55E+01	1,59E+02	2,85E+00	262	16,5	0,29	indéetectable	2,9
VIH 15	X4	oui	8,61E+01	2,37E+02	2,76E+00	277	34,3	0,75	indéetectable	1,3
VIH 16	X4	oui	6,18E+01	1,24E+02	2,01E+00	182	19,8	0,43	indéetectable	1,1
VIH 17	X4	oui	1,01E+02	1,61E+02	1,60E+00	121	13,3	0,28	indéetectable	5

Tableau 7 : Proportion des ARNm des deux isoformes de CXCR4 dans les PBMC de donneurs sains et de personnes infectées par le VIH.

Les ARNm des PBMC de 11 donneurs sains et de 17 patients VIH ont été extraits puis les quantités des ARNm de deux isoformes de CXCR4 ont été quantifiées par RTqPCR. Les données biocliniques (traitement antirétroviral, souche virale, T4, T8, virémie et FPR) sont rapportées ici.

La proportion des ARNm des deux isoformes a été comparée entre 11 donneurs sains et des 17 patients infectés. Ces derniers ont été regroupés selon la capacité des virions récoltés dans leur sang à utiliser CCR5 ou CXCR4 comme corécepteur

(souches R5 ou X4) [Tableau 7]. Il n'y a pas de différence significative entre les niveaux d'expression en ARNm de CXCR4-A, de CXCR4-B ou du ratio CXCR4-B/CXCR4-A entre les donneurs non infectés et les patients R5 [Figure 43].

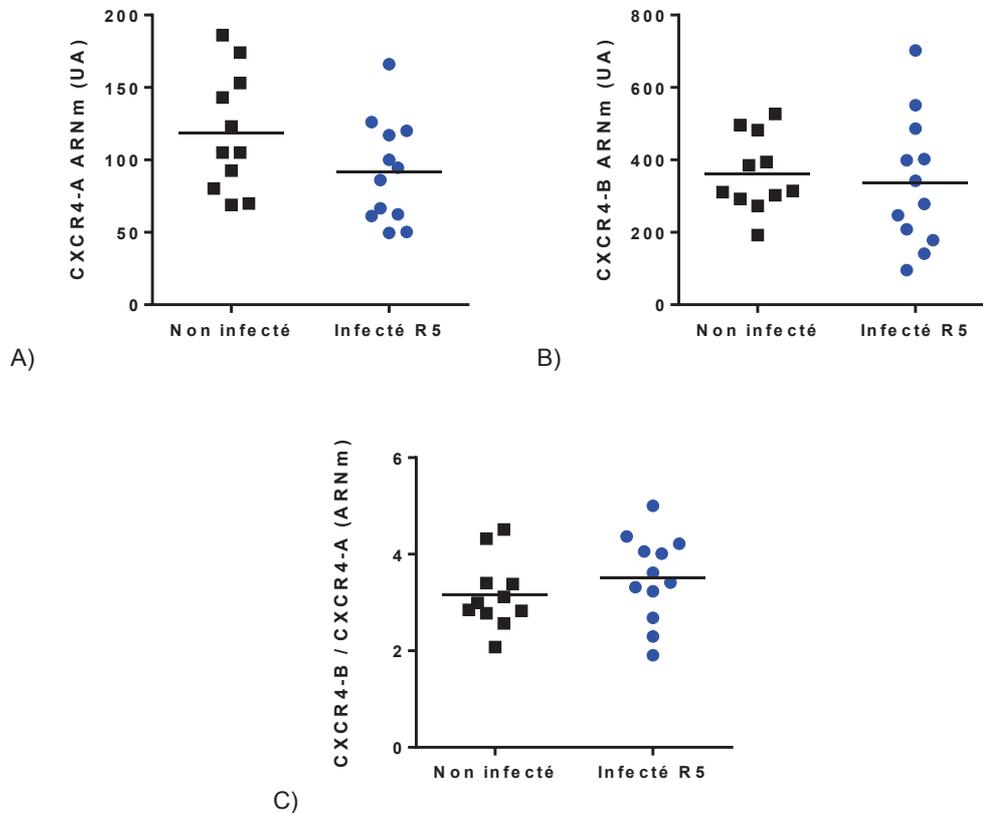


Figure 43 : Quantités relatives des ARNm des isoformes de CXCR4.

Après isolement des PBMC et extraction des ARN de différents donneurs, les ARNm des isoformes de CXCR4 ont été quantifiés comme précédemment par RTqPCR puis comparés selon le type d'infection : A) ARNm de CXCR4-A ($p=0.1115$ entre donneurs sains et patients R5). B) ARNm de CXCR4-B ($p=0.6941$ entre donneurs sains et patients R5). C) ratio des ARNm CXCR4-B / CXCR4-A ($p=0.3242$ entre donneurs sains et patients R5).

c. Corrélation entre les isoformes de CXCR4 et les données immunologiques de patients.

Les quantités d'ARNm des deux isoformes de CXCR4 dans les PBMC de patients ont ensuite été comparées à la proportion de lymphocytes T CD4 ou CD8 (T4 ou T8) quantifiée dans le sang des différents patients R5.

Aucune corrélation n'a été trouvée avec la quantité absolue de T4 [Figure 44], le pourcentage de T4 [Figure 45] ou le rapport T4/T8 [Figure 46] parmi les patients R5.

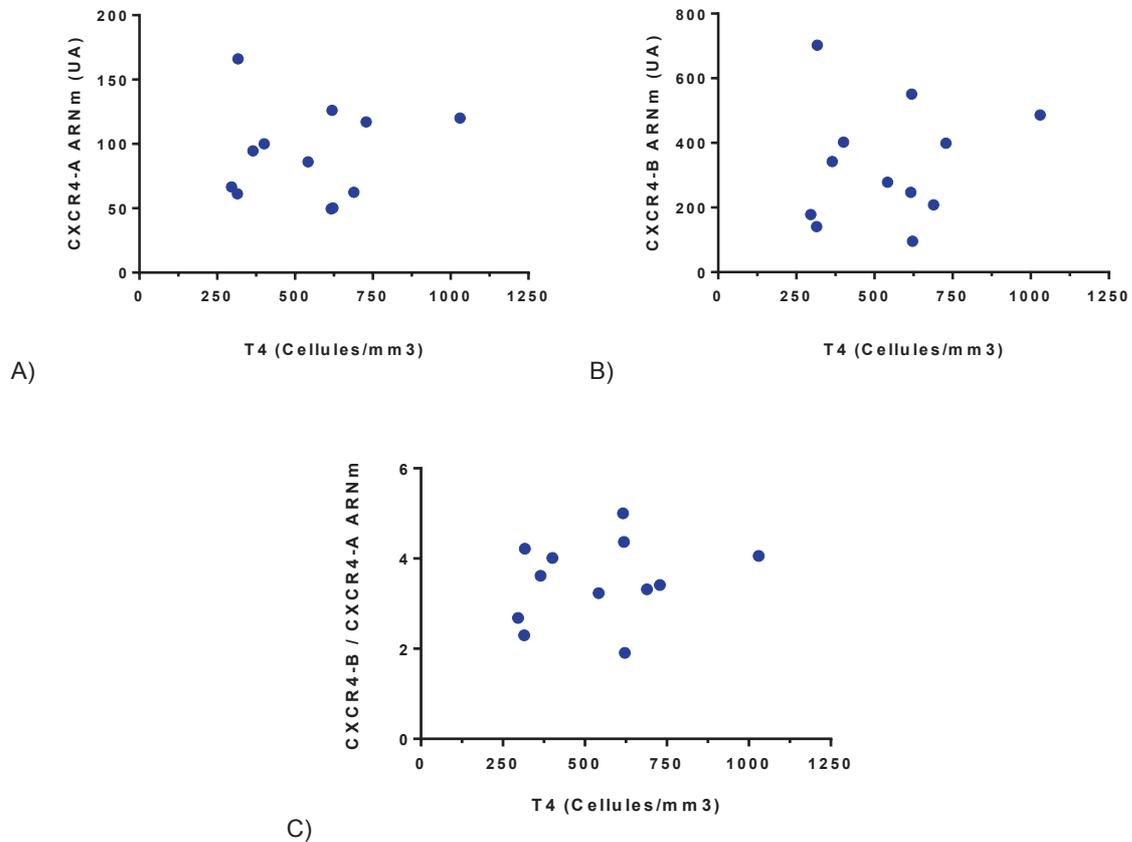


Figure 44 : ARNm des isoformes de CXCR4 en fonction du taux de T4 chez des personnes infectées par le VIH.

Après isolement des PBMC et extraction des ARN de différents sujets infectés par des virus R5, l'ARNm des isoformes de CXCR4 a été quantifié comme précédemment par RTqPCR. La quantité de ces ARNm a été comparée à la numération des lymphocytes T CD4 dans le sang (cellules/mm³): A) ARNm de CXCR4-A. B) ARNm de CXCR4-B. C) ratio des ARNm CXCR4-B / CXCR4-A.

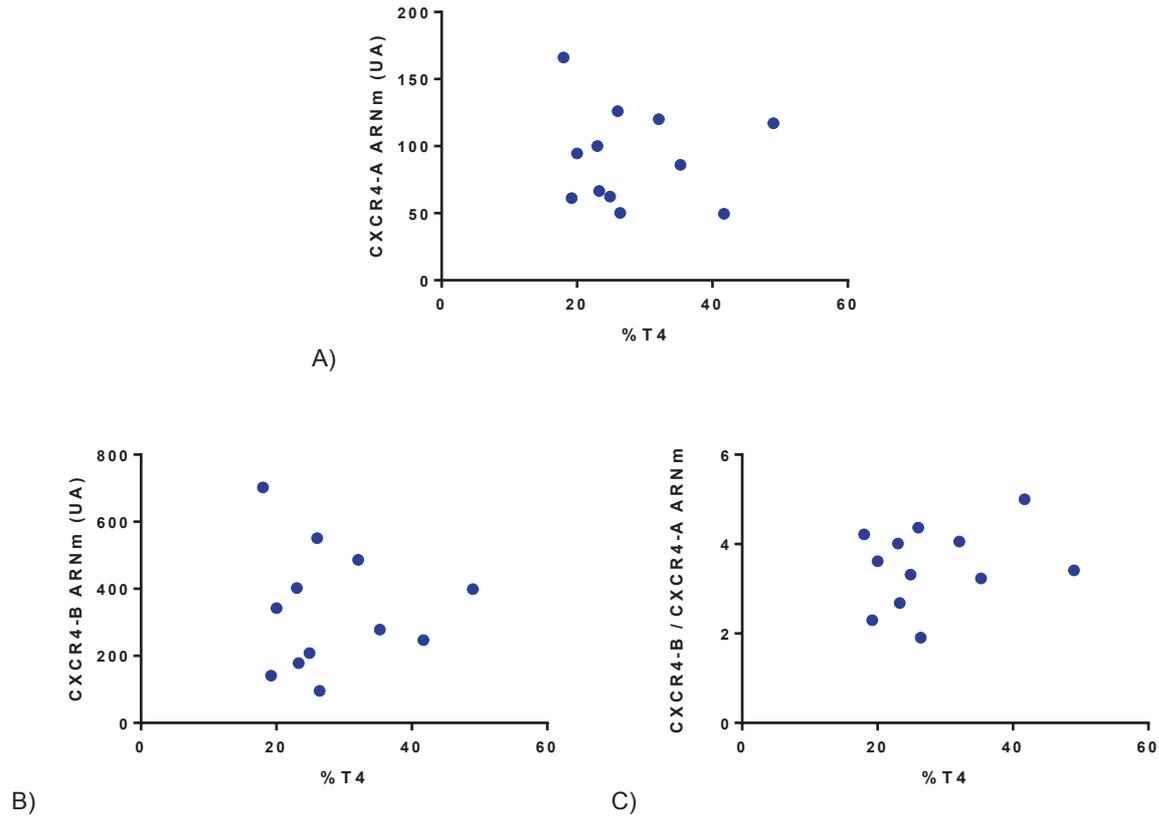


Figure 45 : ARNm des isoformes de CXCR4 en fonction du pourcentage de T4 chez des personnes infectées par le VIH.

Après isolement des PBMC et extraction des ARN de différents sujets infectés par des virus R5, l'ARNm des isoformes de CXCR4 a été quantifié comme précédemment par RTqPCR. La quantité de ces ARNm a été comparée au pourcentage de lymphocyte T CD4 mesurée dans le sang : A) ARNm de CXCR4-A. B) ARNm de CXCR4-B. C) ratio des ARNm CXCR4-B / CXCR4-A.

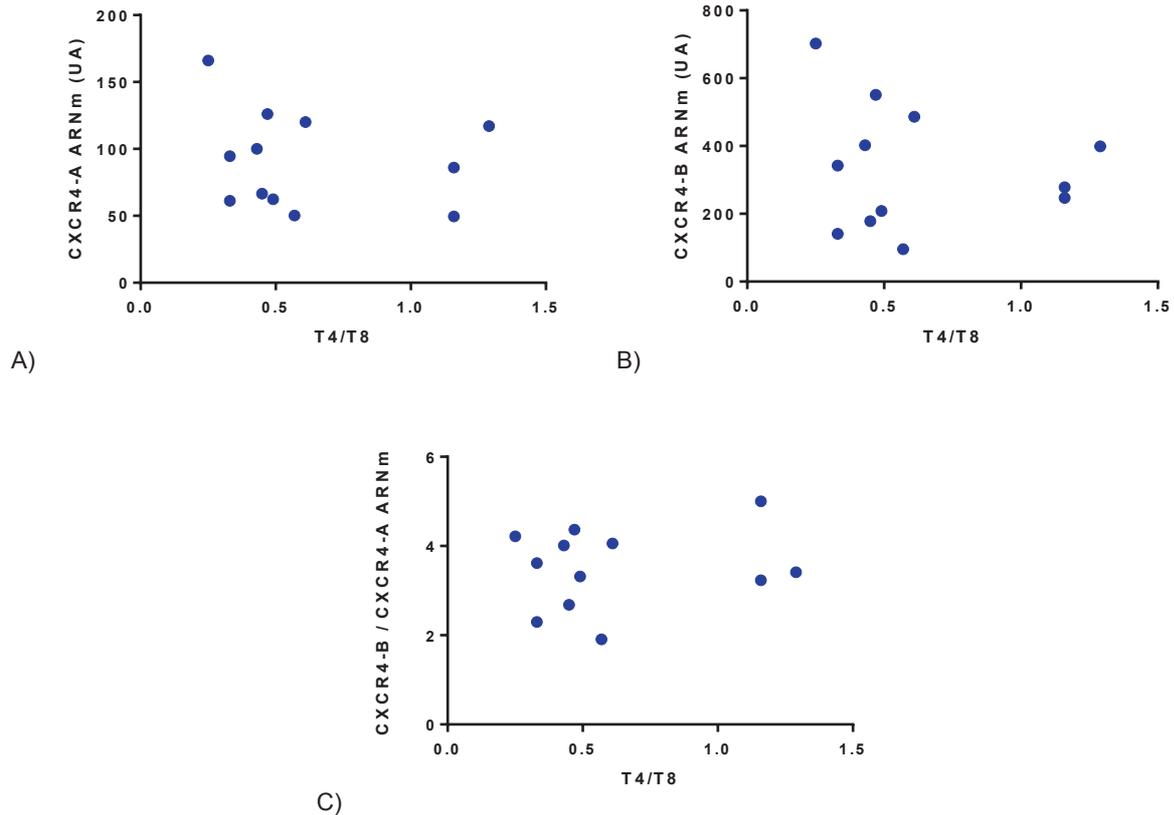


Figure 46 : ARNm des isoformes de CXCR4 en fonction du rapport T4/T8 chez des personnes infectées par le VIH.

Après isolement des PBMC et extraction des ARN de différents sujets infectés par des virus R5, l'ARNm des isoformes de CXCR4 a été quantifié comme précédemment par RTqPCR. La quantité de ces ARNm a été comparée au ratio lymphocyte T CD4 / lymphocyte T CD8 mesurée dans le sang : A) ARNm de CXCR4-A. B) ARNm de CXCR4-B. C) ratio des ARNm CXCR4-B / CXCR4-A.

Cette absence de corrélation indique que la diminution du nombre de cellules T CD4, ou du pourcentage T4 ou encore du rapport T4/T8 chez les patients infectés par le VIH n'est pas liée à la quantité en ARNm des isoformes de CXCR4.

- d. Corrélation entre les isoformes de CXCR4 et les données virologiques de patients.

Chez les patients R5, une tendance à la corrélation a été observée entre la virémie et la quantité d'ARNm codant pour l'isoforme CXCR4-A ($p=0.0771$, $r=0.5352$) ou

CXCR4-B ($p=0.1016$, $r=0.5000$) et une corrélation significative a été obtenue entre la virémie et le ratio des deux isoformes ($p=0.0545$, $r=0.6014$) [Figure 47].

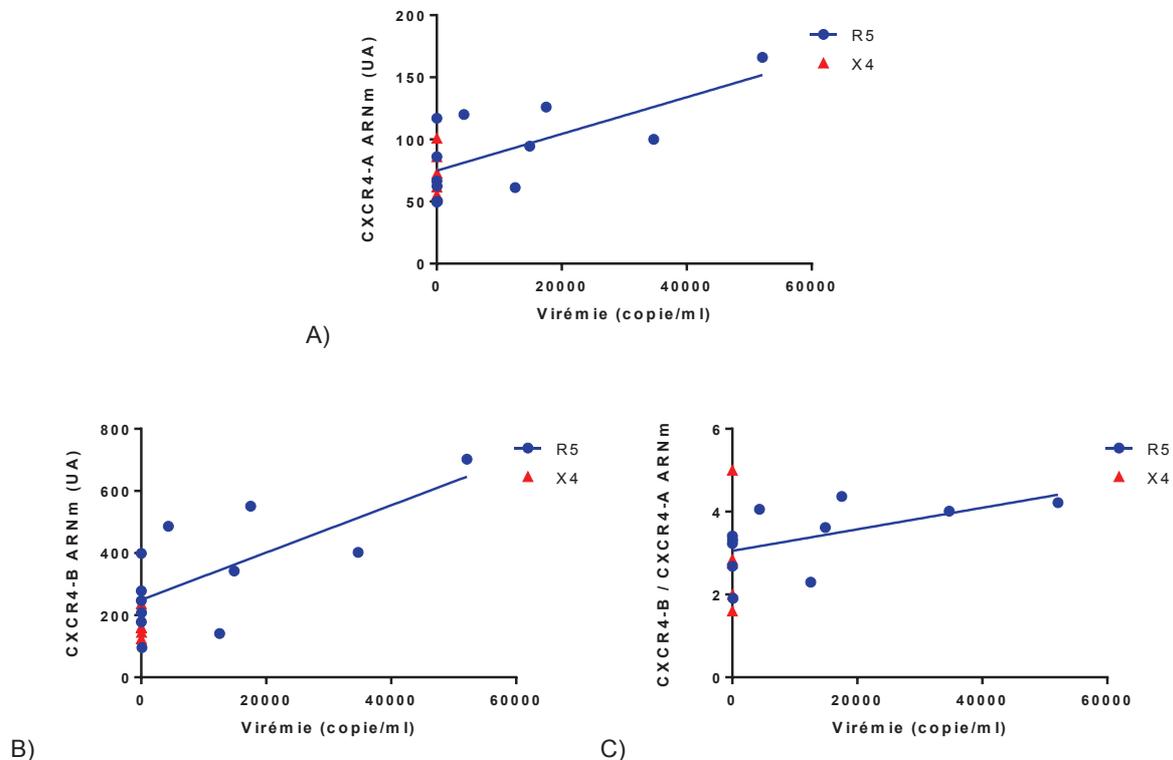


Figure 47 : ARNm des isoformes de CXCR4 en fonction de la virémie chez des personnes infectées par le VIH.

Après isolement des PBMC et extraction des ARN de différents sujets infectés par des virus R5 ou X4, l'ARNm des isoformes de CXCR4 a été quantifié comme précédemment par RTqPCR. La quantité de ces ARNm a été comparée à la virémie (copie/ml) : A) ARNm de CXCR4-A. B) ARNm de CXCR4-B. C) ratio des ARNm CXCR4-B / CXCR4-A.

Nous avons également remarqué une corrélation inverse entre le FPR¹⁷ de patients R5 et le ratio des ARNm des deux isoformes ($p=0.0102$, $r=-0.7180$) [Figure 48].

¹⁷ Le FPR (False Positive Rate) est un score qui prédit l'utilisation du corécepteur CCR5 par le séquençage de la partie V3 de la gp120. Plus cette valeur est élevée et plus la chance d'utiliser CCR5 comme corécepteur est grande. On considère que les patients ayant un FPR inférieur à 10 possèdent des souches utilisant CXCR4 comme corécepteur.

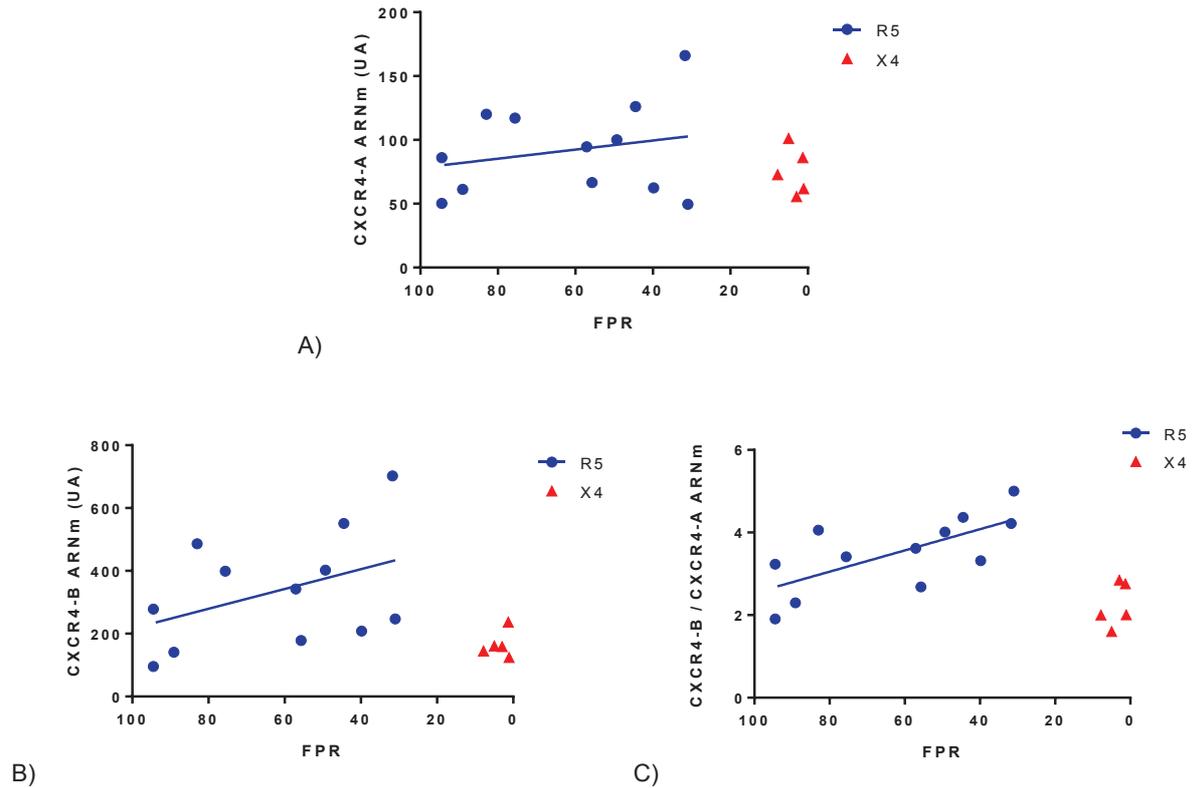


Figure 48 : ARNm des isoformes de CXCR4 en fonction du score FPR chez des personnes infectées par le VIH.

Après isolement des PBMC et extraction des ARN de différents sujets infectés par des virus R5 ou X4, l'ARNm des isoformes de CXCR4 a été quantifié comme précédemment par RTqPCR. La quantité de ces ARNm a été comparée au score FPR (False Positive Rate) : A) ARNm de CXCR4-A ($p=0.6070$, $r=-0.1611$ chez les patients R5). B) ARNm de CXCR4-B ($p=0.2063$, $r=-0.3888$ chez les patients R5). C) ratio des ARNm CXCR4-B / CXCR4-A ($p=0.0102$, $r=-0.7180$ chez les patients R5).

Ce résultat indique donc une corrélation positive entre le ratio en ARNm CXCR4-B / CXCR4-A et la probabilité pour un patient d'avoir effectué une conversion d'un virus R5 à un virus X4.

Ceci laisse supposer que l'infection par un virus R5 pourrait causer, *in vivo*, chez l'individu infecté par le VIH, une augmentation de la proportion de CXCR4-B par rapport à CXCR4-A, ce qui pourrait favoriser la commutation virale de R5 vers X4. A noter qu'après la commutation, donc parmi les patients X4, nous avons observé une forte diminution de CXCR4-B par rapport à CXCR4-A.

C. Conclusions et perspectives

Au cours de ce projet, nous avons étudié les différentes caractéristiques des deux isoformes de CXCR4. Ces deux isoformes diffèrent de 9 acides aminés en NH₂ terminal, le reste de la molécule étant identique. Nous avons mis en évidence que l'infection par des virus X4 est plus importante dans les cellules n'exprimant que l'isoforme CXCR4-B par rapport aux cellules n'exprimant que l'isoforme CXCR4-A. Nous avons établi que la différence d'infection par les deux isoformes provient d'une différence d'entrée des virus X4 dans les cellules, démontrée par la quantification des rétrotranscrits viraux précoces. Mise à part cette différence de fonctionnalité en tant que récepteur pour le VIH, les deux isoformes possèdent plusieurs caractéristiques identiques. En effet, les cellules CXCR4-A et les cellules CXCR4-B migrent de la même manière vers leur ligand naturel CXCL12. On observe que ce résultat est en contradiction avec ce qui a été obtenu par Gupta et coll. (Gupta et Pillarisetti 1999). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les lignées cellulaires utilisées ne sont pas les mêmes, ni les techniques pour faire exprimer les deux isoformes de CXCR4 à la membrane cellulaire. De plus, dans l'article de Gupta et coll., il manque un contrôle positif de migration cellulaire qui attesterait que la différence de chimiotactisme observée est bien spécifique et non due à un déficit global de migration. En effet, ces auteurs ont utilisé une lignée stablement transfectée qui a été sélectionnée ; or cette sélection peut isoler des clones déficients pour d'autres caractéristiques que celle recherchée.

Nous avons également montré que CXCL12 inhibe l'infection via les deux isoformes de manière équivalente et stimule l'expression génique du promoteur LTR du VIH par les deux isoformes de CXCR4 de manière comparable.

Nous avons ensuite montré que les PBMC expriment constitutivement les deux isoformes de CXCR4, l'isoforme CXCR4-B étant plus exprimée que CXCR4-A, d'un facteur 2 à 10 selon les donneurs. Une expérience *in vitro* a alors permis de montrer que le ratio en ARNm CXCR4-B / CXCR4-A est augmenté lors de l'infection des PBMC de donneurs sains par un virus R5. Aussi, chez les patients R5, nous avons obtenu une corrélation positive entre le ratio des ARNm CXCR4-B / CXCR4-A et la virémie, ainsi qu'une corrélation négative entre ce même ratio et le FPR, score prédictif de l'utilisation du corécepteur CCR5 ou CXCR4. De plus, la commutation de

R5 vers X4 apparaît plus rapidement au cours d'une infection par un virus HIV-R5 dans des cellules exprimant l'isoforme CXCR4-B que dans des cellules exprimant l'isoforme CXCR4-A.

Tous ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse qu'*in vivo*, l'infection par un virus R5 augmenterait le ratio en ARNm CXCR4-B / CXCR4-A et que cette augmentation pourrait être en partie responsable de la commutation des virus R5 en virus X4. Dans cette hypothèse, l'évaluation chez les patients infectés par le VIH du ratio CXCR4-B / CXCR4-A pourrait permettre de prévoir la commutation et donc d'ajuster le traitement pour anticiper l'apparition des souches X4.

Par l'utilisation de siRNA, nous avons établi qu'il est possible de ne supprimer que CXCR4-B en ciblant une séquence spécifique de l'ARNm de cette isoforme. Il semble donc possible de cibler le récepteur CXCR4 pour modifier l'infection via son isoforme CXCR4-B tout en gardant ses fonctions vitales assurées par la seconde isoforme CXCR4-A. On peut donc envisager une thérapie d'inhibition de cette isoforme CXCR4-B, soit via des siRNA, ou des oligonucléotides catalytiques, ou encore via des anticorps, à utiliser en association avec les thérapies cellulaires visant à inhiber l'expression de CCR5 (Maraviroc). On peut également envisager de combiner cette technique entraînant une déficience en CXCR4-B à un transgène codant pour l'isoforme CXCR4-A pour n'exprimer que cette isoforme qui est plus résistante à l'infection et capable de répondre à CXCL12. Il serait d'ailleurs utile de produire des anticorps spécifiques de l'une ou l'autre des isoformes, qui permettraient d'évaluer directement leur expression membranaire.

Aussi, il me semble important d'évaluer les différents facteurs responsables de l'augmentation du ratio en ARNm CXCR4-B / CXCR4-A, ainsi que l'effet de la mise sous traitements antirétroviraux sur la proportion en ARNm des deux isoformes de CXCR4. Il serait également intéressant d'estimer l'effet de la suppression de l'isoforme CXCR4-B chez les patients R5 sur l'apparition des souches X4. En effet, si le ratio en ARNm CXCR4-B / CXCR4-A est bien responsable de la commutation R5 vers X4, il serait possible de bloquer l'apparition des souches X4 via cette stratégie thérapeutique.

**Projet II : Interactions de S1P1 avec le corécepteur CCR5 du VIH et
son influence sur l'infection**

A. Introduction

CCR5 a un rôle très important dans l'infection par le VIH. En plus de jouer un rôle dans l'entrée virale, il détermine par sa densité à la surface des cellules T CD4 le taux de production virale, en modulant notamment la rétrotranscription au cours du cycle viral (Lin, Mettling et al. 2002). Ainsi, les patients ayant de fortes expressions membranaires de CCR5 à la surface des lymphocytes T CD4 ont des virémies élevées (corrélation logarithmique), progressent rapidement, répondent moins aux traitements antirétroviraux et ont des rebonds virologiques plus importants lorsque l'on interrompt leur traitement (Reynes, Portales et al. 2000; Gervaix, Nicolas et al. 2002; Reynes, Baillat et al. 2004). Aussi, une délétion de 32 paires de bases dans le gène *CCR5* induit l'expression d'un récepteur tronqué CCR5 Δ 32 qui n'est pas exprimé à la surface des cellules. Les personnes homozygotes pour cette mutation sont en général résistantes à l'infection par des souches R5, tandis que les personnes hétérozygotes progressent habituellement moins vite dans la maladie (Liu, Paxton et al. 1996). Moduler l'activité de CCR5 dans le but de diminuer l'infection est donc une piste thérapeutique attractive.

Le récepteur CCR5 fait partie de la famille des RCPG. Comme décrit précédemment, les membres de cette famille peuvent interagir physiquement entre eux, induire des changements conformationnels entre eux et ainsi moduler l'affinité des ligands pour leur récepteur, l'expression membranaire des récepteurs et/ou leur signalisation (Jordan et Devi 1999; Terrillon et Bouvier 2004). Quelques cas d'hétérodimérisation et d'hétérodésensibilisation de CCR5 avec d'autres RCPG ont été décrits dans la littérature. Dans certains cas, ceci semble avoir un impact sur l'infection par le VIH (Tableau 2, Tableau 3).

En amont de mon travail de thèse, l'équipe a réalisé un crible visant à déterminer les RCPG capables de s'hétérodimériser avec CCR5 et de diminuer l'infection par le VIH. Pour cela, l'ARNm des RCPG présents dans les lymphocytes T CD4 CCR5 et les macrophages a tout d'abord été quantifié. Les 39 RCPG les plus exprimés ont ensuite été testés pour leur effet sur l'infection par des virus HIV-R5 non répliquatifs dans des cellules HEK 293T. 9 RCPG ont montré un effet inhibiteur sur l'infection et ont ensuite été testés par FRET pour leur capacité à interagir physiquement avec

CCR5. Ce crible a alors permis de découvrir les propriétés d'hétérodimérisation du récepteur S1P1 avec CCR5 et la possibilité qu'il diminue l'infection par le VIH.

Mon projet a visé à étudier l'effet de S1P1 sur l'infection par le VIH. Plus précisément, cette étude devait déterminer s'il est possible de modifier l'infection par des souches R5 en agissant sur le récepteur S1P1.

B. Résultats

I) Expression de S1P1 :

- a. Expression de S1P1 dans les cellules lymphocytaires primaires chez l'homme.

L'expression de S1P1 a été évaluée dans différents compartiments cellulaires par cytométrie de flux. Aucune expression n'a été trouvée à la surface des PBMC, des macrophages et des lymphocytes contenus dans les amygdales et dans la rate. L'expression négative de S1P1 à la surface cellulaire des PBMC peut s'expliquer par la forte concentration de S1P dans le sang, ce qui entraîne l'internalisation de son récepteur, comme cela a été décrit chez la souris (Pappu 2007). L'expression de S1P1 a été détectée à la surface de cellules dendritiques différenciées *in vitro* et de lymphocytes extraits de ganglions lymphatiques [Figure 49].

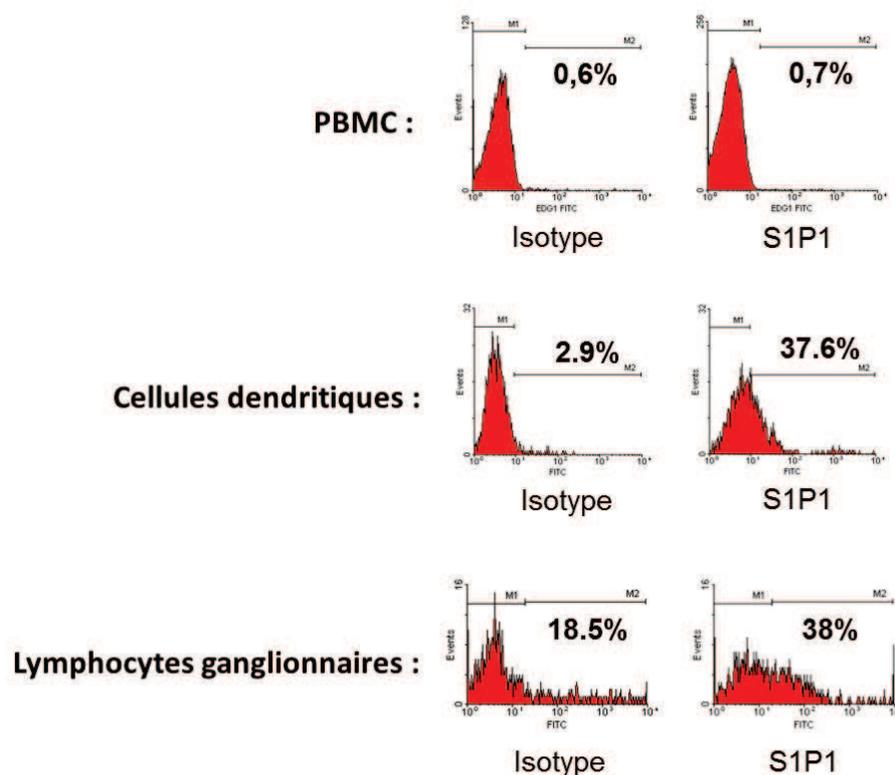


Figure 49 : Expression de S1P1 à la surface des cellules primaires.

L'expression de S1P1 a été mesurée à la surface A) de PBMC, B) de cellules dendritiques et C) de lymphocytes de ganglion lymphatique par cytométrie de flux après marquage indirect avec un anticorps anti-S1P1 ou un contrôle négatif.

b. Expression de S1P1 à la surface de lignées cellulaires.

Aucune expression (ou une expression très faible) de S1P1 n'a été détectée à la surface des nombreuses lignées cellulaires testées en cytométrie :

- Lignées lymphocytaires T : SUPT-1, H9, A201, MOLT.
- Lignée monocyttaire : THP1.
- Autres lignées : HeLa (cancer du col de l'utérus), HEK 293T (cellules embryonnaires du rein) et HOS (ostéosarcome).

La lignée HOS exprimant le récepteur CD4 a alors été transduite par un vecteur lentiviral pour obtenir une forte expression constitutive du corécepteur CCR5 à la membrane plasmique. Cette lignée HOS CCR5⁺ a été transduite à nouveau pour obtenir l'expression à la membrane du récepteur S1P1, mesurée par cytométrie de flux [Figure 50]. En parallèle, une lignée transduite avec le vecteur pHIV-LacZ (HOS CCR5 lacZ) a été obtenue par la même technique pour servir de témoin négatif.

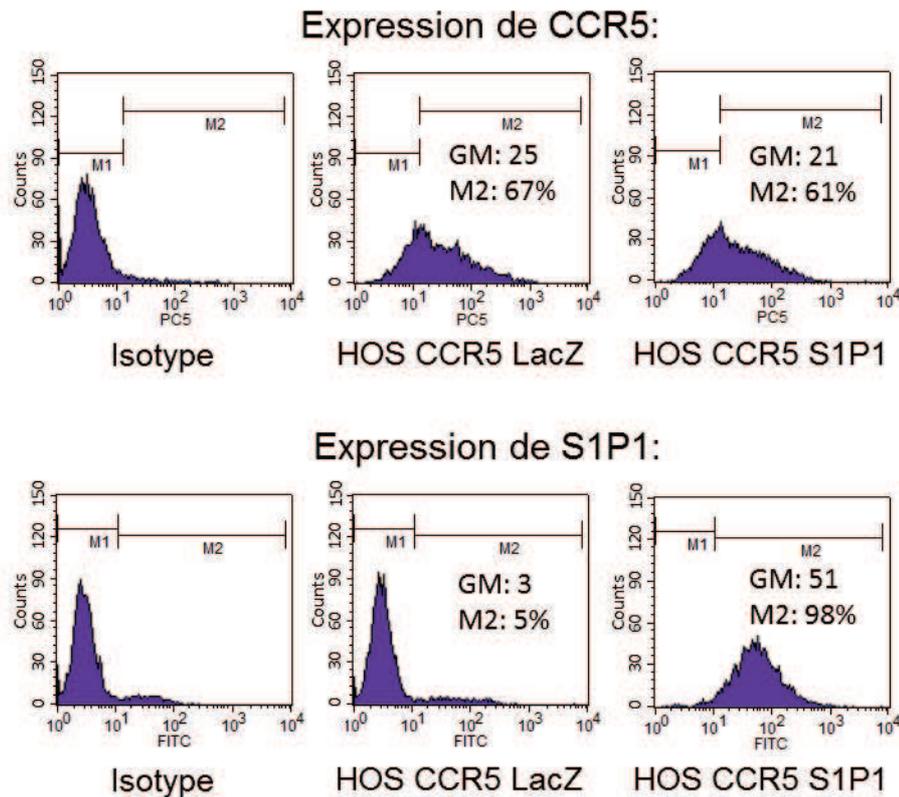


Figure 50 : Expression membranaire de S1P1 et CCR5 dans les cellules HOS transduites.

Une lignée cellulaire HOS a été transduite avec le vecteur pHIV-CCR5 puis avec des quantités équivalentes des vecteurs pHIV-LacZ ou pHIV-S1P1. L'expression membranaire¹⁸ des récepteurs CCR5 et S1P1 a ensuite été évaluée par cytométrie de flux à l'aide des anticorps monoclonaux de souris anti-CD195 et anti-S1P1, respectivement.

II) Inhibition par S1P1 de l'entrée du virus dans les cellules :

a. Infection par un virus non répliquatif R5.

Les deux lignées, HOS CCR5 S1P1 et HOS CCR5 LacZ, ont été infectées par différentes doses de virus non répliquatif R5-Luc ayant une délétion dans le gène *env*, le gène *luciférase* inséré dans le gène *nef* et étant pseudotypé avec une enveloppe R5. L'infectabilité des deux lignées a ensuite été évaluée 72h après l'infection [Figure 51].

¹⁸ GM : intensité moyenne de fluorescence.

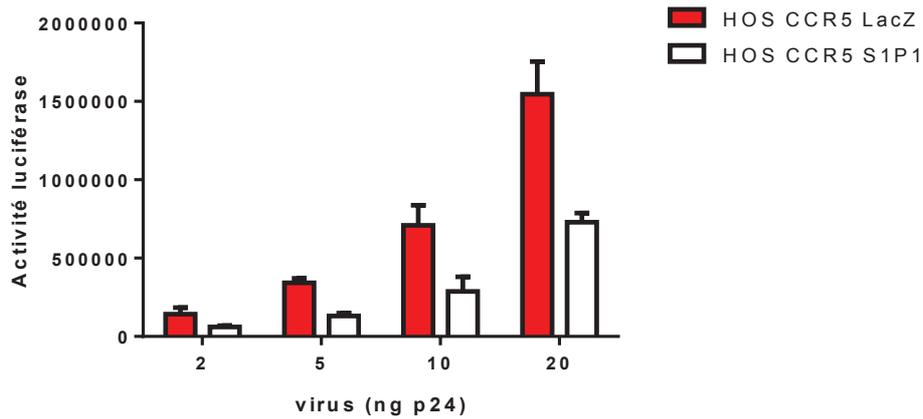


Figure 51 : Mesure de l'infectabilité des lignées HOS CCR5 LacZ et HOS CCR5 S1P1 par un virus non répliquatif R5-Luc.

Les cellules HOS CCR5 S1P1 et HOS CCR5 LacZ ont été infectées pendant 24h en triplicatas par différentes quantités de virus déficient R5-Luc. L'activité luciférase a été analysée 72h après infection par luminométrie.

Nous avons constaté donc que la simple présence du récepteur S1P1 à la membrane inhibe d'environ un facteur 2 l'infection de la lignée HOS par un virus R5 non répliquatif pour les concentrations testées (facteur 2.12 +/- 0.26, $p=0.0028$ pour 20 ng de virus).

De même, des cellules 293T CD4⁺ CCR5⁺ ont été transduites avec des quantités équivalentes en p24 avec les vecteurs pHIV-S1P1 ou pHIV-LacZ. Les expressions membranaires de S1P1 ainsi que de CCR5 ont été contrôlées par cytométrie de flux [Figure 52].

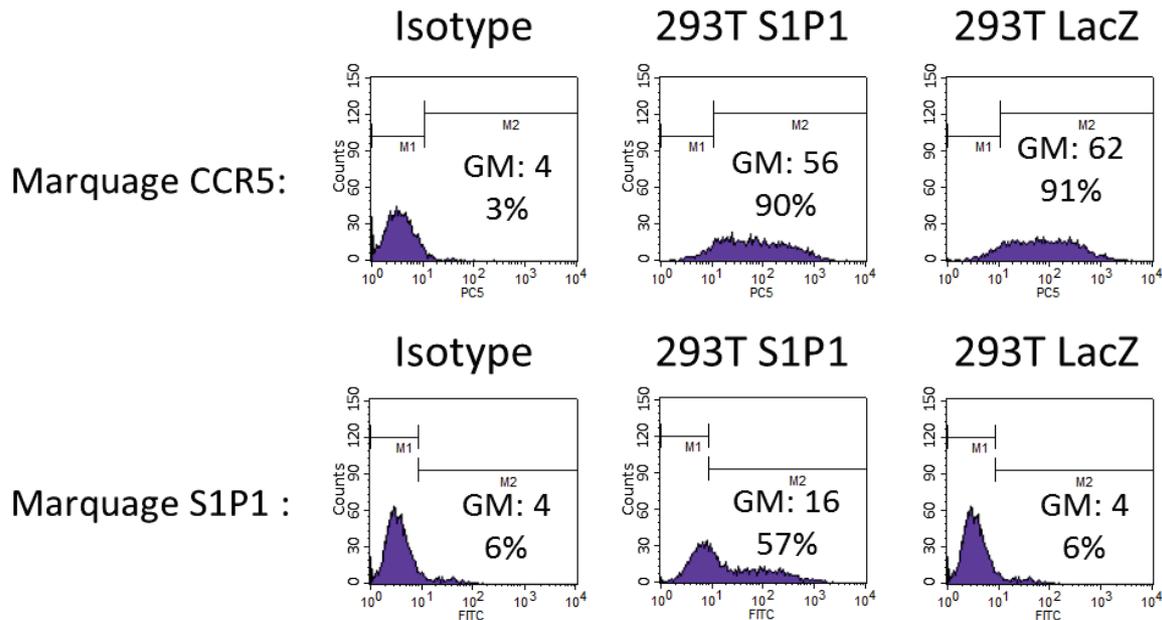


Figure 52 : Expression membranaire de CCR5 et S1P1 dans les cellules HEK 293T CD4⁺ transduites.

Une lignée HEK 293T CD4 a été transduite avec des quantités équivalentes des vecteurs pHIV-LacZ ou pHIV-S1P1. L'expression membranaire¹⁹ des récepteurs CCR5 et S1P1 a ensuite été évaluée par cytométrie de flux à l'aide des anticorps monoclonaux de souris anti-CD195 et anti-S1P1, respectivement.

Les cellules ont été infectées comme précédemment avec différentes quantités de virus non répliquatif R5-Luc. L'activité luciférase a été mesurée 72h après infection [Figure 53]. Nous avons retrouvé une différence d'infection entre les deux lignées, comme celle obtenue avec les cellules HOS LacZ et HOS S1P1. On note une différence entre les lignées 293T LacZ et 293T S1P1 d'un facteur 1.65 +/- 0.20 (p=0.0033) pour 20 ng de virus R5-Luc.

¹⁹ GM : intensité moyenne de fluorescence.

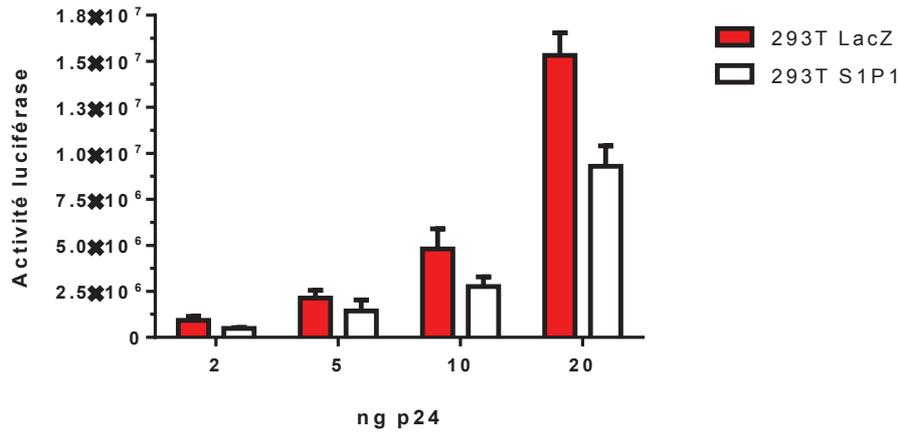


Figure 53 : Infection des lignées 293T CD4 LacZ et 293T CD4 S1P1 par un virus non répliquatif R5-Luc.

Les lignées 293T CCR5 S1P1 et 293T CCR5 LacZ ont été infectées par une gamme de virus non répliquatif R5-Luc. 24h après infection, les cellules ont été lavées puis l'activité luciférase a été évaluée dans les lysats cellulaires 72h après infection.

Pour prouver que la diminution d'infection observée entre la lignée HOS LacZ et HOS S1P1 n'est pas due à une différence de viabilité, des cellules ont été infectées comme précédemment et la viabilité a été évaluée après 3 jours d'infection par comptage des cellules mortes au bleu trypan [Figure 54]. L'infection a été contrôlée en parallèle par mesure de l'activité luciférase 72h après infection [Figure 55].

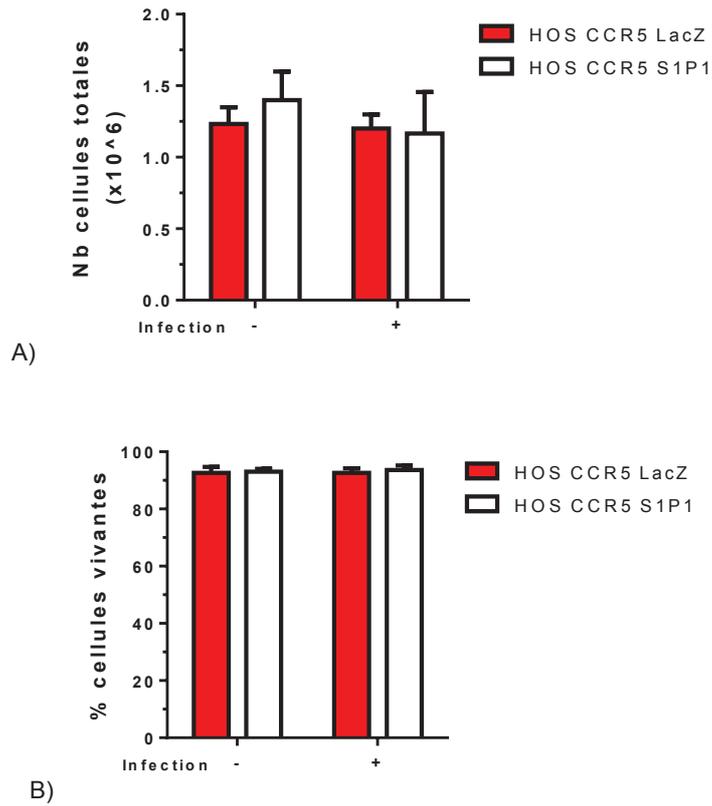


Figure 54 : Viabilité des HOS CCR5 S1P1 et HOS CCR5 LacZ infectées par un virus non répliquatif R5-Luc.

Les lignées HOS CCR5 S1P1 et HOS CCR5 LacZ ont été infectées par 60 ng d'un virus R5-Luc puis lavées 24h après infection. 72h après infection, le nombre total de cellules (A) et la viabilité cellulaire (B) ont été quantifiés dans les lignées infectées et non infectées à l'aide d'un compteur automatique de cellules et de lames de comptage prévues à cet effet et après marquage des cellules mortes au bleu trypan à 0,4%.

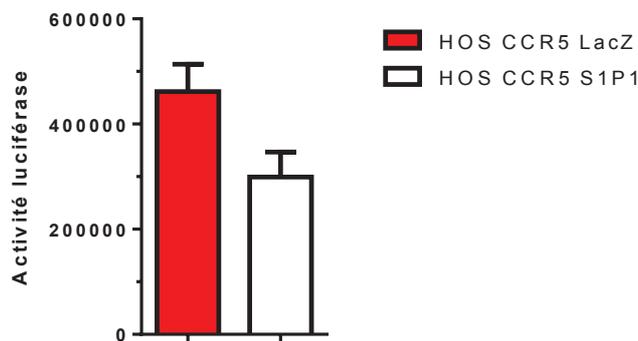


Figure 55 : Infection des lignées HOS CCR5 LacZ et HOS CCR5 S1P1 par un virus non répliquatif R5.

Les lignées HOS CCR5 S1P1 et HOS CCR5 LacZ ont été infectées par 60 ng d'un virus R5-Luc. 24h après infection, les cellules ont été lavées puis l'infection a été contrôlée comme précédemment par mesure de l'activité luciférase dans les lysats cellulaires 72h après infection (p=0.0160).

La viabilité était identique pour les deux lignées HOS S1P1 et HOS LacZ, que les cellules soient infectées ou non par un virus R5-Luc. La différence observée en infection n'est donc pas due à une différence de viabilité.

b. Infection par des virus VSV-G ou X4 non répliatifs.

Il a été précédemment montré par l'équipe que S1P1 et CCR5 interagissent physiquement [Annexe 3]. Nous avons alors émis l'hypothèse que la diminution d'infection observée par S1P1 serait due à un effet sur l'entrée du virus. Pour évaluer cette hypothèse, nous avons utilisé un virus non répliatif VSV-G-Luc ayant une délétion dans le gène *env*, le gène *luciférase* inséré dans le gène *nef* et pseudotypé avec l'enveloppe (protéine G) du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) n'utilisant donc pas le couple CD4-CCR5 comme récepteur pour infecter les cellules HOS S1P1 et HOS LacZ. Ce virus n'a donné aucune différence d'infection entre les deux lignées dans les conditions testées ($p=0.5139$ pour 20 ng de virus VSV-G-Luc) [Figure 56].

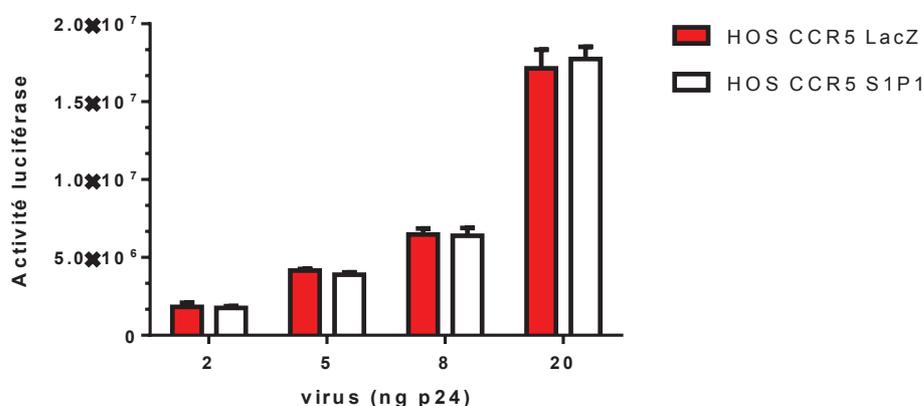


Figure 56 : Infection des lignées HOS S1P1 et HOS LacZ par un virus non répliatif pseudotypé par VSV-G.

Les cellules HOS CCR5 S1P1 et HOS CCR5 LacZ ont été infectées en triplicatas avec différentes concentrations de virus non répliatif VSV-G-Luc. L'infection a été mesurée comme précédemment par analyse de l'activité luciférase dans les lysats cellulaires 72h après infection.

Pour pouvoir tester l'effet de l'infection par un virus X4 non répliquatif, X4-Luc, les cellules HOS CCR5 ont été transduites avec le vecteur lentiviral pHIV-CXCR4-B pour exprimer le corécepteur CXCR4 et ainsi être infectables par un virus pseudotypé par une enveloppe X4. Les cellules ont ensuite été transduites avec les mêmes quantités des vecteurs pHIV-S1P1 ou pHIV-LacZ comme précédemment. Les cellules HOS CXCR4 S1P1 et HOS CXCR4 LacZ ont alors été infectées avec différentes quantités de virus X4-Luc ayant une délétion dans le gène *env*, le gène *luciférase* inséré dans le gène *nef* et pseudotypé avec une enveloppe X4. Comme ce qui a été obtenu avec un virus VSV-G-Luc, nous n'avons pas détecté de différence entre l'infection des deux lignées par un virus X4-Luc ($p=0.7327$ pour 100 ng de virus X4-Luc) [Figure 57].

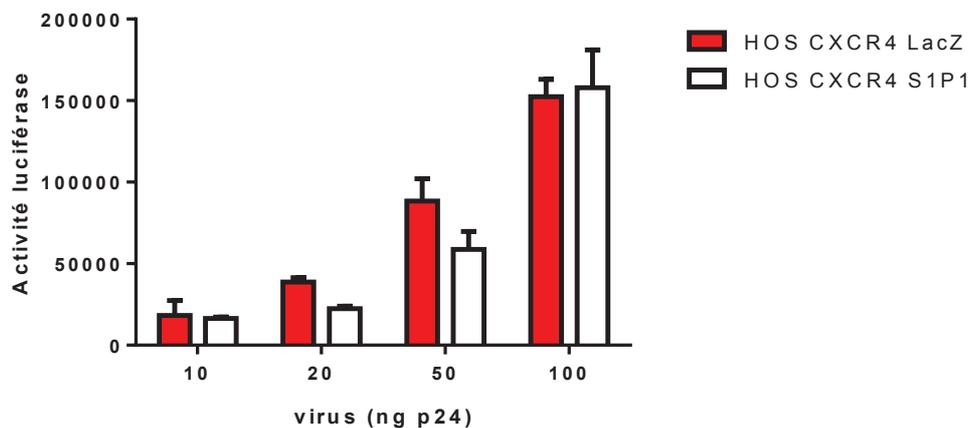


Figure 57 : Infection des lignées HOS S1P1 et HOS LacZ par un virus X4-Luc.

Les cellules HOS CXCR4 S1P1 et HOS CXCR4 LacZ ont été infectées en triplicatas avec différentes concentrations de X4-Luc. L'infection a été mesurée par analyse de l'activité luciférase dans les lysats cellulaires 72h après infection.

L'absence d'effet de S1P1 sur l'infection des lignées HOS S1P1 et HOS LacZ par les virus VSV-G-Luc et X4-Luc indique que la différence d'infection observée avec le virus R5-Luc serait due à une différence d'entrée du virus dans les cellules. On ne peut cependant pas exclure un effet de la signalisation par les virus VSV-G-Luc ou X4-Luc qui compenserait l'inhibition d'entrée par S1P1 à un stade postérieur à l'entrée viral.

III) Effet activateur de S1P1 sur l'infection :

a. Infection par un virus répliatif R5.

Pour évaluer l'effet de l'expression de S1P1 sur l'infection par un virus répliatif, des cellules HOS CCR5 S1P1 et HOS CCR5 LacZ ont été infectées par un virus répliatif HIV-R5 [Figure 58]. La protéine virale p24 présente dans le surnageant de culture a été quantifiée dans le temps pour suivre l'évolution de l'infection.

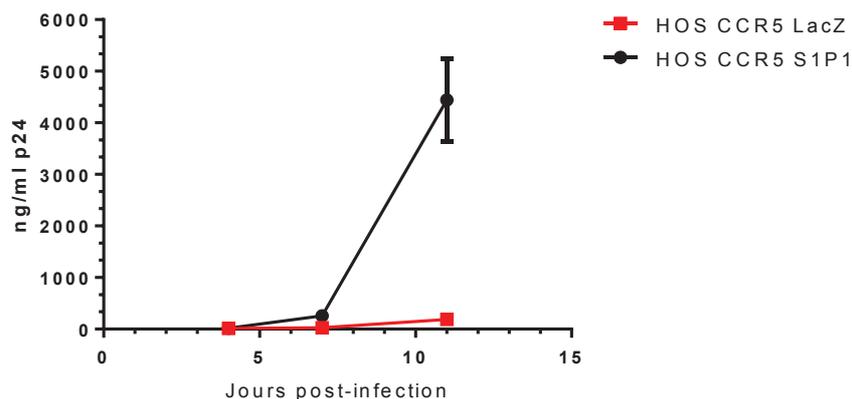


Figure 58 : Infection des lignées HOS CCR5 LacZ et HOS CCR5 S1P1 par un virus HIV-R5 répliatif.

Les cellules HOS CCR5 LacZ et HOS CCR5 S1P1 ont été infectées en triplicatas avec 10 ng/ml de virus répliatif HIV-R5 Ad8 pendant 24h, lavées avec du PBS et cultivées pendant 11 jours avec ajustement du nombre de cellules deux fois par semaine. La production virale a été quantifiée par mesure de la concentration en gag p24 dans le surnageant de culture.

Contrairement à ce qui a été obtenu avec un virus non répliatif R5, les cellules exprimant S1P1 ont donné une infection beaucoup plus importante que les cellules ne l'exprimant pas, avec une différence d'infection d'un facteur 23 +/- 6 ($p=0.0008$) 11 jours après l'infection. Il semble donc que S1P1 possède des effets opposés sur le cycle viral : un effet inhibiteur sur l'entrée de virions libres dans les cellules et un effet activateur sur une ou plusieurs étapes plus tardives du cycle viral.

b. Infection par un virus X4 répliatif.

Les cellules ont ensuite été infectées par un virus répliatif HIV-X4, comme décrit précédemment. La protéine virale p24 présente dans le surnageant a été quantifiée dans le temps pour suivre l'infection [Figure 59].

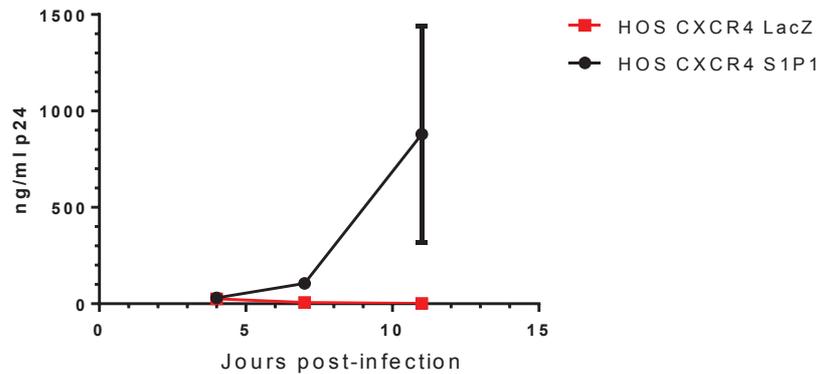


Figure 59 : Infection des lignées HOS S1P1 et HOS LacZ par un virus X4 répliatif.

Les cellules HOS CXCR4 S1P1 et HOS CXCR4 LacZ ont été infectées en triplicatas avec 10 ng/ml de virus HIV-X4 NL4.3. Les cellules ont été lavées 24h après infection et cultivées pendant 11 jours avec ajustement du nombre de cellules deux fois par semaine. L'infection a été mesurée par quantification de la concentration en p24 dans le surnageant cellulaire.

Comme ce qui a été obtenu avec un virus répliatif HIV-R5, l'infection de la lignée HOS exprimant S1P1 par un virus HIV-X4 a été plus importante que celle de la lignée ne l'exprimant pas ($p=0.0540$, 11 jours après infection).

Ces résultats suggèrent que S1P1 aurait un effet activateur de l'infection par un virus répliatif, effet opposé à celui observé dans le cas d'une infection par un virus non répliatif.

c. Effet de S1P1 sur les étapes postérieures à l'entrée du virus.

Pour évaluer l'effet de S1P1 sur les étapes situées après l'entrée du virus, des cellules HOS CCR5 ont été transduites par les vecteurs pHIV-S1P1 ou pHIV-LacZ. Les cellules ont été infectées 24h après la transduction par un virus non répliatif R5

pendant 1h. Ainsi, au moment de l'infection, l'expression de S1P1 à la surface membranaire n'a pas encore eu lieu, ce qui permet d'avoir les mêmes conditions d'entrée du virus pour les deux lignées et d'évaluer l'effet de l'expression de S1P1 uniquement sur les étapes post-entrée. L'infection a alors été évaluée comme précédemment, 72h après l'infection, par mesure de la luciférase [Figure 60].

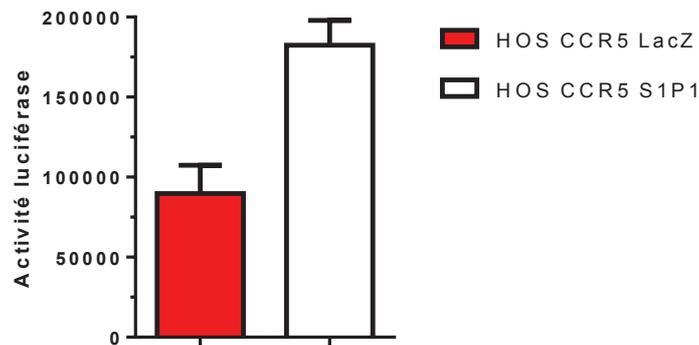


Figure 60 : Transduction d'une lignée HOS par pHIV-S1P1 ou pHIV-LacZ puis infection 24h après transduction par un virus R5 non répliatif.

Les cellules HOS CCR5 ont été transduites avec les mêmes quantités des vecteurs pHIV-S1P1 et pHIV-LacZ. 24h après transduction, les cellules HOS CCR5 S1P1 et HOS CCR5 LacZ ont été infectées pendant 1h en triplicatas avec 10 ng en équivalent p24 de virus non répliatif R5-Luc. L'activité luciférase a été mesurée 72h après infection.

Dans ces conditions, nous avons observé une augmentation de l'infection par la présence de S1P1 (augmentation d'un facteur 2.0 +/- 0.3, p=0.0002), contrairement à ce qui a été obtenu lors de l'infection de cellules exprimant S1P1 à leur surface au moment de l'infection [Figure 51]. Ceci confirme un effet activateur de S1P1 sur les étapes postérieures à l'entrée du virus.

Pour estimer l'effet de S1P1 sur la transcription du VIH, des cellules HeLa exprimant de manière stable le promoteur LTR fusionné au gène *luciférase* ont été transduites par les mêmes quantités des vecteurs pHIV-S1P1 ou pHIV-LacZ. 48h après transduction, l'expression membranaire de S1P1 a été mesurée par cytométrie [Figure 61]. Par mesure de la luciférase, nous avons ensuite évalué l'effet de l'expression de S1P1 sur l'activation de la LTR.

Nous avons alors observé une augmentation d'un facteur 10.6 +/- 1.0 de l'expression génique par la présence de S1P1 ($p < 0.0001$) [Figure 62].

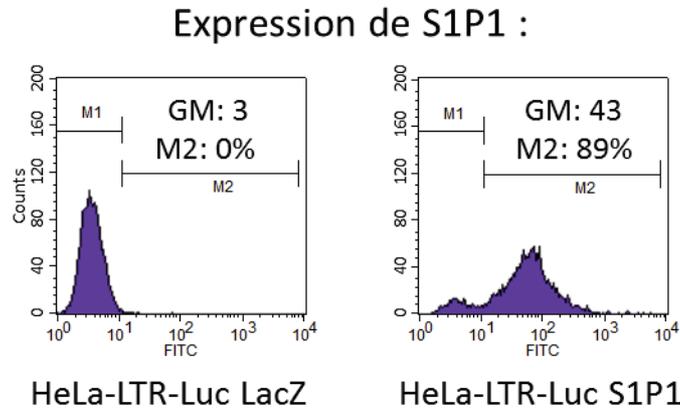


Figure 61 : Expression de S1P1 à la surface des HeLa-LTR-Luc transduites.

Les cellules HeLa portant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur HIV-LTR ont été transduites avec des quantités équivalentes en vecteurs pHIV-LacZ ou pHIV-S1P1. L'expression²⁰ de S1P1 à la surface des deux lignées ainsi obtenues a ensuite été évaluée par cytométrie de flux.

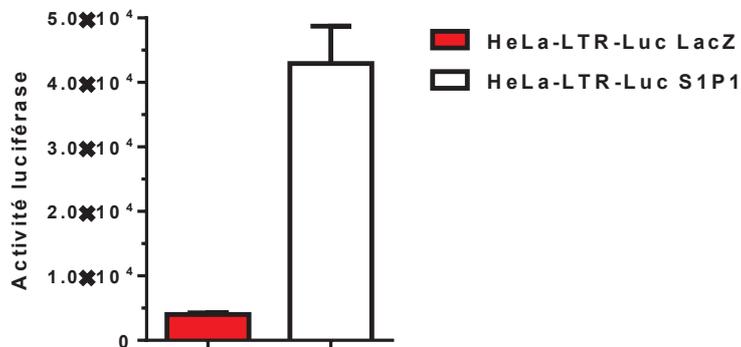


Figure 62 : Effet de la transduction de HeLa-LTR-Luc de S1P1 sur la transcription.

Les cellules HeLa-LTR-Luc ont été transduites avec des quantités équivalentes en protéines p24 des vecteurs pHIV-S1P1 et pHIV-LacZ. 96h après transduction, l'activation de la LTR a été calculée par mesure de l'activité luciférase dans les lysats cellulaires.

Ces deux expériences, infection de cellules HOS S1P1 n'exprimant pas S1P1 à la surface et transduction de cellules HeLa-LTR-Luc par un vecteur pHIV-S1P1,

²⁰ GM : intensité moyenne de fluorescence.

confirment un effet activateur de S1P1 sur les étapes post-entrée de l'infection, et en particulier une activation de la LTR intégrée dans le génome de la cellule.

d. Infection de virus à cellules ou de cellules à cellules.

Il apparaît donc que S1P1 inhibe l'entrée du virus mais active au moins une étape postérieure du cycle viral. Pour expliquer les effets opposés de S1P1 sur l'efficacité du VIH selon s'il s'agit d'un virus répliatif ou non, nous avons alors voulu comparer l'effet de S1P1 sur l'infection par un virus apporté dans le surnageant de culture par rapport à l'infection par contact cellulaire des lignées HOS. En effet, le mode d'entrée du virus par contact avec une cellule infectée est le mode prédominant dans une culture cellulaire (Chen, Hubner et al. 2007).

Pour cela, des cellules MOLT ont été infectées avec un virus répliatif HIV-R5 et cultivées pendant 6 jours. L'infection de cellules MOLT a été contrôlée par mesure de la quantité de protéine p24 relarguée dans le surnageant de culture. Les cellules HOS S1P1 et HOS LacZ ont ensuite été infectées comme précédemment avec un virus répliatif HIV-R5 (infection par virions) ou par coculture avec les cellules MOLT infectées (infection de cellules à cellules) pendant 5h puis lavées trois fois et remises en culture. Le surnageant a été quantifié en ARN viral ou en protéine p24 à 24h, 48h et 72h après infection.

La production d'ARN viral suite à l'infection par des virions est fortement diminuée dans les cellules HOS S1P1 comparée aux cellules HOS LacZ (d'un facteur 15 à 48h et d'un facteur 8 à 72h après infection) [Figure 63]. Ceci montre que la présence de S1P1 inhibe un premier cycle de réplication secondaire à l'infection par des virions libres.

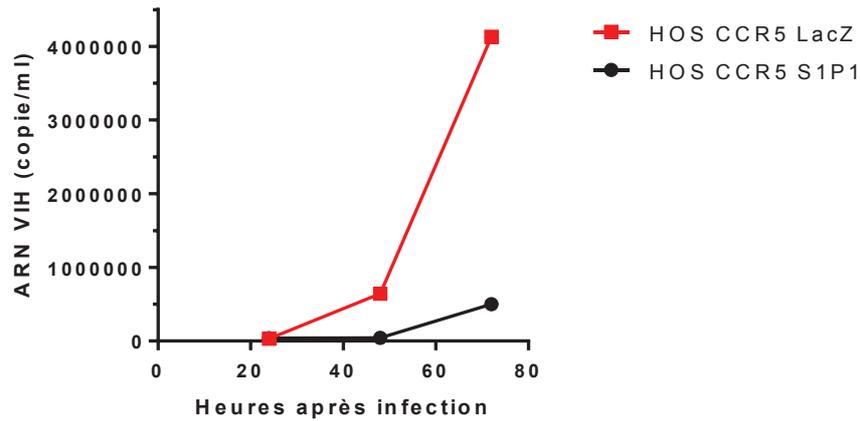


Figure 63 : Quantification de l'ARN viral suite à l'infection des cellules HOS S1P1 et HOS LacZ par un virus répliquatif HIV-R5.

Les cellules HOS CCR5 S1P1 et HOS CCR5 LacZ ont été infectées pendant 5h avec 10 ng/ml en équivalent p24 d'un virus répliquatif HIV-R5 Ad8, lavées puis gardées en culture. L'ARN viral a été quantifié par RTqPCR dans le surnageant à 24h, 48h et 72h après infection.

Contrairement à ce qui a été obtenu suite à l'infection par virions, l'infection par coculture avec des cellules infectées n'a pas été retardée dans les cellules HOS S1P1 par rapport aux cellules HOS LacZ [Figure 64]. A 72h, nous avons observé une faible augmentation de l'infection dans les cellules HOS S1P1 par rapport aux cellules HOS LacZ, d'un facteur 1.5 +/- 0.3 (p=0.0522).

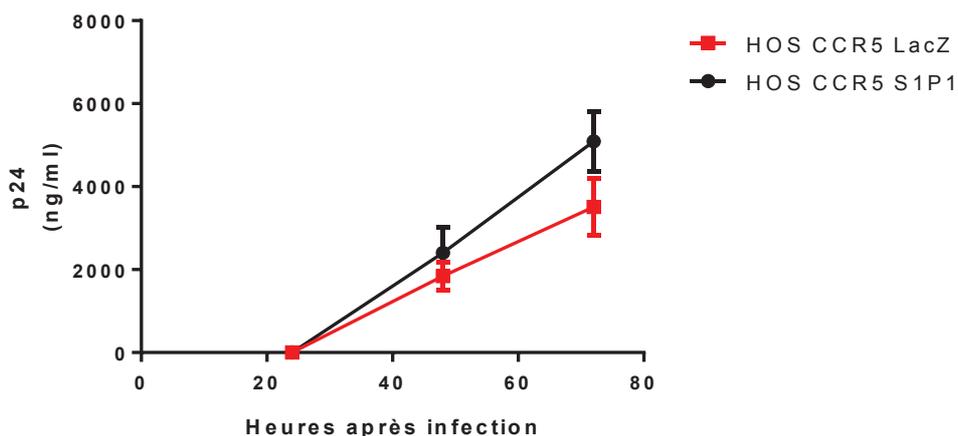


Figure 64 : Infection de cellules HOS S1P1 et HOS LacZ par des cellules MOLT chroniquement infectées.

Les cellules HOS CCR5 S1P1 et HOS CCR5 LacZ ont été infectées, en triplicatas, pendant 24h avec des cellules MOLT chroniquement infectées par une souche virale HIV-R5 Ad8. L'infection a été mesurée par quantification de la concentration en p24 dans le surnageant cellulaire à 48h ($p=0.2369$) et 72h ($p=0.0522$) après l'infection.

Ainsi la présence de S1P1 n'inhibe pas un premier cycle de réplication secondaire à l'infection de cellules à cellules. Ceci confirme l'effet inhibiteur de S1P1 sur l'entrée de virions dans les cellules. Que le premier cycle de réplication soit issu d'une infection de virions à cellules ou de cellules à cellules, les cycles suivants se font préférentiellement de cellules à cellules. Ceci explique que les infections avec des virus réplicatifs aient été augmentées en présence de S1P1.

IV) Absence d'effet des ligands de S1P1 sur l'infection de cellules HOS et de PBMC :

a. Effet de FTY720p sur l'infection de cellules HOS.

Pour évaluer l'effet de ligands de S1P1 sur l'infection de cellules HOS par un virus non répliatif R5-Luc, nous avons testé plusieurs ligands de S1P1²¹ : S1P, FTY720p,

²¹ S1P : agoniste de S1P1,2,3,4,5.

FTY720p : antagoniste fonctionnel de S1P1, agoniste de S1P3,4,5.

SEW2871 : agoniste spécifique de S1P1.

KRP203p : agoniste de S1P1,4,5.

VPC23019 : antagoniste de S1P1,3, agoniste de S1P4, agoniste partiel de S1P5.

W146 : antagoniste spécifique de S1P1.

SEW2871, KRP-203p, VPC23019 et W146. Aucun effet de ces ligands n'a été obtenu sur l'infection de cellules HOS CCR5 S1P1.

b. Dans des PBMC.

Le même résultat négatif a été observé lors de l'infection de PBMC infectées en présence de différents ligands de S1P1 [Figure 65].

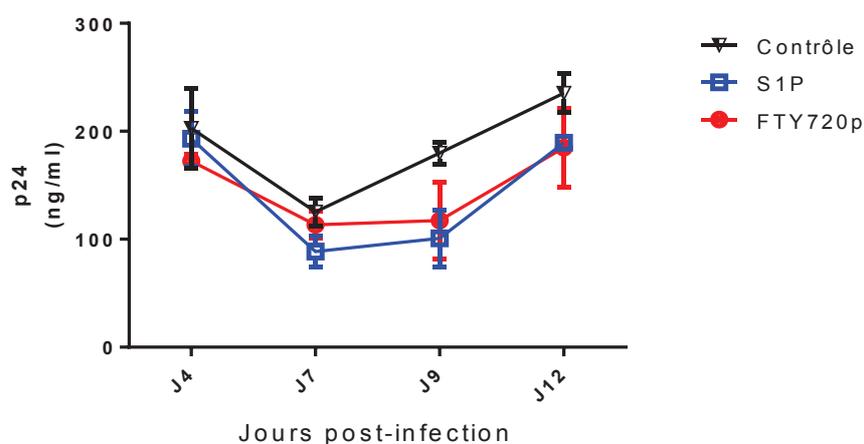


Figure 65 : Effet des ligands de S1P1 sur l'infection de PBMC par un virus répliquatif HIV-R5.

Des PBMC ont été isolées par centrifugation de densité puis activées 72h par PHA et IL2, puis les cellules ont été lavées et cultivées dans du RPMI complétement d'IL2. Les cellules ont été incubées en présence des ligands de S1P1 à 500 nM ou un contrôle pendant 1h puis infectés avec 47 ng en équivalent p24 d'un virus HIV-R5. 24h après infection, les cellules ont été lavées puis remises en culture en présence des ligands ou du contrôle avec ajustement du nombre de cellules deux fois par semaine. L'infection a été évaluée par mesure de la protéine p24 dans le surnageant cellulaire.

Ainsi, aucun effet des ligands de S1P1 n'a pu être observé lors de l'infection de cellules HOS ou de PBMC par des virus répliquatifs ou non répliquatifs. Ce résultat est inchangé lorsque l'on augmente la période de pré-incubation des ligands ou lorsque l'on utilise du milieu de culture synthétique X-VIVO qui ne contient aucun ligand de S1P1, comme proposé par l'équipe de Lederman (Mudd, Murphy et al. 2013).

c. Transfection à l'aide de siRNA ciblant S1P1.

Les cellules HOS CCR5 S1P1 ont été transfectées avec 5 nM d'un siRNA ciblant S1P1²² ou d'un siRNA témoin négatif puis infectées 72h après transfection par 150 ng/ml d'un virus non répliquatif R5-Luc ou par 10 ng/ml d'un virus répliquatif HIV-R5. L'efficacité de transfection a été mesurée par évaluation de l'expression membranaire de S1P1 à l'aide d'un cytomètre [Figure 66]. L'infection par le virus non répliquatif a été évaluée par mesure de l'activité luciférase mesurée 72h après l'infection [Figure 67]. L'infection par le virus répliquatif a été évaluée par quantification de la protéine virale p24 présente dans le surnageant de culture [Figure 68].

Alors que l'expression de S1P1 a fortement diminué (d'environ 80%), aucun effet n'a été observé sur l'infection, que ce soit avec un virus non répliquatif ou avec un virus répliquatif. Il est possible que la suppression de S1P1 n'ait pas été suffisante pour qu'un effet sur l'infection puisse être observé.

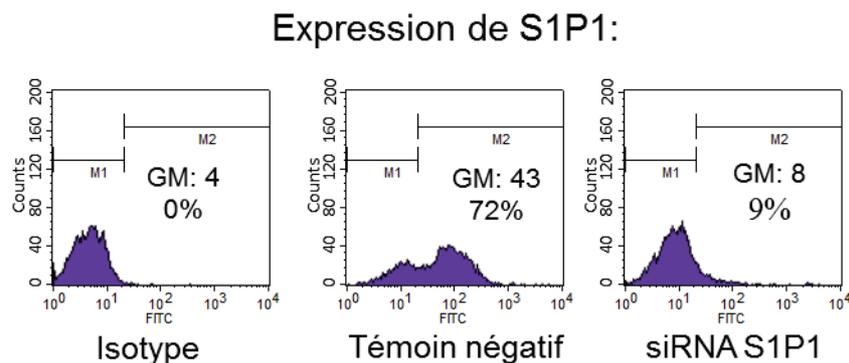


Figure 66 : Expression membranaire de S1P1 après transfection de la lignée HOS CCR5 S1P1 par siRNA.

Les cellules HOS CCR5 S1P1 ont été transfectées avec 5 nM de siRNA ciblant S1P1 ou d'un siRNA témoin négatif. 48h après transfection, l'expression membranaire²³ de S1P1 a été évaluée par cytométrie de flux.

²² siRNA ciblant S1P1 : mélange : 5'-gcauuaaacugaccucggu-3' + 5'-gcucaagaccguauuuauuc-3' + 5'-cagcuaaccgucucucuguc-3' + 5'-gauaucgucccggcauu-3'.

²³ GM : intensité moyenne de fluorescence.

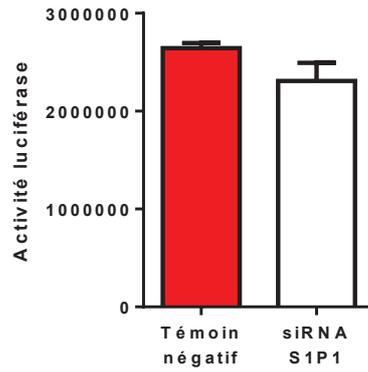


Figure 67 : Infection des cellules transfectées par siRNA ciblant S1P1 par un virus non répliatif R5.

Les cellules HOS CCR5 S1P1 ont été transfectées avec 5 nM de siRNA ciblant S1P1 ou d'un siRNA témoin négatif. 72h après transfection, les cellules ont été infectées avec 150 ng/ml d'un virus non répliatif R5-Luc. 72h après infection, l'activité luciférase a été mesurée dans les lysats cellulaires pour évaluer l'infection des cellules transfectées.



Figure 68 : Infection des cellules transfectées par siRNA ciblant S1P1 par un virus répliatif HIV-R5.

Les cellules HOS CCR5 S1P1 ont été transfectées avec 5 nM de siRNA ciblant S1P1 ou d'un siRNA témoin négatif. 72h après transfection, les cellules ont été infectées en triplicatas avec 10 ng/ml de virus répliatif HIV-R5 pendant 24h, lavées avec du PBS et cultivées pendant 11 jours avec ajustement du nombre de cellules et transfection avec les siRNA deux fois par semaine. La production virale a été quantifiée par mesure de la concentration en gag p24 dans le surnageant de culture.

V) Inhibition de l'infection par FTY720p :

a. Dans les cellules dendritiques.

Ayant détecté une expression membranaire de S1P1 à la surface des cellules dendritiques [Figure 49], nous avons testé l'effet des ligands de S1P1 sur l'infection de ces cellules. Pour cela, des cellules dendritiques ont été différenciées *in vitro* à partir de monocytes isolés du sang puis préincubées avec le facteur VLP-vpx, afin d'induire la dégradation du facteur de restriction SamHD1, nécessaire pour permettre l'infection de ces cellules, comme décrit par Laguette (Laguette, Sobhian et al. 2011).

Une expérience préliminaire a été réalisée afin d'évaluer l'efficacité des particules VLP-vpx. Celles-ci ont été mises en contact avec des cellules THP-1 différenciées en macrophages pendant 2h en comparaison des particules VLP-vides. Les cellules ont ensuite été infectées avec du virus non répliquatif VSV-G-Luc à 125 ng/ml et l'activité luciférase a été mesurée 24h après infection [Figure 69].

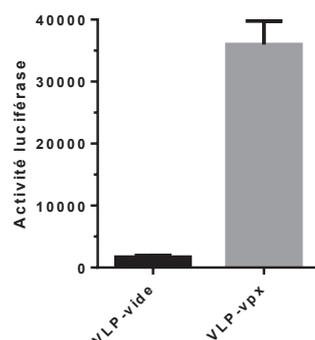


Figure 69 : Infection des THP-1 différenciées en présence ou non de VLP-vpx.

Les cellules THP1 ont été différenciées en macrophages par incubation pendant 24h avec 30 ng/ml de Phorbol 12-myristate 13-acétate. Les cellules adhérentes ont ensuite été pré-incubées pendant 2h avec les particules VLP-vpx ou les particules vides (VLP-vides) puis infectées avec 125 ng/ml de virus non répliquatif VSV-G-Luc. 24h après infection, l'activité luciférase a été mesurée.

Nous avons observé une forte augmentation (d'un facteur 21.4 +/- 4.0 ($p=0.0061$)) de l'infection des cellules pré-incubées avec les particules VLP-vpx.

Pour évaluer l'effet des ligands de S1P1 sur l'infection par un virus répliquatif, des cellules dendritiques ont été incubées pendant 3h avec les particules VLP-vpx puis

exposées à FTY720p pendant 1h, et infectées avec un virus répliatif R5. La quantité de virus produit dans le milieu de culture a été évaluée par mesure de la protéine virale p24 à 4, 7, 9 et 11 jours après l'infection [Figure 70]. Les ligands ont été rajoutés tous les jours d'évaluation de la p24 par remplacement de 100 µl du surnageant.

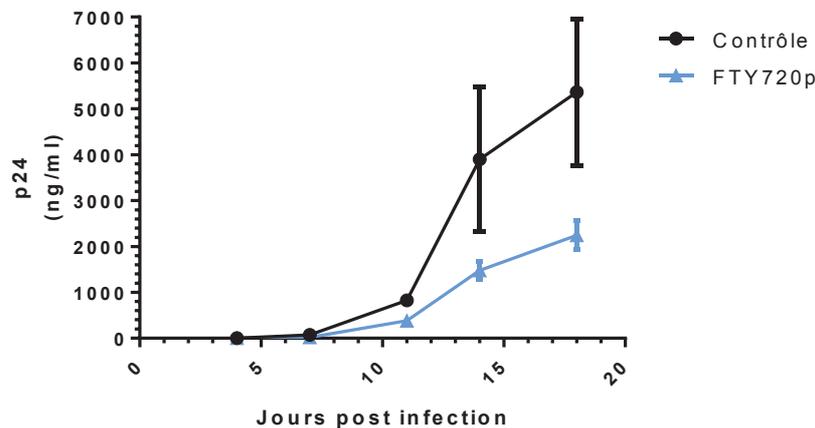


Figure 70 : Infection de cellules dendritiques infectées avec un virus répliatif HIV-R5 et préincubées avec du FTY720p.

Les cellules dendritiques ont été pré-incubées pendant 3h avec les particules VLP-vpx puis exposées à 100 nM de FTY720p ou son contrôle pendant 1h avant l'infection. Les cellules ont ensuite été infectées pendant 24h en triplicatas avec 5 ng/ml HIV-R5. Les cellules ont ensuite été lavées et remises en culture. L'infection a été évaluée par mesure de la p24 dans le surnageant cellulaire.

FTY720p a entraîné une nette inhibition de la production virale par les cellules dendritiques, qui atteint 59% +/- 11% au 18^{ème} jour après l'infection (p=0.0296).

b. Dans les souris SCID.

Cette expérience a permis d'évaluer l'activité antivirale de FTY720 *in vivo* dans le modèle de souris SCID humanisées (hu-PBL-SCID) et infectées par le VIH-1. Après reconstitution immunitaire pendant 25 jours suite à l'injection intra-péritonéale de PBMC humaines, deux groupes d'animaux (génotype *cb17/lcr-Prkdc^{scid}/Crl*) ont été comparés vis-à-vis de l'infection par le VIH ; un groupe contrôle de 8 animaux traités avec un témoin négatif et un groupe de 6 animaux traités avec le FTY720. Un

gavage journalier avec du FTY720 à 0,3mg/kg/jour ou avec le solvant a été réalisé chez les souris humanisées, puis une journée après le début du gavage, les souris ont été infectées par un virus HIV-R5. La charge virale a été évaluée au douzième jour suivant l'infection. La valeur moyenne des virémies pour chacun des deux groupes est représentée dans la Figure 71.

L'expérience a été réalisée par N. Campos dans le cadre d'un partenariat avec l'équipe de J. Tazi (Société Splicos, Montpellier).

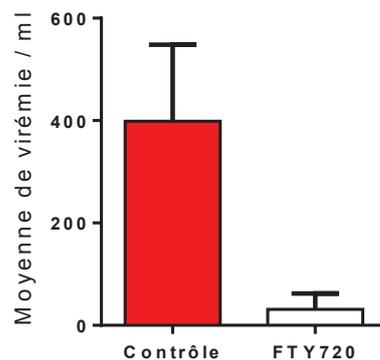


Figure 71 : Effet de FTY720 sur l'infection *in vivo* de souris SCID humanisées par un virus répliquatif HIV-R5.

Les souris ont été reconstituées immunologiquement par injection intra-péritonéale de 30×10^6 PBMC obtenues par centrifugation de densité sur les leucocytes d'un anneau de cytophèrese d'un donneur sain volontaire. La reconstitution a été évaluée au 13^{ème} jour par dosage des Immunoglobulines (Ig) humaines présentes dans le sérum des souris par test ELISA à l'aide de l'anticorps anti-human whole Ig-PO. Les souris dont la concentration en Ig totale est supérieure à 100 µg/ml ont été conservées pour l'expérience, et ont été infectées 14 jours après la reconstitution avec une souche HIV-R5 (JR-CSF) à 1000 TCID50 dans 100 µl final. Chez 6 souris, un gavage journalier avec 100 µl de FTY720 dissout à 60 µg/ml dans de l'eau distillée (0.3 mg/kg/jour) a été débuté un jour avant l'infection et continué pendant 12 jours. Les souris non traitées, au nombre de 8, ont été gavées avec le même volume d'eau distillée. 50 µl de sang ont été prélevé rétro-orbitalement et dilués avec 1 ml de plasma humain pour doser la charge virale au 6^{ème}, 9^{ème} et 12^{ème} jour après l'infection après anesthésie à l'isoflurane. Les virémies ont été évaluées par quantification de l'ARN viral dans le plasma des souris en qPCR. Les valeurs inférieures à 20 copies d'ARN/ml (soit 400 copies/ml de sérum de souris) étant inférieures au seuil de détection du kit ont été considérées égales à zéro ($p=0.0243$).

Bien que l'infection *in vivo* ait été modérée du fait d'une faible prise de greffe, nous avons observé une diminution significative de l'infection des animaux traités, de

92% +/- 17% (p=0.0243). Cette expérience va donc dans le sens d'un effet antiviral de FTY720 sur le VIH *in vivo*, dans le modèle de souris humanisées.

C. Conclusions et perspectives

Ce projet a permis d'établir que la présence de S1P1 à la surface cellulaire a deux effets opposés. D'une part, celle-ci gêne l'entrée du virus dans la cellule lors d'une infection de virion à cellule, mais pas lors d'une infection de cellule à cellule, qui est de loin le mode d'infection le plus efficace. D'autre part, elle active les étapes post-entrée du virus dans la cellule, notamment son expression génique [Figure 72]. L'effet global de la présence de S1P1 sur plusieurs cycles d'infection est un effet activateur de l'infection.

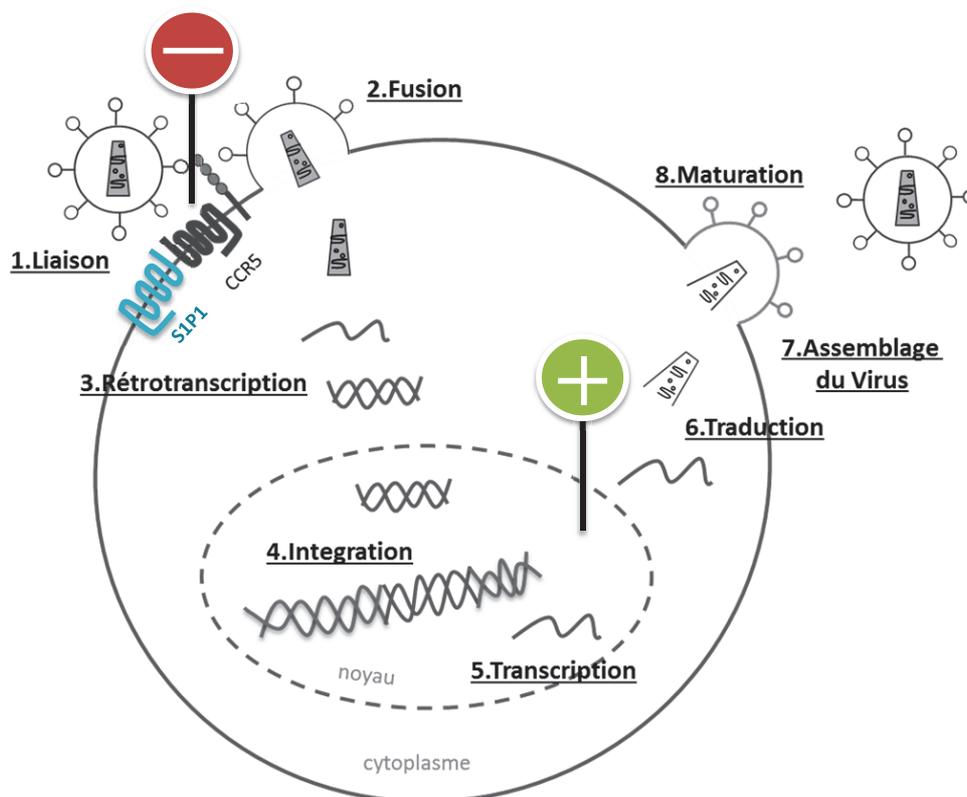


Figure 72 : Effet de l'expression de S1P1 sur le cycle viral du VIH.

Il faut également noter que l'infection par un virus non répliquatif X4-Luc ne donne pas de différence entre des cellules exprimant S1P1 et des cellules ne l'exprimant pas. Il est possible que S1P1 gêne également l'entrée des virus X4, par interaction physique avec CXCR4 ou par encombrement stérique, ce qui pourrait alors annuler les effets activateurs post-entrée du cycle viral. L'absence d'effet de la présence de

S1P1 suite à l'infection par un virus VSV-G-Luc pourrait s'expliquer par la forte activation de la signalisation par ce virus masquant l'effet post-entrée qu'a S1P1.

Pour savoir si l'interaction CCR5 – S1P1 est nécessaire à S1P1 pour induire ses effets sur l'infection, il serait intéressant d'utiliser un récepteur S1P1 muté qui signale mais qui n'interagit plus avec CCR5 et estimer l'impact de son expression sur les différentes étapes du cycle viral. Il serait également utile d'évaluer l'effet de l'expression de S1P1 sur la liaison gp120-CCR5, par des techniques de FRET ou de cytométrie. De même, il a été montré que la signalisation via G_i participe à l'infection des souches R5 (Lin, Mettling et al. 2006). Or, S1P1 signalisant via cette protéine G_i , il est envisageable que l'effet activateur de l'expression génique par S1P1 soit uniquement dû à une augmentation de cette signalisation qui ne nécessite aucune interaction avec CCR5.

En tant qu'antagoniste fonctionnel, FTY720p active le récepteur S1P1 puis entraîne rapidement sa dégradation. Nous avons montré un effet antiviral de FTY720p sur les cellules dendritiques. Il est possible que cette activité soit due à la dégradation du récepteur S1P1 empêchant ainsi l'activation de l'expression génique, ou à un effet de FTY720p sur un autre S1PR. Cette expérience, ainsi que l'effet de FTY720 sur les souris humanisées, montrent qu'il est possible d'agir via S1P1 ou un autre S1PR pour diminuer l'infection par le VIH. Dans une perspective thérapeutique, il serait favorable de trouver un ligand de S1P1 qui inhibe l'entrée virale quel qu'en soit le mode (de virion à cellule ou de cellule à cellule) et qui inhibe également la signalisation du récepteur.

On peut également noter que l'absence d'effet des ligands de S1P1 sur l'infection de cellules HOS S1P1 par des virus répliquatif ou non répliquatif peut s'expliquer par la présence dans le milieu de culture de ligands de S1P1. Il pourrait être nécessaire d'utiliser un milieu contenant du SVF traité avec du charbon actif et du dextrane, polymère capable de capter les lipoprotéines, pour enlever tout le S1P présent dans le milieu de culture. On peut également envisager l'utilisation d'un anticorps anti-S1P déjà existant (Sensken, Nagarajan et al. 2011) pour bloquer son effet sur S1P1.

Aussi, il serait intéressant de trier la population de lymphocytes des ganglions lymphatiques co-exprimant les récepteurs CD4, CCR5 et S1P1 et de tester l'effet des

ligands de S1P1 sur l'infection de ces cellules primaires exprimant naturellement S1P1 avec les récepteurs du VIH.

D'autre part, S1P1 est nécessaire à la sortie des lymphocytes des organes lymphoïdes secondaires, via son ligand S1P. Or, il a été montré que chez les patients infectés par le VIH, la migration des lymphocytes T vers S1P est défectueuse (Lim, Kane et al. 2012). On observe alors une séquestration des lymphocytes T dans les tissus lymphoïdes secondaires. Il semble notamment que la protéine gp120 rende les cellules T CD4 insensibles à S1P (Green, Center et al. 2009). La lymphadénopathie consécutive à l'infection par le VIH peut aussi être expliquée par la diminution d'expression de S1P1 dans les tissus lymphoïdes secondaires de patients VIH et le blocage de la signalisation via S1P1 (Mudd, Murphy et al. 2013). S1P1 et CCR5 interagissant physiquement, il est possible que l'interférence de la gp120 sur la fonction de S1P1 se fasse via CCR5.

Il serait intéressant d'évaluer les effets de S1P1 sur les fonctions non virologiques de CCR5, comme le chimiotactisme et la réponse calcique, et réciproquement, d'analyser l'effet de la stimulation de CCR5 sur les fonctions de S1P1 comme la sortie des lymphocytes T matures des ganglions.

L'effet antiviral de FTY720 que nous avons observé dans les souris SCID va dans le même sens que la diminution de la virémie obtenue par Murooka et coll. lors du traitement de souris humanisées par ce ligand de S1P1 avant ou pendant l'infection par le VIH (Murooka, Deruaz et al. 2012). Une expérience utilisant des macaques est cependant en contradiction avec ces résultats. En effet, aucun effet bénéfique de FTY720 n'a été observé lors du traitement de macaques infectés par SHIV (Kersh, Luo et al. 2009). Cependant, au cours de cette expérience, FTY720 n'a pas été utilisé en prétraitement mais sur des macaques infectés chroniquement. De plus, 3 macaques sur 6 avaient une virémie indétectable, rendant impossible l'évaluation du traitement par FTY720 sur ce critère. D'autres expériences *in vivo* sont donc nécessaires pour évaluer le réel impact des ligands de S1P1 sur l'infection par le VIH.

Enfin, pour évaluer l'impact réel de FTY720 sur l'infection par le VIH, on pourrait estimer l'effet de ce traitement sur l'évolution de l'infection par le VIH chez des patients déjà traités avec cette molécule pour une sclérose en plaque.

Conclusions générales

L'éradication du VIH étant loin d'être acquise, il apparaît nécessaire de continuer les travaux dans ce domaine et d'envisager de nouvelles thérapies. Alors que la plupart des traitements antirétroviraux ciblent les étapes postérieures à l'entrée, il semble essentiel d'inhiber l'entrée du virus, première étape de l'infection du VIH.

La première partie de mon projet a permis de mettre en évidence la possibilité de cibler l'entrée des virus X4 via l'isoforme CXCR4-B de CXCR4 responsable de la forte permissivité des cellules à ces souches virales. D'autre part, nous avons montré que le ratio des ARNm CXCR4-B / CXCR4-A semble être un facteur favorisant l'apparition de souches X4. L'inhibition de CXCR4-B pourrait donc être également profitable chez les patients R5 et les patients X4.

La deuxième partie de mon projet a permis de confirmer qu'en plus de l'interaction physique de CCR5 avec S1P1, il existe bien une interaction fonctionnelle entre ces deux récepteurs, au moins vis-à-vis de l'infection par le VIH. S1P1 favorise l'infection par des souches R5 et sa stimulation par FTY720 a un effet négatif sur l'infection de certaines cellules immunitaires. Ceci permet d'envisager une nouvelle perspective thérapeutique de l'inhibition de l'infection de souches R5. De plus, cette étude éclaire d'un jour nouveau les causes de la lymphadénopathie observée chez les patients atteints par le VIH. A ce titre, il sera intéressant de prolonger l'étude de l'interaction fonctionnelle entre ces deux récepteurs vis-à-vis de leurs fonctions immunologiques comme le chimiotactisme vers leurs ligands respectifs.

Bibliographie

- W. W. Agace, A. Amara, A. I. Roberts, J. L. Pablos, S. Thelen, M. Ugucioni, X. Y. Li, J. Marsal, F. Arenzana-Seisdedos, T. Delaunay, E. C. Ebert, B. Moser and C. M. Parker (2000). "Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation." *Curr Biol* **10**(6): 325-328.
- L. Agrawal, X. Lu, J. Qingwen, Z. VanHorn-Ali, I. V. Nicolescu, D. H. McDermott, P. M. Murphy and G. Alkhatib (2004). "Role for CCR5Delta32 protein in resistance to R5, R5X4, and X4 human immunodeficiency virus type 1 in primary CD4+ cells." *J Virol* **78**(5): 2277-2287.
- A. Aiuti, I. J. Webb, C. Bleul, T. Springer and J. C. Gutierrez-Ramos (1997). "The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood." *J Exp Med* **185**(1): 111-120.
- N. Akahoshi, Y. Ishizaki, H. Yasuda, Y. L. Murashima, T. Shinba, K. Goto, T. Himi, J. Chun and I. Ishii (2011). "Frequent spontaneous seizures followed by spatial working memory/anxiety deficits in mice lacking sphingosine 1-phosphate receptor 2." *Epilepsy Behav.*
- G. Alkhatib, C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy and E. A. Berger (1996). "CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." *Science* **272**(5270): 1955-1958.
- G. Alkhatib, M. Locati, P. E. Kennedy, P. M. Murphy and E. A. Berger (1997). "HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation." *Virology* **234**(2): 340-348.
- M. L. Allende, M. Bektas, B. G. Lee, E. Bonifacino, J. Kang, G. Tuymetova, W. Chen, J. D. Saba and R. L. Proia (2011). "Sphingosine-1-phosphate lyase deficiency produces a pro-inflammatory response while impairing neutrophil trafficking." *J Biol Chem* **286**(9): 7348-7358.
- M. L. Allende, J. L. Dreier, S. Mandala and R. L. Proia (2004). "Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration." *J Biol Chem* **279**(15): 15396-15401.
- M. L. Allende, T. Yamashita and R. L. Proia (2003). "G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation." *Blood* **102**(10): 3665-3667.
- V. Alonso and P. A. Friedman (2013). "Minireview: Ubiquitination-regulated G Protein-Coupled Receptor Signaling and Trafficking." *Mol Endocrinol* **27**(4): 558-572.
- N. Ancellin, C. Colmont, J. Su, Q. Li, N. Mittereder, S. S. Chae, S. Stefansson, G. Liau and T. Hla (2002). "Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation." *J Biol Chem* **277**(8): 6667-6675.

- S. Angers, A. Salahpour and M. Bouvier (2002). "Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 409-435.
- S. Angers, A. Salahpour, E. Joly, S. Hilairet, D. Chelsky, M. Dennis and M. Bouvier (2000). "Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET)." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3684-3689.
- A. S. Awad, H. Ye, L. Huang, L. Li, F. W. Foss, Jr., T. L. Macdonald, K. R. Lynch and M. D. Okusa (2006). "Selective sphingosine 1-phosphate 1 receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in mouse kidney." *Am J Physiol Renal Physiol* **290**(6): F1516-1524.
- F. Baatz, D. Struck, M. Lemaire, S. De Landtsheer, J. Y. Servais, V. Arendt, J. C. Schmit and D. Perez Bercoff (2011). "Rescue of HIV-1 long-time archived X4 strains to escape maraviroc." *Antiviral Res* **92**(3): 488-492.
- G. J. Babcock, M. Farzan and J. Sodroski (2003). "Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor." *J Biol Chem* **278**(5): 3378-3385.
- M. Baggiolini, B. Dewald and B. Moser (1997). "Human chemokines: an update." *Annu Rev Immunol* **15**: 675-705.
- A. Bai, H. Hu, M. Yeung and J. Chen (2007). "Kruppel-like factor 2 controls T cell trafficking by activating L-selectin (CD62L) and sphingosine-1-phosphate receptor 1 transcription." *J Immunol* **178**(12): 7632-7639.
- M. Bai (2004). "Dimerization of G-protein-coupled receptors: roles in signal transduction." *Cell Signal* **16**(2): 175-186.
- A. Bajetto, R. Bonavia, S. Barbero and G. Schettini (2002). "Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications." *J Neurochem* **82**(6): 1311-1329.
- F. Barre-Sinoussi, J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**(4599): 868-871.
- S. Basu and H. E. Broxmeyer (2009). "CCR5 ligands modulate CXCL12-induced chemotaxis, adhesion, and Akt phosphorylation of human cord blood CD34+ cells." *J Immunol* **183**(11): 7478-7488.
- N. Beerenwinkel, M. Daumer, M. Oette, K. Korn, D. Hoffmann, R. Kaiser, T. Lengauer, J. Selbig and H. Walter (2003). "Geno2pheno: Estimating phenotypic drug resistance from HIV-1 genotypes." *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3850-3855.
- M. Benkirane, D. Y. Jin, R. F. Chun, R. A. Koup and K. T. Jeang (1997). "Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by ccr5delta32." *J Biol Chem* **272**(49): 30603-30606.

- E. A. Berger, P. M. Murphy and J. M. Farber (1999). "Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease." *Annu Rev Immunol* **17**: 657-700.
- W. Berlier, T. Bourlet, P. Lawrence, H. Hamzeh, C. Lambert, C. Genin, B. Verrier, M. C. Dieu-Nosjean, B. Pozzetto and O. Delezay (2005). "Selective sequestration of X4 isolates by human genital epithelial cells: Implication for virus tropism selection process during sexual transmission of HIV." *J Med Virol* **77**(4): 465-474.
- C. C. Bleul, M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski and T. A. Springer (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." *Nature* **382**(6594): 829-833.
- C. C. Bleul, R. C. Fuhlbrigge, J. M. Casasnovas, A. Aiuti and T. A. Springer (1996). "A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)." *J Exp Med* **184**(3): 1101-1109.
- C. C. Bleul, L. Wu, J. A. Hoxie, T. A. Springer and C. R. Mackay (1997). "The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1925-1930.
- J. B. Blumer, M. J. Cismowski, M. Sato and S. M. Lanier (2005). "AGS proteins: receptor-independent activators of G-protein signaling." *Trends Pharmacol Sci* **26**(9): 470-476.
- J. Bockaert and J. P. Pin (1998). "[Use of a G-protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success]." *C R Acad Sci III* **321**(7): 529-551.
- J. Bockaert and J. P. Pin (1999). "Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success." *EMBO J* **18**(7): 1723-1729.
- R. A. Bond and A. P. Ijzerman (2006). "Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery." *Trends Pharmacol Sci* **27**(2): 92-96.
- D. C. Bou-Habib, G. Roderiguez, T. Oravec, P. W. Berman, P. Lusso and M. A. Norcross (1994). "Cryptic nature of envelope V3 region epitopes protects primary monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 from antibody neutralization." *J Virol* **68**(9): 6006-6013.
- S. Bour, R. Geleziunas and M. A. Wainberg (1995). "The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection." *Microbiol Rev* **59**(1): 63-93.
- M. Bouvier (2001). "Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors." *Nat Rev Neurosci* **2**(4): 274-286.
- K. Bowers, C. Pitcher and M. Marsh (1997). "CD4: a co-receptor in the immune response and HIV infection." *Int J Biochem Cell Biol* **29**(6): 871-875.

- B. Breart, W. D. Ramos-Perez, A. Mendoza, A. K. Salous, M. Gobert, Y. Huang, R. H. Adams, J. J. Lafaille, D. Escalante-Alcalde, A. J. Morris and S. R. Schwab (2011). "Lipid phosphate phosphatase 3 enables efficient thymic egress." *J Exp Med* **208**(6): 1267-1278.
- G. E. Breitwieser (2004). "G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling." *Circ Res* **94**(1): 17-27.
- J. W. Brewer (2012). "Phospholipids: "Greasing the wheels" of humoral immunity." *Biochim Biophys Acta*.
- N. Brieu, P. Portales, M. J. Carles and P. Corbeau (2011). "Interleukin-7 induces HIV type 1 R5-to-X4 switch." *Blood* **117**(6): 2073-2074.
- J. A. Briggs, T. Wilk, R. Welker, H. G. Krausslich and S. D. Fuller (2003). "Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores." *EMBO J* **22**(7): 1707-1715.
- V. Brinkmann (2007). "Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology." *Pharmacol Ther* **115**(1): 84-105.
- V. Brinkmann, A. Billich, T. Baumruker, P. Heining, R. Schmouder, G. Francis, S. Aradhye and P. Burtin (2010). "Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis." *Nat Rev Drug Discov* **9**(11): 883-897.
- V. Brinkmann, J. G. Cyster and T. Hla (2004). "FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function." *Am J Transplant* **4**(7): 1019-1025.
- V. Brinkmann, M. D. Davis, C. E. Heise, R. Albert, S. Cottens, R. Hof, C. Bruns, E. Prieschl, T. Baumruker, P. Hiestand, C. A. Foster, M. Zollinger and K. R. Lynch (2002). "The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors." *J Biol Chem* **277**(24): 21453-21457.
- F. Brun-Vezinet and C. Charpentier (2013). "Update on the Human Immunodeficiency Virus." *Med Mal Infect*.
- Y. By, J. M. Durand-Gorde, J. Condo, P. J. Lejeune, E. Fenouillet, R. Guieu and J. Ruf (2010). "Monoclonal antibody-assisted stimulation of adenosine A2A receptors induces simultaneous downregulation of CXCR4 and CCR5 on CD4+ T-cells." *Hum Immunol* **71**(11): 1073-1076.
- T. M. Cabrera-Vera, J. Vanhauwe, T. O. Thomas, M. Medkova, A. Preininger, M. R. Mazzoni and H. E. Hamm (2003). "Insights into G protein structure, function, and regulation." *Endocr Rev* **24**(6): 765-781.
- Y. Cao, L. Qin, L. Zhang, J. Safrit and D. D. Ho (1995). "Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection." *N Engl J Med* **332**(4): 201-208.

P. J. Casey, H. K. Fong, M. I. Simon and A. G. Gilman (1990). "Gz, a guanine nucleotide-binding protein with unique biochemical properties." *J Biol Chem* **265**(4): 2383-2390.

CDC (1981). "Pneumocystis pneumonia--Los Angeles." *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **30**(21): 250-252.

A. Chakera, R. M. Seeber, A. E. John, K. A. Eidne and D. R. Greaves (2008). "The duffy antigen/receptor for chemokines exists in an oligomeric form in living cells and functionally antagonizes CCR5 signaling through hetero-oligomerization." *Mol Pharmacol* **73**(5): 1362-1370.

A. C. Charles, N. Mostovskaya, K. Asas, C. J. Evans, M. L. Dankovich and T. G. Hales (2003). "Coexpression of delta-opioid receptors with micro receptors in GH3 cells changes the functional response to micro agonists from inhibitory to excitatory." *Mol Pharmacol* **63**(1): 89-95.

M. Chelli and M. Alizon (2001). "Determinants of the trans-dominant negative effect of truncated forms of the CCR5 chemokine receptor." *J Biol Chem* **276**(50): 46975-46982.

C. Chen, J. Li, G. Bot, I. Szabo, T. J. Rogers and L. Y. Liu-Chen (2004). "Heterodimerization and cross-desensitization between the mu-opioid receptor and the chemokine CCR5 receptor." *Eur J Pharmacol* **483**(2-3): 175-186.

P. Chen, W. Hubner, M. A. Spinelli and B. K. Chen (2007). "Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses." *J Virol* **81**(22): 12582-12595.

B. Chesebro, K. Wehrly, J. Nishio and S. Perryman (1992). "Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism." *J Virol* **66**(11): 6547-6554.

K. Chiba, Y. Yanagawa, Y. Masubuchi, H. Kataoka, T. Kawaguchi, M. Ohtsuki and Y. Hoshino (1998). "FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing." *J Immunol* **160**(10): 5037-5044.

C. Chidiac, C. Katlama and P. Yeni (2008). "[Maraviroc: clinical trials results]." *Med Mal Infect* **38 Suppl 1**: S17-23.

P. Chidiac, T. E. Hebert, M. Valiquette, M. Dennis and M. Bouvier (1994). "Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists." *Mol Pharmacol* **45**(3): 490-499.

H. Choe, M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. Mackay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard and J. Sodroski (1996). "The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates." *Cell* **85**(7): 1135-1148.

- J. W. Choi, C. W. Lee and J. Chun (2008). "Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update." *Biochim Biophys Acta* **1781**(9): 531-539.
- W. T. Choi and J. An (2011). "Biology and clinical relevance of chemokines and chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in human diseases." *Exp Biol Med (Maywood)* **236**(6): 637-647.
- J. Chun and V. Brinkmann (2011). "A mechanistically novel, first oral therapy for multiple sclerosis: the development of fingolimod (FTY720, Gilenya)." *Discov Med* **12**(64): 213-228.
- J. Chun, T. Hla, K. R. Lynch, S. Spiegel and W. H. Moolenaar (2010). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid Receptor Nomenclature." *Pharmacol Rev* **62**(4): 579-587.
- G. Cinamon, M. Matloubian, M. J. Lesneski, Y. Xu, C. Low, T. Lu, R. L. Proia and J. G. Cyster (2004). "Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone." *Nat Immunol* **5**(7): 713-720.
- G. Cinamon, M. A. Zachariah, O. M. Lam, F. W. Foss, Jr. and J. G. Cyster (2008). "Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport." *Nat Immunol* **9**(1): 54-62.
- M. J. Cismowski (2006). "Non-receptor activators of heterotrimeric G-protein signaling (AGS proteins)." *Semin Cell Dev Biol* **17**(3): 334-344.
- D. E. Clapham and E. J. Neer (1997). "G protein beta gamma subunits." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 167-203.
- F. Clavel and P. Charneau (1994). "Fusion from without directed by human immunodeficiency virus particles." *J Virol* **68**(2): 1179-1185.
- F. Clavel, D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux and et al. (1986). "Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS." *Science* **233**(4761): 343-346.
- P. Colin, Y. Benureau, I. Staropoli, Y. Wang, N. Gonzalez, J. Alcamí, O. Hartley, A. Brelot, F. Arenzana-Seisdedos and B. Lagane (2013). "HIV-1 exploits CCR5 conformational heterogeneity to escape inhibition by chemokines." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- R. I. Connor and D. D. Ho (1994). "Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression." *J Virol* **68**(7): 4400-4408.
- R. I. Connor, K. E. Sheridan, D. Ceradini, S. Choe and N. R. Landau (1997). "Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals." *J Exp Med* **185**(4): 621-628.

R. L. Contento, B. Molon, C. Boullaran, T. Pozzan, S. Manes, S. Marullo and A. Viola (2008). "CXCR4-CCR5: a couple modulating T cell functions." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(29): 10101-10106.

P. Corbeau and J. Reynes (2009). "CCR5 antagonism in HIV infection: ways, effects, and side effects." *AIDS* **23**(15): 1931-1943.

M. Cornelissen, G. Mulder-Kampinga, J. Veenstra, F. Zorgdrager, C. Kuiken, S. Hartman, J. Dekker, L. van der Hoek, C. Sol, R. Coutinho and et al. (1995). "Syncytium-inducing (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-syncytium-inducing/SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population." *J Virol* **69**(3): 1810-1818.

J. G. Cyster (2005). "Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs." *Annu Rev Immunol* **23**: 127-159.

J. G. Cyster and S. R. Schwab (2011). "Sphingosine-1-Phosphate and Lymphocyte Egress from Lymphoid Organs." *Annu Rev Immunol*.

N. Czeloth, G. Bernhardt, F. Hofmann, H. Genth and R. Forster (2005). "Sphingosine-1-phosphate mediates migration of mature dendritic cells." *J Immunol* **175**(5): 2960-2967.

A. G. Dalgleish, P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves and R. A. Weiss (1984). "The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus." *Nature* **312**(5996): 763-767.

A. P. Davenport, S. P. Alexander, J. L. Sharman, A. J. Pawson, H. E. Benson, A. E. Monaghan, W. C. Liew, C. P. Mpamhanga, T. I. Bonner, R. R. Neubig, J. P. Pin, M. Spedding and A. J. Harmar (2013). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVIII. G Protein-Coupled Receptor List: Recommendations for New Pairings with Cognate Ligands." *Pharmacol Rev* **65**(3): 967-986.

M. D. Davis, J. J. Clemens, T. L. Macdonald and K. R. Lynch (2005). "Sphingosine 1-phosphate analogs as receptor antagonists." *J Biol Chem* **280**(11): 9833-9841.

E. De Clercq (2010). "Recent advances on the use of the CXCR4 antagonist plerixafor (AMD3100, Mozobil) and potential of other CXCR4 antagonists as stem cell mobilizers." *Pharmacol Ther* **128**(3): 509-518.

J. J. De Jong, A. De Ronde, W. Keulen, M. Tersmette and J. Goudsmit (1992). "Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution." *J Virol* **66**(11): 6777-6780.

H. Deng, R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman and N. R. Landau (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." *Nature* **381**(6584): 661-666.

C. Desmetz, Y. L. Lin, C. Mettling, P. Portales, D. Noel, J. Clot, C. Jorgensen and P. Corbeau (2007). "Cell surface CCR5 density determines the intensity of T cell migration towards rheumatoid arthritis synoviocytes." *Clin Immunol* **123**(2): 148-154.

C. Desmetz, Y. L. Lin, C. Mettling, P. Portales, H. Rabesandratana, J. Clot and P. Corbeau (2006). "The strength of the chemotactic response to a CCR5 binding chemokine is determined by the level of cell surface CCR5 density." *Immunology* **119**(4): 551-561.

C. A. Didigu and R. W. Doms (2012). "Novel Approaches to Inhibit HIV Entry." *Viruses* **4**(2): 309-324.

P. Dorr, M. Westby, S. Dobbs, P. Griffin, B. Irvine, M. Macartney, J. Mori, G. Rickett, C. Smith-Burchnell, C. Napier, R. Webster, D. Armour, D. Price, B. Stammen, A. Wood and M. Perros (2005). "Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity." *Antimicrob Agents Chemother* **49**(11): 4721-4732.

G. B. Downes and N. Gautam (1999). "The G protein subunit gene families." *Genomics* **62**(3): 544-552.

L. El-Asmar, J. Y. Springael, S. Ballet, E. U. Andrieu, G. Vassart and M. Parmentier (2005). "Evidence for negative binding cooperativity within CCR5-CCR2b heterodimers." *Mol Pharmacol* **67**(2): 460-469.

Y. Feng, C. C. Broder, P. E. Kennedy and E. A. Berger (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." *Science* **272**(5263): 872-877.

S. S. Ferguson (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." *Pharmacol Rev* **53**(1): 1-24.

T. A. Fields and P. J. Casey (1997). "Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins." *Biochem J* **321** (Pt 3): 561-571.

M. J. Finley, X. Chen, G. Bardi, P. Davey, E. B. Geller, L. Zhang, M. W. Adler and T. J. Rogers (2008). "Bi-directional heterologous desensitization between the major HIV-1 co-receptor CXCR4 and the kappa-opioid receptor." *J Neuroimmunol* **197**(2): 114-123.

A. L. Fiser, T. Vincent, N. Brieu, Y. L. Lin, P. Portales, C. Mettling, J. Reynes and P. Corbeau (2010). "High CD4+ T-Cell Surface CXCR4 Density as a Risk Factor for R5 to X4 Switch in the Course of HIV-1 Infection." *J Acquir Immune Defic Syndr*.

S. M. Foord, T. I. Bonner, R. R. Neubig, E. M. Rosser, J. P. Pin, A. P. Davenport, M. Spedding and A. J. Harmar (2005). "International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list." *Pharmacol Rev* **57**(2): 279-288.

R. A. Fouchier, M. Groenink, N. A. Kootstra, M. Tersmette, H. G. Huisman, F. Miedema and H. Schuitemaker (1992). "Phenotype-associated sequence variation in the third

variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule." *J Virol* **66**(5): 3183-3187.

J. M. Fox, E. Letellier, C. J. Oliphant and N. Signoret (2011). "TLR2-dependent pathway of heterologous down-modulation for the CC chemokine receptors 1, 2, and 5 in human blood monocytes." *Blood* **117**(6): 1851-1860.

A. D. Frankel and J. A. Young (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." *Annu Rev Biochem* **67**: 1-25.

R. Fredriksson (2006). "G Protein-coupled Receptors in the Human Genome." *Ligand Design for G Protein-coupled Receptors*.

R. Fredriksson, M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin and H. B. Schioth (2003). "The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints." *Mol Pharmacol* **63**(6): 1256-1272.

E. O. Freed (2001). "HIV-1 replication." *Somat Cell Mol Genet* **26**(1-6): 13-33.

K. J. French, R. S. Schrecengost, B. D. Lee, Y. Zhuang, S. N. Smith, J. L. Eberly, J. K. Yun and C. D. Smith (2003). "Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase." *Cancer Res* **63**(18): 5962-5969.

R. M. Fryer, A. Muthukumarana, P. C. Harrison, S. Nodop Mazurek, R. R. Chen, K. E. Harrington, R. M. Dinallo, J. C. Horan, L. Patnaude, L. K. Modis and G. A. Reinhart (2012). "The clinically-tested S1P receptor agonists, FTY720 and BAF312, demonstrate subtype-specific bradycardia (S1P(1)) and hypertension (S1P(3)) in rat." *PLoS One* **7**(12): e52985.

Y. Fujii, H. Ohtake, N. Ono, T. Hara, T. Sakurai, S. Takahashi, T. Takayama, Y. Fukasawa, F. Shiozawa, N. Tsukahara, T. Hirayama, Y. Igarashi and R. Goitsuka "Lymphopenia induced by a novel selective S1P1 antagonist structurally unrelated to S1P." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*(0).

S. Fukuhara, S. Simmons, S. Kawamura, A. Inoue, Y. Orba, T. Tokudome, Y. Sunden, Y. Arai, K. Moriwaki, J. Ishida, A. Uemura, H. Kiyonari, T. Abe, A. Fukamizu, M. Hirashima, H. Sawa, J. Aoki, M. Ishii and N. Mochizuki (2012). "The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice." *J Clin Invest* **122**(4): 1416-1426.

S. Galandrin, G. Oligny-Longpre and M. Bouvier (2007). "The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery." *Trends Pharmacol Sci* **28**(8): 423-430.

T. Galvez, B. Duthey, J. Kniazeff, J. Blahos, G. Rovelli, B. Bettler, L. Prezeau and J. P. Pin (2001). "Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function." *EMBO J* **20**(9): 2152-2159.

J. G. Garcia, F. Liu, A. D. Verin, A. Birukova, M. A. Dechert, W. T. Gerthoffer, J. R. Bamberg and D. English (2001). "Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement." *J Clin Invest* **108**(5): 689-701.

- C. Garrido, V. Roulet, N. Chueca, E. Poveda, A. Aguilera, K. Skrabal, N. Zahonero, S. Carlos, F. Garcia, J. L. Faudon, V. Soriano and C. de Mendoza (2008). "Evaluation of eight different bioinformatics tools to predict viral tropism in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes." *J Clin Microbiol* **46**(3): 887-891.
- C. R. Gault, L. M. Obeid and Y. A. Hannun (2010). "An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown." *Adv Exp Med Biol* **688**: 1-23.
- T. B. Geijtenbeek, D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor and Y. van Kooyk (2000). "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells." *Cell* **100**(5): 587-597.
- S. R. George, T. Fan, Z. Xie, R. Tse, V. Tam, G. Varghese and B. F. O'Dowd (2000). "Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties." *J Biol Chem* **275**(34): 26128-26135.
- A. Gervaix, J. Nicolas, P. Portales, K. Posfay-Barbe, C. A. Wyler, M. Segondy, O. Avinens, C. A. Siegrist, J. Clot, J. F. Eliaou, J. Astruc and P. Corbeau (2002). "Response to treatment and disease progression linked to CD4+ T cell surface CC chemokine receptor 5 density in human immunodeficiency virus type 1 vertical infection." *J Infect Dis* **185**(8): 1055-1061.
- T. K. Ghosh, J. Bian and D. L. Gill (1994). "Sphingosine 1-phosphate generated in the endoplasmic reticulum membrane activates release of stored calcium." *J Biol Chem* **269**(36): 22628-22635.
- O. Giegold, N. Ogrissek, C. Richter, M. Schroder, M. Herrero San Juan, J. M. Pfeilschifter and H. H. Radeke (2013). "CXCL9 causes heterologous desensitization of CXCL12-mediated memory T lymphocyte activation." *J Immunol* **190**(7): 3696-3705.
- C. Gomez and T. J. Hope (2005). "The ins and outs of HIV replication." *Cell Microbiol* **7**(5): 621-626.
- K. Gonda, H. Okamoto, N. Takuwa, Y. Yatomi, H. Okazaki, T. Sakurai, S. Kimura, R. Sillard, K. Harii and Y. Takuwa (1999). "The novel sphingosine 1-phosphate receptor AGR16 is coupled via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins to multiple signalling pathways." *Biochem J* **337** (Pt 1): 67-75.
- P. J. Gonzalez-Cabrera, E. Jo, M. G. Sanna, S. Brown, N. Leaf, D. Marsolais, M. T. Schaeffer, J. Chapman, M. Cameron, M. Guerrero, E. Roberts and H. Rosen (2008). "Full pharmacological efficacy of a novel S1P1 agonist that does not require S1P-like headgroup interactions." *Mol Pharmacol* **74**(5): 1308-1318.
- S. Grabar, H. Selinger-Leneman, S. Abgrall, G. Pialoux, L. Weiss and D. Costagliola (2009). "Prevalence and comparative characteristics of long-term nonprogressors and HIV controller patients in the French Hospital Database on HIV." *AIDS* **23**(9): 1163-1169.

- M. H. Graler (2010). "Targeting sphingosine 1-phosphate (S1P) levels and S1P receptor functions for therapeutic immune interventions." *Cell Physiol Biochem* **26**(1): 79-86.
- M. H. Graler, G. Bernhardt and M. Lipp (1998). "EDG6, a novel G-protein-coupled receptor related to receptors for bioactive lysophospholipids, is specifically expressed in lymphoid tissue." *Genomics* **53**(2): 164-169.
- M. H. Graler and E. J. Goetzl (2004). "The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors." *FASEB J* **18**(3): 551-553.
- D. S. Green, D. M. Center and W. W. Cruikshank (2009). "Human immunodeficiency virus type 1 gp120 reprogramming of CD4+ T-cell migration provides a mechanism for lymphadenopathy." *J Virol* **83**(11): 5765-5772.
- M. C. Grimm, R. Newman, Z. Hassim, N. Cuan, S. J. Connor, Y. Le, J. M. Wang, J. J. Oppenheim and A. R. Lloyd (2003). "Cutting edge: vasoactive intestinal peptide acts as a potent suppressor of inflammation in vivo by trans-deactivating chemokine receptors." *J Immunol* **171**(10): 4990-4994.
- J. C. Grivel, J. Elliott, A. Lisco, A. Biancotto, C. Condack, R. J. Shattock, I. McGowan, L. Margolis and P. Anton (2007). "HIV-1 pathogenesis differs in rectosigmoid and tonsillar tissues infected ex vivo with CCR5- and CXCR4-tropic HIV-1." *AIDS* **21**(10): 1263-1272.
- S. K. Gupta, P. G. Lysko, K. Pillarisetti, E. Ohlstein and J. M. Stadel (1998). "Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines." *J Biol Chem* **273**(7): 4282-4287.
- S. K. Gupta and K. Pillarisetti (1999). "Cutting edge: CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant." *J Immunol* **163**(5): 2368-2372.
- N. C. Hait, J. Allegood, M. Maceyka, G. M. Strub, K. B. Harikumar, S. K. Singh, C. Luo, R. Marmorstein, T. Kordula, S. Milstien and S. Spiegel (2009). "Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate." *Science* **325**(5945): 1254-1257.
- H. E. Hamm (1998). "The many faces of G protein signaling." *J Biol Chem* **273**(2): 669-672.
- H. E. Hamm and A. Gilchrist (1996). "Heterotrimeric G proteins." *Curr Opin Cell Biol* **8**(2): 189-196.
- M. A. Hanson, C. B. Roth, E. Jo, M. T. Griffith, F. L. Scott, G. Reinhart, H. Desale, B. Clemons, S. M. Cahalan, S. C. Schuerer, M. G. Sanna, G. W. Han, P. Kuhn, H. Rosen and R. C. Stevens (2012). "Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor." *Science* **335**(6070): 851-855.

J. M. Harouse, C. Buckner, A. Gettie, R. Fuller, R. Bohm, J. Blanchard and C. Cheng-Mayer (2003). "CD8+ T cell-mediated CXC chemokine receptor 4-simian/human immunodeficiency virus suppression in dually infected rhesus macaques." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10977-10982.

O. Hartley, P. J. Klasse, Q. J. Sattentau and J. P. Moore (2005). "V3: HIV's switch-hitter." AIDS Res Hum Retroviruses **21**(2): 171-189.

J. He, Y. Chen, M. Farzan, H. Choe, A. Ohagen, S. Gartner, J. Busciglio, X. Yang, W. Hofmann, W. Newman, C. R. Mackay, J. Sodroski and D. Gabuzda (1997). "CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia." Nature **385**(6617): 645-649.

I. Hecht, L. Cahalon, R. Hershkoviz, A. Lahat, S. Franitza and O. Lider (2003). "Heterologous desensitization of T cell functions by CCR5 and CXCR4 ligands: inhibition of cellular signaling, adhesion and chemotaxis." Int Immunol **15**(1): 29-38.

C. H. Heldin (1995). "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction." Cell **80**(2): 213-223.

C. W. Hendrix, A. C. Collier, M. M. Lederman, D. Schols, R. B. Pollard, S. Brown, J. B. Jackson, R. W. Coombs, M. J. Glesby, C. W. Flexner, G. J. Bridger, K. Badel, R. T. MacFarland, G. W. Henson, G. Calandra and A. H. S. Group (2004). "Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of AMD3100, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in HIV-1 infection." J Acquir Immune Defic Syndr **37**(2): 1253-1262.

T. J. Henrich (2013). "In depth investigation of peripheral and gut HIV-1 reservoirs, HIV-specific cellular immunity, and host microchimerism following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." 7th International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention.

T. J. Henrich, Z. Hu, J. Z. Li, G. Sciaranghella, M. P. Busch, S. M. Keating, S. Gallien, N. H. Lin, F. F. Giguel, L. Lavoie, V. T. Ho, P. Armand, R. J. Soiffer, M. Sagar, A. S. Lacasce and D. R. Kuritzkes (2013). "Long-term reduction in peripheral blood HIV type 1 reservoirs following reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation." J Infect Dis **207**(11): 1694-1702.

P. Hernanz-Falcon, J. M. Rodriguez-Frade, A. Serrano, D. Juan, A. del Sol, S. F. Soriano, F. Roncal, L. Gomez, A. Valencia, A. C. Martinez and M. Mellado (2004). "Identification of amino acid residues crucial for chemokine receptor dimerization." Nat Immunol **5**(2): 216-223.

D. R. Herr, N. Grillet, M. Schwander, R. Rivera, U. Muller and J. Chun (2007). "Sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling is required for maintenance of hair cells mainly via activation of S1P2." J Neurosci **27**(6): 1474-1478.

J. Hillion, M. Canals, M. Torvinen, V. Casado, R. Scott, A. Terasmaa, A. Hansson, S. Watson, M. E. Olah, J. Mallof, E. I. Canela, M. Zoli, L. F. Agnati, C. F. Ibanez, C. Lluís, R. Franco, S. Ferre and K. Fuxe (2002). "Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors." J Biol Chem **277**(20): 18091-18097.

- Y. Hisano, N. Kobayashi, A. Kawahara, A. Yamaguchi and T. Nishi (2011). "The sphingosine 1-phosphate transporter, SPNS2, functions as a transporter of the phosphorylated form of the immunomodulating agent FTY720." *J Biol Chem* **286**(3): 1758-1766.
- Y. Hisano, N. Kobayashi, A. Yamaguchi and T. Nishi (2012). "Mouse SPNS2 functions as a sphingosine-1-phosphate transporter in vascular endothelial cells." *PLoS One* **7**(6): e38941.
- Y. Hisano, T. Nishi and A. Kawahara (2012). "The functional roles of sphingosine-1-phosphate (S1P) in immunity." *J Biochem*.
- T. Hla (2003). "Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate." *Pharmacol Res* **47**(5): 401-407.
- T. Hla, K. Venkataraman and J. Michaud (2008). "The vascular S1P gradient-cellular sources and biological significance." *Biochim Biophys Acta* **1781**(9): 477-482.
- N. G. Hoffman, F. Seillier-Moiseiwitsch, J. Ahn, J. M. Walker and R. Swanstrom (2002). "Variability in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 Env protein linked to phenotype-associated changes in the V3 loop." *J Virol* **76**(8): 3852-3864.
- M. Honczarenko, Y. Le, A. M. Glodek, M. Majka, J. J. Campbell, M. Z. Ratajczak and L. E. Silberstein (2002). "CCR5-binding chemokines modulate CXCL12 (SDF-1)-induced responses of progenitor B cells in human bone marrow through heterologous desensitization of the CXCR4 chemokine receptor." *Blood* **100**(7): 2321-2329.
- S. M. Honig, S. Fu, X. Mao, A. Yopp, M. D. Gunn, G. J. Randolph and J. S. Bromberg (2003). "FTY720 stimulates multidrug transporter- and cysteinyl leukotriene-dependent T cell chemotaxis to lymph nodes." *J Clin Invest* **111**(5): 627-637.
- E. H. Hurowitz, J. M. Melnyk, Y. J. Chen, H. Kouros-Mehr, M. I. Simon and H. Shizuya (2000). "Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes." *DNA Res* **7**(2): 111-120.
- F. Huttenrauch, B. Pollok-Kopp and M. Oppermann (2005). "G protein-coupled receptor kinases promote phosphorylation and beta-arrestin-mediated internalization of CCR5 homo- and hetero-oligomers." *J Biol Chem* **280**(45): 37503-37515.
- G. Hutter, D. Nowak, M. Mossner, S. Ganepola, A. Mussig, K. Allers, T. Schneider, J. Hofmann, C. Kucherer, O. Blau, I. W. Blau, W. K. Hofmann and E. Thiel (2009). "Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation." *N Engl J Med* **360**(7): 692-698.
- A. Huwiler and J. Pfeilschifter (2008). "New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets." *Biochem Pharmacol* **75**(10): 1893-1900.
- D. S. Im (2010). "Pharmacological tools for lysophospholipid GPCRs: development of agonists and antagonists for LPA and S1P receptors." *Acta Pharmacol Sin* **31**(9): 1213-1222.

- D. S. Im, C. E. Heise, N. Ancellin, B. F. O'Dowd, G. J. Shei, R. P. Heavens, M. R. Rigby, T. Hla, S. Mandala, G. McAllister, S. R. George and K. R. Lynch (2000). "Characterization of a novel sphingosine 1-phosphate receptor, Edg-8." *J Biol Chem* **275**(19): 14281-14286.
- I. Ishii, B. Friedman, X. Ye, S. Kawamura, C. McGiffert, J. J. Contos, M. A. Kingsbury, G. Zhang, J. H. Brown and J. Chun (2001). "Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3." *J Biol Chem* **276**(36): 33697-33704.
- N. Isik, D. Hereld and T. Jin (2008). "Fluorescence resonance energy transfer imaging reveals that chemokine-binding modulates heterodimers of CXCR4 and CCR5 receptors." *PLoS One* **3**(10): e3424.
- H. Issafras, S. Angers, S. Bulenger, C. Blanpain, M. Parmentier, C. Labbe-Jullie, M. Bouvier and S. Marullo (2002). "Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors." *J Biol Chem* **277**(38): 34666-34673.
- C. N. Jenne, A. Enders, R. Rivera, S. R. Watson, A. J. Bankovich, J. P. Pereira, Y. Xu, C. M. Roots, J. N. Beilke, A. Banerjee, S. L. Reiner, S. A. Miller, A. S. Weinmann, C. C. Goodnow, L. L. Lanier, J. G. Cyster and J. Chun (2009). "T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow." *J Exp Med* **206**(11): 2469-2481.
- M. A. Jensen, F. S. Li, A. B. van 't Wout, D. C. Nickle, D. Shriner, H. X. He, S. McLaughlin, R. Shankarappa, J. B. Margolick and J. I. Mullins (2003). "Improved coreceptor usage prediction and genotypic monitoring of R5-to-X4 transition by motif analysis of human immunodeficiency virus type 1 env V3 loop sequences." *J Virol* **77**(24): 13376-13388.
- P. S. Jolly, M. Bektas, A. Olivera, C. Gonzalez-Espinosa, R. L. Proia, J. Rivera, S. Milstien and S. Spiegel (2004). "Transactivation of sphingosine-1-phosphate receptors by FcepsilonRI triggering is required for normal mast cell degranulation and chemotaxis." *J Exp Med* **199**(7): 959-970.
- D. T. Jones and R. R. Reed (1989). "Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction." *Science* **244**(4906): 790-795.
- M. B. Jones, D. P. Siderovski and S. B. Hooks (2004). "The G betagamma dimer as a novel source of selectivity in G-protein signaling: GGL-ing at convention." *Mol Interv* **4**(4): 200-214.
- B. A. Jordan and L. A. Devi (1999). "G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function." *Nature* **399**(6737): 697-700.
- D. E. Kaminsky and T. J. Rogers (2011). "Nociceptin/orphanin FQ receptor-driven heterologous desensitization of the major HIV-1 co-receptor CXCR4." *J Neuroimmune Pharmacol* **6**(4): 546-550.

- V. Katritch, V. Cherezov and R. C. Stevens (2012). "Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures." *Trends Pharmacol Sci* **33**(1): 17-27.
- K. Kaupmann, B. Malitschek, V. Schuler, J. Heid, W. Froestl, P. Beck, J. Mosbacher, S. Bischoff, A. Kulik, R. Shigemoto, A. Karschin and B. Bettler (1998). "GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes." *Nature* **396**(6712): 683-687.
- A. Kawahara, T. Nishi, Y. Hisano, H. Fukui, A. Yamaguchi and N. Mochizuki (2009). "The sphingolipid transporter spns2 functions in migration of zebrafish myocardial precursors." *Science* **323**(5913): 524-527.
- J. H. Kehrl (1998). "Heterotrimeric G protein signaling: roles in immune function and fine-tuning by RGS proteins." *Immunity* **8**(1): 1-10.
- T. Kenakin (2004). "Efficacy as a vector: the relative prevalence and paucity of inverse agonism." *Mol Pharmacol* **65**(1): 2-11.
- P. C. Kennedy, R. Zhu, T. Huang, J. L. Tomsig, T. P. Mathews, M. David, O. Peyruchaud, T. L. Macdonald and K. R. Lynch (2011). "Characterization of a Sphingosine 1-phosphate Receptor Antagonist Prodrug." *J Pharmacol Exp Ther*.
- E. N. Kersh, W. Luo, D. R. Adams, J. Mitchell, J. G. Garcia-Lerma, S. Butera, T. Folks and R. Otten (2009). "Evaluation of the lymphocyte trafficking drug FTY720 in SHIVSF162P3-infected rhesus macaques." *J Antimicrob Chemother* **63**(4): 758-762.
- P. Keul, S. Lucke, K. von Wnuck Lipinski, C. Bode, M. Graler, G. Heusch and B. Levkau (2011). "Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis." *Circ Res* **108**(3): 314-323.
- R. H. Kim, K. Takabe, S. Milstien and S. Spiegel (2009). "Export and functions of sphingosine-1-phosphate." *Biochim Biophys Acta* **1791**(7): 692-696.
- D. Klatzmann, E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman and L. Montagnier (1984). "T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV." *Nature* **312**(5996): 767-768.
- M. J. Kluk and T. Hla (2002). "Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors." *Biochim Biophys Acta* **1582**(1-3): 72-80.
- N. Kobayashi, T. Nishi, T. Hirata, A. Kihara, T. Sano, Y. Igarashi and A. Yamaguchi (2006). "Sphingosine 1-phosphate is released from the cytosol of rat platelets in a carrier-mediated manner." *J Lipid Res* **47**(3): 614-621.
- B. Kobilka (1992). "Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors." *Annu Rev Neurosci* **15**: 87-114.
- T. A. Kohout and R. J. Lefkowitz (2003). "Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization." *Mol Pharmacol* **63**(1): 9-18.

- M. Koot, A. H. Vos, R. P. Keet, R. E. de Goede, M. W. Dercksen, F. G. Terpstra, R. A. Coutinho, F. Miedema and M. Tersmette (1992). "HIV-1 biological phenotype in long-term infected individuals evaluated with an MT-2 cocultivation assay." *AIDS* **6**(1): 49-54.
- C. L. Kuiken, J. J. de Jong, E. Baan, W. Keulen, M. Tersmette and J. Goudsmit (1992). "Evolution of the V3 envelope domain in proviral sequences and isolates of human immunodeficiency virus type 1 during transition of the viral biological phenotype." *J Virol* **66**(7): 4622-4627.
- M. J. Kwakkenbos, E. N. Kop, M. Stacey, M. Matmati, S. Gordon, H. H. Lin and J. Hamann (2004). "The EGF-TM7 family: a postgenomic view." *Immunogenetics* **55**(10): 655-666.
- A. A. Lackner, M. M. Lederman and B. Rodriguez (2012). "HIV Pathogenesis: The Host." *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(9).
- N. Laguette, B. Sobhian, N. Casartelli, M. Ringeard, C. Chable-Bessia, E. Segeral, A. Yatim, S. Emiliani, O. Schwartz and M. Benkirane (2011). "SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx." *Nature* **474**(7353): 654-657.
- Y. Y. Lan, D. Tokita, Z. Wang, H. C. Wang, J. Zhan, V. Brinkmann and A. W. Thomson (2008). "Sphingosine 1-phosphate receptor agonism impairs skin dendritic cell migration and homing to secondary lymphoid tissue: association with prolonged allograft survival." *Transpl Immunol* **20**(1-2): 88-94.
- C. K. Lapham, M. B. Zaitseva, S. Lee, T. Romanstseva and H. Golding (1999). "Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5." *Nat Med* **5**(3): 303-308.
- T. Lapidot (2001). "Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions." *Ann N Y Acad Sci* **938**: 83-95.
- F. Lazarini, T. N. Tham, P. Casanova, F. Arenzana-Seisdedos and M. Dubois-Dalcq (2003). "Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system." *Glia* **42**(2): 139-148.
- Y. Le, M. A. Wetzel, W. Shen, W. Gong, T. J. Rogers, E. E. Henderson and J. M. Wang (2001). "Desensitization of chemokine receptor CCR5 in dendritic cells at the early stage of differentiation by activation of formyl peptide receptors." *Clin Immunol* **99**(3): 365-372.
- B. Lee, B. J. Doranz, S. Rana, Y. Yi, M. Mellado, J. M. Frade, A. C. Martinez, S. J. O'Brien, M. Dean, R. G. Collman and R. W. Doms (1998). "Influence of the CCR2-V64I polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity and on chemokine receptor function of CCR2b, CCR3, CCR5, and CXCR4." *J Virol* **72**(9): 7450-7458.

- M. J. Lee, S. Thangada, K. P. Claffey, N. Ancellin, C. H. Liu, M. Kluk, M. Volpi, R. I. Sha'afi and T. Hla (1999). "Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate." *Cell* **99**(3): 301-312.
- R. J. Lefkowitz and S. K. Shenoy (2005). "Transduction of receptor signals by beta-arrestins." *Science* **308**(5721): 512-517.
- A. Levoye, K. Balabanian, F. Baleux, F. Bachelerie and B. Lagane (2009). "CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling." *Blood* **113**(24): 6085-6093.
- J. A. Levy (1993). "Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection." *Microbiol Rev* **57**(1): 183-289.
- N. D. Lewis, S. A. Haxhinasto, S. M. Anderson, D. E. Stefanopoulos, S. E. Fogal, P. Adusumalli, S. N. Desai, L. A. Patnaude, S. M. Lukas, K. R. Ryan, A. J. Slavin, M. L. Brown and L. K. Modis (2013). "Circulating Monocytes Are Reduced by Sphingosine-1-Phosphate Receptor Modulators Independently of S1P3." *J Immunol*.
- B. Q. Li, M. A. Wetzel, J. A. Mikovits, E. E. Henderson, T. J. Rogers, W. Gong, Y. Le, F. W. Ruscetti and J. M. Wang (2001). "The synthetic peptide WKYMVm attenuates the function of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 through activation of formyl peptide receptor-like 1." *Blood* **97**(10): 2941-2947.
- F. Libert, P. Cochaux, G. Beckman, M. Samson, M. Aksenova, A. Cao, A. Czeizel, M. Claustres, C. de la Rua, M. Ferrari, C. Ferrec, G. Glover, B. Grinde, S. Guran, V. Kucinskis, J. Lavinha, B. Mercier, G. Ogur, L. Peltonen, C. Rosatelli, M. Schwartz, V. Spitsyn, L. Timar, L. Beckman, M. Parmentier and G. Vassart (1998). "The *deltaccr5* mutation conferring protection against HIV-1 in Caucasian populations has a single and recent origin in Northeastern Europe." *Hum Mol Genet* **7**(3): 399-406.
- S. S. Lieberman-Blum, H. B. Fung and J. C. Bandres (2008). "Maraviroc: a CCR5-receptor antagonist for the treatment of HIV-1 infection." *Clin Ther* **30**(7): 1228-1250.
- H. Lim, L. Kane, J. B. Schwartz, C. S. Hesdorffer, S. G. Deeks, N. Greig, L. Ferrucci and E. J. Goetzl (2012). "Lenalidomide enhancement of human T cell functions in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and HIV-negative CD4 T lymphocytopenic patients." *Clin Exp Immunol* **169**(2): 182-189.
- Y. L. Lin, C. Mettling, P. Portales, B. Reant, V. Robert-Hebmann, J. Reynes, J. Clot and P. Corbeau (2006). "The efficiency of R5 HIV-1 infection is determined by CD4 T-cell surface CCR5 density through G alpha i-protein signalling." *AIDS* **20**(10): 1369-1377.
- Y. L. Lin, C. Mettling, P. Portales, J. Reynes, J. Clot and P. Corbeau (2002). "Cell surface CCR5 density determines the postentry efficiency of R5 HIV-1 infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15590-15595.
- Y. L. Lin, P. Portales, M. Segondy, V. Baillat, C. M. de Boever, V. Le Moing, B. Reant, B. Montes, J. Clot, J. Reynes and P. Corbeau (2005). "CXCR4 overexpression during the course of HIV-1 infection correlates with the emergence of X4 strains." *J Acquir Immune Defic Syndr* **39**(5): 530-536.

- C. H. Liu, S. Thangada, M. J. Lee, J. R. Van Brocklyn, S. Spiegel and T. Hla (1999). "Ligand-induced trafficking of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1." *Mol Biol Cell* **10**(4): 1179-1190.
- R. Liu, W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup and N. R. Landau (1996). "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection." *Cell* **86**(3): 367-377.
- Y. Liu, R. Wada, T. Yamashita, Y. Mi, C. X. Deng, J. P. Hobson, H. M. Rosenfeldt, V. E. Nava, S. S. Chae, M. J. Lee, C. H. Liu, T. Hla, S. Spiegel and R. L. Proia (2000). "Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation." *J Clin Invest* **106**(8): 951-961.
- D. T. Lodowski and K. Palczewski (2009). "Chemokine receptors and other G protein-coupled receptors." *Curr Opin HIV AIDS* **4**(2): 88-95.
- M. Loetscher, T. Geiser, T. O'Reilly, R. Zwahlen, M. Baggiolini and B. Moser (1994). "Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes." *J Biol Chem* **269**(1): 232-237.
- L. M. Luttrell (2005). "Composition and function of g protein-coupled receptor signalsomes controlling mitogen-activated protein kinase activity." *J Mol Neurosci* **26**(2-3): 253-264.
- P. Ma and R. Zemel (2002). "Value of novelty?" *Nat Rev Drug Discov* **1**(8): 571-572.
- Q. Ma, D. Jones, P. R. Borghesani, R. A. Segal, T. Nagasawa, T. Kishimoto, R. T. Bronson and T. A. Springer (1998). "Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(16): 9448-9453.
- J. J. Maas, S. J. Gange, H. Schuitemaker, R. A. Coutinho, R. van Leeuwen and J. B. Margolick (2000). "Strong association between failure of T cell homeostasis and the syncytium-inducing phenotype among HIV-1-infected men in the Amsterdam Cohort Study." *AIDS* **14**(9): 1155-1161.
- M. Maceyka, K. B. Harikumar, S. Milstien and S. Spiegel (2011). "Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease." *Trends Cell Biol.*
- M. Mack, B. Luckow, P. J. Nelson, J. Cihak, G. Simmons, P. R. Clapham, N. Signoret, M. Marsh, M. Stangassinger, F. Borlat, T. N. Wells, D. Schlondorff and A. E. Proudfoot (1998). "Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity." *J Exp Med* **187**(8): 1215-1224.
- A. J. MacLennan, P. R. Carney, W. J. Zhu, A. H. Chaves, J. Garcia, J. R. Grimes, K. J. Anderson, S. N. Roper and N. Lee (2001). "An essential role for the H218/AGR16/Edg-5/LP(B2) sphingosine 1-phosphate receptor in neuronal excitability." *Eur J Neurosci* **14**(2): 203-209.

P. J. Maddon, S. M. Molineaux, D. E. Maddon, K. A. Zimmerman, M. Godfrey, F. W. Alt, L. Chess and R. Axel (1987). "Structure and expression of the human and mouse T4 genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(24): 9155-9159.

Y. Maeda, H. Matsuyuki, K. Shimano, H. Kataoka, K. Sugahara and K. Chiba (2007). "Migration of CD4 T cells and dendritic cells toward sphingosine 1-phosphate (S1P) is mediated by different receptor subtypes: S1P regulates the functions of murine mature dendritic cells via S1P receptor type 3." *J Immunol* **178**(6): 3437-3446.

R. Maggio, F. Novi, M. Scarselli and G. U. Corsini (2005). "The impact of G-protein-coupled receptor hetero-oligomerization on function and pharmacology." *FEBS J* **272**(12): 2939-2946.

R. L. Malek, R. E. Toman, L. C. Edsall, S. Wong, J. Chiu, C. A. Letterle, J. R. Van Brocklyn, S. Milstien, S. Spiegel and N. H. Lee (2001). "Nrg-1 belongs to the endothelial differentiation gene family of G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors." *J Biol Chem* **276**(8): 5692-5699.

S. Mandala, R. Hajdu, J. Bergstrom, E. Quackenbush, J. Xie, J. Milligan, R. Thornton, G. J. Shei, D. Card, C. Keohane, M. Rosenbach, J. Hale, C. L. Lynch, K. Rupprecht, W. Parsons and H. Rosen (2002). "Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists." *Science* **296**(5566): 346-349.

S. M. Mandala (2001). "Sphingosine-1-phosphate phosphatases." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **64**(1-4): 143-156.

M. Margeta-Mitrovic, Y. N. Jan and L. Y. Jan (2000). "A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization." *Neuron* **27**(1): 97-106.

F. H. Marshall, J. White, M. Main, A. Green and A. Wise (1999). "GABA(B) receptors function as heterodimers." *Biochem Soc Trans* **27**(4): 530-535.

D. Marsolais and H. Rosen (2009). "Chemical modulators of sphingosine-1-phosphate receptors as barrier-oriented therapeutic molecules." *Nat Rev Drug Discov* **8**(4): 297-307.

S. Marullo and M. Bouvier (2007). "Resonance energy transfer approaches in molecular pharmacology and beyond." *Trends Pharmacol Sci* **28**(8): 362-365.

M. V. Mashikian, T. C. Ryan, A. Seman, W. Brazer, D. M. Center and W. W. Cruikshank (1999). "Reciprocal desensitization of CCR5 and CD4 is mediated by IL-16 and macrophage-inflammatory protein-1 beta, respectively." *J Immunol* **163**(6): 3123-3130.

M. Matloubian, C. G. Lo, G. Cinamon, M. J. Lesneski, Y. Xu, V. Brinkmann, M. L. Allende, R. L. Proia and J. G. Cyster (2004). "Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1." *Nature* **427**(6972): 355-360.

D. Maurel, L. Comps-Agrar, C. Brock, M. L. Rives, E. Bourrier, M. A. Ayoub, H. Bazin, N. Tinel, T. Durroux, L. Prezeau, E. Trinquet and J. P. Pin (2008). "Cell-surface protein-

protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization." *Nat Methods* **5**(6): 561-567.

K. Mayol, V. Biajoux, J. Marvel, K. Balabanian and T. Walzer (2011). "Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking." *Blood*.

C. R. McCudden, M. D. Hains, R. J. Kimple, D. P. Siderovski and F. S. Willard (2005). "G-protein signaling: back to the future." *Cell Mol Life Sci* **62**(5): 551-577.

J. S. McDougal, A. Mawle, S. P. Cort, J. K. Nicholson, G. D. Cross, J. A. Scheppler-Campbell, D. Hicks and J. Sligh (1985). "Cellular tropism of the human retrovirus HTLV-III/LAV. I. Role of T cell activation and expression of the T4 antigen." *J Immunol* **135**(5): 3151-3162.

M. Mellado, J. M. Rodriguez-Frade, A. J. Vila-Coro, A. M. de Ana and A. C. Martinez (1999). "Chemokine control of HIV-1 infection." *Nature* **400**(6746): 723-724.

M. Mellado, J. M. Rodriguez-Frade, A. J. Vila-Coro, S. Fernandez, A. Martin de Ana, D. R. Jones, J. L. Toran and A. C. Martinez (2001). "Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways." *EMBO J* **20**(10): 2497-2507.

G. Meng, X. Wei, X. Wu, M. T. Sellers, J. M. Decker, Z. Moldoveanu, J. M. Orenstein, M. F. Graham, J. C. Kappes, J. Mestecky, G. M. Shaw and P. D. Smith (2002). "Primary intestinal epithelial cells selectively transfer R5 HIV-1 to CCR5+ cells." *Nat Med* **8**(2): 150-156.

N. L. Michael and J. P. Moore (1999). "HIV-1 entry inhibitors: evading the issue." *Nat Med* **5**(7): 740-742.

G. Milligan (2009). "G protein-coupled receptor hetero-dimerization: contribution to pharmacology and function." *Br J Pharmacol* **158**(1): 5-14.

P. Mitra, C. A. Oskeritzian, S. G. Payne, M. A. Beaven, S. Milstien and S. Spiegel (2006). "Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(44): 16394-16399.

J. C. Mudd, P. Murphy, M. Manion, R. Debernardo, J. Hardacre, J. Ammori, G. A. Hardy, C. V. Harding, G. H. Mahabaleswar, M. K. Jain, J. M. Jacobson, A. D. Brooks, S. Lewis, T. W. Schacker, J. Anderson, E. K. Haddad, R. A. Cubas, B. Rodriguez, S. F. Sieg and M. M. Lederman (2013). "Impaired T cell responses to sphingosine-1-phosphate in HIV-1 infected lymph nodes." *Blood*.

A. Mueller and P. G. Strange (2004). "The chemokine receptor, CCR5." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(1): 35-38.

L. M. Munoz, B. L. Holgado, A. C. Martinez, J. M. Rodriguez-Frade and M. Mellado (2012). "Chemokine receptor oligomerization: a further step toward chemokine function." *Immunol Lett* **145**(1-2): 23-29.

N. Murata, K. Sato, J. Kon, H. Tomura, M. Yanagita, A. Kuwabara, M. Ui and F. Okajima (2000). "Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components,

including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions." *Biochem J* **352 Pt 3**: 809-815.

C. Murdoch (2000). "CXCR4: chemokine receptor extraordinaire." *Immunol Rev* **177**: 175-184.

T. T. Murooka, M. Deruaz, F. Marangoni, V. D. Vrbanac, E. Seung, U. H. von Andrian, A. M. Tager, A. D. Luster and T. R. Mempel (2012). "HIV-infected T cells are migratory vehicles for viral dissemination." *Nature* **490**(7419): 283-287.

P. M. Murphy (1996). "Chemokine receptors: structure, function and role in microbial pathogenesis." *Cytokine Growth Factor Rev* **7**(1): 47-64.

P. M. Murphy (2001). "Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis." *N Engl J Med* **345**(11): 833-835.

P. M. Murphy, M. Baggiolini, I. F. Charo, C. A. Hebert, R. Horuk, K. Matsushima, L. H. Miller, J. J. Oppenheim and C. A. Power (2000). "International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors." *Pharmacol Rev* **52**(1): 145-176.

M. Nagahashi, E. Y. Kim, A. Yamada, S. Ramachandran, J. C. Allegood, N. C. Hait, M. Maceyka, S. Milstien, K. Takabe and S. Spiegel (2013). "Spns2, a transporter of phosphorylated sphingoid bases, regulates their blood and lymph levels, and the lymphatic network." *FASEB J* **27**(3): 1001-1011.

T. Nagasawa, S. Hirota, K. Tachibana, N. Takakura, S. Nishikawa, Y. Kitamura, N. Yoshida, H. Kikutani and T. Kishimoto (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." *Nature* **382**(6592): 635-638.

T. Nagasawa, H. Kikutani and T. Kishimoto (1994). "Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(6): 2305-2309.

L. Naldini, U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma and D. Trono (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." *Science* **272**(5259): 263-267.

E. J. Neer (1995). "Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals." *Cell* **80**(2): 249-257.

S. R. Neves, P. T. Ram and R. Iyengar (2002). "G protein pathways." *Science* **296**(5573): 1636-1639.

S. Nijmeijer, R. Leurs, M. J. Smit and H. F. Vischer (2010). "The Epstein-Barr virus-encoded G protein-coupled receptor BILF1 hetero-oligomerizes with human CXCR4, scavenges Gα₁₂ proteins, and constitutively impairs CXCR4 functioning." *J Biol Chem* **285**(38): 29632-29641.

A. Nijnik, S. Clare, C. Hale, J. Chen, C. Raisen, L. Mottram, M. Lucas, J. Estabel, E. Ryder, H. Adissu, N. C. Adams, R. Ramirez-Solis, J. K. White, K. P. Steel, G. Dougan

and R. E. Hancock (2012). "The role of sphingosine-1-phosphate transporter *spsn2* in immune system function." *J Immunol* **189**(1): 102-111.

A. S. Novgorodov, M. El-Alwani, J. Bielawski, L. M. Obeid and T. I. Gudz (2007). "Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration." *FASEB J* **21**(7): 1503-1514.

G. O'Boyle, C. R. Fox, H. R. Walden, J. D. Willet, E. R. Mavin, D. W. Hine, J. M. Palmer, C. E. Barker, C. A. Lamb, S. Ali and J. A. Kirby (2012). "Chemokine receptor CXCR3 agonist prevents human T-cell migration in a humanized model of arthritic inflammation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(12): 4598-4603.

E. Oberlin, A. Amara, F. Bachelier, C. Bessia, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, O. Schwartz, J. M. Heard, I. Clark-Lewis, D. F. Legler, M. Loetscher, M. Baggiolini and B. Moser (1996). "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1." *Nature* **382**(6594): 833-835.

T. Ohmori, Y. Yatomi, M. Osada, F. Kazama, T. Takafuta, H. Ikeda and Y. Ozaki (2003). "Sphingosine 1-phosphate induces contraction of coronary artery smooth muscle cells via S1P2." *Cardiovasc Res* **58**(1): 170-177.

H. Okamoto, N. Takuwa, K. Gonda, H. Okazaki, K. Chang, Y. Yatomi, H. Shigematsu and Y. Takuwa (1998). "EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca²⁺ mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition." *J Biol Chem* **273**(42): 27104-27110.

H. Okamoto, N. Takuwa, T. Yokomizo, N. Sugimoto, S. Sakurada, H. Shigematsu and Y. Takuwa (2000). "Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3." *Mol Cell Biol* **20**(24): 9247-9261.

W. M. Oldham and H. E. Hamm (2008). "Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(1): 60-71.

M. L. Oo, S. H. Chang, S. Thangada, M. T. Wu, K. Rezaul, V. Blaho, S. I. Hwang, D. K. Han and T. Hla (2011). "Engagement of S1P(1)-degradative mechanisms leads to vascular leak in mice." *J Clin Invest* **121**(6): 2290-2300.

M. L. Oo, S. Thangada, M. T. Wu, C. H. Liu, T. L. Macdonald, K. R. Lynch, C. Y. Lin and T. Hla (2007). "Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor." *J Biol Chem* **282**(12): 9082-9089.

M. Oppermann (2004). "Chemokine receptor CCR5: insights into structure, function, and regulation." *Cellular Signalling* **16** (2004) **1201–1210**.

S. Pan, Y. Mi, C. Pally, C. Beerli, A. Chen, D. Guerini, K. Hinterding, B. Nuesslein-Hildesheim, T. Tuntland, S. Lefebvre, Y. Liu, W. Gao, A. Chu, V. Brinkmann, C. Bruns, M. Streiff, C. Cannet, N. Cooke and N. Gray (2006). "A monoselective sphingosine-1-

phosphate receptor-1 agonist prevents allograft rejection in a stringent rat heart transplantation model." *Chem Biol* **13**(11): 1227-1234.

G. Pantaleo, S. Menzo, M. Vaccarezza, C. Graziosi, O. J. Cohen, J. F. Demarest, D. Montefiori, J. M. Orenstein, C. Fox, L. K. Schrager and et al. (1995). "Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection." *N Engl J Med* **332**(4): 209-216.

R. Pappu (2007). "Promotion of Lymphocyte Egress into blood and lymph by distinct sources of S1P." *Science* **316**.

C. Pastore, G. R. Picchio, F. Galimi, R. Fish, O. Hartley, R. E. Offord and D. E. Mosier (2003). "Two mechanisms for human immunodeficiency virus type 1 inhibition by N-terminal modifications of RANTES." *Antimicrob Agents Chemother* **47**(2): 509-517.

O. M. Pello, L. Martinez-Munoz, V. Parrillas, A. Serrano, J. M. Rodriguez-Frade, M. J. Toro, P. Lucas, M. Monterrubio, A. C. Martinez and M. Mellado (2008). "Ligand stabilization of CXCR4/delta-opioid receptor heterodimers reveals a mechanism for immune response regulation." *Eur J Immunol* **38**(2): 537-549.

Y. Percherancier, Y. A. Berchiche, I. Slight, R. Volkmer-Engert, H. Tamamura, N. Fujii, M. Bouvier and N. Heveker (2005). "Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers." *J Biol Chem* **280**(11): 9895-9903.

A. S. Perelson, A. U. Neumann, M. Markowitz, J. M. Leonard and D. D. Ho (1996). "HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time." *Science* **271**(5255): 1582-1586.

M. Pfeiffer, T. Koch, H. Schroder, M. Laugsch, V. Holtt and S. Schulz (2002). "Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization." *J Biol Chem* **277**(22): 19762-19772.

T. H. Pham, T. Okada, M. Matloubian, C. G. Lo and J. G. Cyster (2008). "S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress." *Immunity* **28**(1): 122-133.

J. P. Pin, T. Galvez and L. Prezeau (2003). "Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors." *Pharmacol Ther* **98**(3): 325-354.

J. P. Pin, R. Neubig, M. Bouvier, L. Devi, M. Filizola, J. A. Javitch, M. J. Lohse, G. Milligan, K. Palczewski, M. Parmentier and M. Spedding (2007). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers." *Pharmacol Rev* **59**(1): 5-13.

D. D. Pinschewer, A. F. Ochsenbein, B. Odermatt, V. Brinkmann, H. Hengartner and R. M. Zinkernagel (2000). "FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory." *J Immunol* **164**(11): 5761-5770.

P. Piot, T. C. Quinn, H. Taelman, F. M. Feinsod, K. B. Minlangu, O. Wobin, N. Mbendi, P. Mazebo, K. Ndangi, W. Stevens and et al. (1984). "Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire." Lancet **2**(8394): 65-69.

J. A. Pitcher, J. Inglese, J. B. Higgins, J. L. Arriza, P. J. Casey, C. Kim, J. L. Benovic, M. M. Kwatra, M. G. Caron and R. J. Lefkowitz (1992). "Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors." Science **257**(5074): 1264-1267.

P. Portales, J. Clot and P. Corbeau (2001). "Sex differences in HIV-1 viral load due to sex difference in CCR5 expression." Ann Intern Med **134**(1): 81-82.

A. M. Preininger and H. E. Hamm (2004). "G protein signaling: insights from new structures." Sci STKE **2004**(218): re3.

R. T. Premont and R. R. Gainetdinov (2007). "Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins." Annu Rev Physiol **69**: 511-534.

W. C. Probst, L. A. Snyder, D. I. Schuster, J. Brosius and S. C. Sealfon (1992). "Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily." DNA Cell Biol **11**(1): 1-20.

A. E. Proudfoot (2002). "Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets." Nat Rev Immunol **2**(2): 106-115.

S. Pyne and N. J. Pyne (2011). "Translational aspects of sphingosine 1-phosphate biology." Trends Mol Med.

J. Quancard, B. Bollbuck, P. Janser, D. Angst, F. Berst, P. Buehlmayer, M. Streiff, C. Beerli, V. Brinkmann, D. Guerini, P. A. Smith, T. J. Seabrook, M. Traebert, K. Seuwen, R. Hersperger, C. Bruns, F. Bassilana and M. Bigaud (2012). "A potent and selective S1P(1) antagonist with efficacy in experimental autoimmune encephalomyelitis." Chem Biol **19**(9): 1142-1151.

C. J. Raport, J. Gosling, V. L. Schweickart, P. W. Gray and I. F. Charo (1996). "Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha." J Biol Chem **271**(29): 17161-17166.

A. Rathinasamy, N. Czeloth, O. Pabst, R. Forster and G. Bernhardt (2010). "The origin and maturity of dendritic cells determine the pattern of sphingosine 1-phosphate receptors expressed and required for efficient migration." J Immunol **185**(7): 4072-4081.

L. Ratner, W. Haseltine, R. Patarca, K. J. Livak, B. Starcich, S. F. Josephs, E. R. Doran, J. A. Rafalski, E. A. Whitehorn, K. Baumeister and et al. (1985). "Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III." Nature **313**(6000): 277-284.

S. Raymond, P. Delobel and J. Izopet (2012). "Phenotyping methods for determining HIV tropism and applications in clinical settings." Curr Opin HIV AIDS **7**(5): 463-469.

S. Raymond, P. Delobel, M. Mavigner, M. Cazabat, C. Souyris, S. Encinas, P. Bruel, K. Sandres-Saune, B. Marchou, P. Massip and J. Izopet (2010). "Development and performance of a new recombinant virus phenotypic entry assay to determine HIV-1 coreceptor usage." *J Clin Virol* **47**(2): 126-130.

S. Raymond, P. Delobel, M. Mavigner, M. Cazabat, C. Souyris, K. Sandres-Saune, L. Cuzin, B. Marchou, P. Massip and J. Izopet (2008). "Correlation between genotypic predictions based on V3 sequences and phenotypic determination of HIV-1 tropism." *AIDS* **22**(14): F11-16.

S. Raymond, A. Saliou, F. Nicot, P. Delobel, M. Dubois, R. Carcenac, K. Saune, B. Marchou, P. Massip and J. Izopet (2013). "Characterization of CXCR4-using HIV-1 during primary infection by ultra-deep pyrosequencing." *J Antimicrob Chemother*.

P. Recordon-Pinson, S. Raymond, P. Bellecave, A. G. Marcelin, C. Soulie, D. Descamps, V. Calvez, P. R. Harrigan, H. Fleury, J. Izopet, B. Masquelier and S. A. R. S. Group (2013). "HIV-1 dynamics and coreceptor usage in Maraviroc-treated patients with ongoing replication." *Antimicrob Agents Chemother* **57**(2): 930-935.

J. Reynes, V. Baillat, P. Portales, J. Clot and P. Corbeau (2004). "Relationship between CCR5 density and viral load after discontinuation of antiretroviral therapy." *JAMA* **291**(1): 46.

J. Reynes, P. Portales, M. Segondy, V. Baillat, P. Andre, O. Avinens, M. C. Picot, J. Clot, J. F. Eliaou and P. Corbeau (2001). "CD4 T cell surface CCR5 density as a host factor in HIV-1 disease progression." *AIDS* **15**(13): 1627-1634.

J. Reynes, P. Portales, M. Segondy, V. Baillat, P. Andre, B. Reant, O. Avinens, G. Couderc, M. Benkirane, J. Clot, J. F. Eliaou and P. Corbeau (2000). "CD4+ T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1." *J Infect Dis* **181**(3): 927-932.

R. M. Richardson, K. Tokunaga, R. Marjoram, T. Sata and R. Snyderman (2003). "Interleukin-8-mediated heterologous receptor internalization provides resistance to HIV-1 infectivity. Role of signal strength and receptor desensitization." *J Biol Chem* **278**(18): 15867-15873.

C. D. Rios, B. A. Jordan, I. Gomes and L. A. Devi (2001). "G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function." *Pharmacol Ther* **92**(2-3): 71-87.

J. Rivera, R. L. Proia and A. Olivera (2008). "The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity." *Nat Rev Immunol* **8**(10): 753-763.

M. Rocheville, D. C. Lange, U. Kumar, S. C. Patel, R. C. Patel and Y. C. Patel (2000). "Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity." *Science* **288**(5463): 154-157.

A. G. Rodrigo (1997). "Dynamics of syncytium-inducing and non-syncytium-inducing type 1 human immunodeficiency viruses during primary infection." *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**(17): 1447-1451.

J. M. Rodriguez-Frade, G. del Real, A. Serrano, P. Hernanz-Falcon, S. F. Soriano, A. J. Vila-Coro, A. M. de Ana, P. Lucas, I. Prieto, A. C. Martinez and M. Mellado (2004). "Blocking HIV-1 infection via CCR5 and CXCR4 receptors by acting in trans on the CCR2 chemokine receptor." EMBO J **23**(1): 66-76.

J. M. Rodriguez-Frade, M. Mellado and A. C. Martinez (2001). "Chemokine receptor dimerization: two are better than one." Trends Immunol **22**(11): 612-617.

J. M. Rodriguez-Frade, A. J. Vila-Coro, A. M. de Ana, J. P. Albar, A. C. Martinez and M. Mellado (1999). "The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3628-3633.

T. J. Rogers, A. D. Steele, O. M. Howard and J. J. Oppenheim (2000). "Bidirectional heterologous desensitization of opioid and chemokine receptors." Ann N Y Acad Sci **917**: 19-28.

B. J. Rollins (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-928.

M. T. Roos, J. M. Lange, R. E. de Goede, R. A. Coutinho, P. T. Schellekens, F. Miedema and M. Tersmette (1992). "Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection." J Infect Dis **165**(3): 427-432.

H. Rosen and E. J. Goetzl (2005). "Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network." Nat Rev Immunol **5**(7): 560-570.

H. Rosen, P. J. Gonzalez-Cabrera, M. G. Sanna and S. Brown (2009). "Sphingosine 1-phosphate receptor signaling." Annu Rev Biochem **78**: 743-768.

D. Rossi and A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." Annu Rev Immunol **18**: 217-242.

F. Roviezzo, F. Del Galdo, G. Abbate, M. Bucci, B. D'Agostino, E. Antunes, G. De Dominicis, L. Parente, F. Rossi, G. Cirino and R. De Palma (2004). "Human eosinophil chemotaxis and selective in vivo recruitment by sphingosine 1-phosphate." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(30): 11170-11175.

A. M. Roy, B. Schweighardt, L. A. Eckstein, M. A. Goldsmith and J. M. McCune (2005). "Enhanced replication of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 in CD4(+)CCR5(+)CXCR4(+) T cells." J Acquir Immune Defic Syndr **40**(3): 267-275.

N. Ruffing, N. Sullivan, L. Sharmeen, J. Sodroski and L. Wu (1998). "CCR5 has an expanded ligand-binding repertoire and is the primary receptor used by MCP-2 on activated T cells." Cell Immunol **189**(2): 160-168.

Safrit (1995). "the immunology of primary HIV infection: which immune responses control HIV replication?" Curr Opin Immunol **7**: 456-461.

A. Saliou, P. Delobel, M. Dubois, F. Nicot, S. Raymond, V. Calvez, B. Masquelier, J. Izopet and A. A. R. S. Group (2011). "Concordance between two phenotypic assays

and ultradeep pyrosequencing for determining HIV-1 tropism." *Antimicrob Agents Chemother* **55**(6): 2831-2836.

P. Samama, G. Pei, T. Costa, S. Cotecchia and R. J. Lefkowitz (1994). "Negative antagonists promote an inactive conformation of the beta 2-adrenergic receptor." *Mol Pharmacol* **45**(3): 390-394.

M. Samson, G. LaRosa, F. Libert, P. Paindavoine, M. Detheux, G. Vassart and M. Parmentier (1997). "The second extracellular loop of CCR5 is the major determinant of ligand specificity." *J Biol Chem* **272**(40): 24934-24941.

T. Sanchez, T. Estrada-Hernandez, J. H. Paik, M. T. Wu, K. Venkataraman, V. Brinkmann, K. Claffey and T. Hla (2003). "Phosphorylation and action of the immunomodulator FTY720 inhibits vascular endothelial cell growth factor-induced vascular permeability." *J Biol Chem* **278**(47): 47281-47290.

M. G. Sanna, J. Liao, E. Jo, C. Alfonso, M. Y. Ahn, M. S. Peterson, B. Webb, S. Lefebvre, J. Chun, N. Gray and H. Rosen (2004). "Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate." *J Biol Chem* **279**(14): 13839-13848.

M. G. Sanna, S. K. Wang, P. J. Gonzalez-Cabrera, A. Don, D. Marsolais, M. P. Matheu, S. H. Wei, I. Parker, E. Jo, W. C. Cheng, M. D. Cahalan, C. H. Wong and H. Rosen (2006). "Enhancement of capillary leakage and restoration of lymphocyte egress by a chiral S1P1 antagonist in vivo." *Nat Chem Biol* **2**(8): 434-441.

T. Sano, D. Baker, T. Virag, A. Wada, Y. Yatomi, T. Kobayashi, Y. Igarashi and G. Tigyi (2002). "Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood." *J Biol Chem* **277**(24): 21197-21206.

M. M. Santoro, D. Armenia, L. Fabeni, M. Santoro, C. Gori, F. Forbici, V. Svicher, A. Bertoli, L. Dori, M. Surdo, E. Balestra, G. Palamara, E. Girardi, G. Angarano, M. Andreoni, P. Narciso, A. Antinori, F. Ceccherini-Silberstein and C. F. Perno (2012). "The lowest X4 Geno2Pheno false-positive rate is associated with greater CD4 depletion in HIV-1 infected patients." *Clin Microbiol Infect* **18**(8): E289-298.

K. Sato, E. Malchinkhuu, Y. Horiuchi, C. Mogi, H. Tomura, M. Tosaka, Y. Yoshimoto, A. Kuwabara and F. Okajima (2007). "Critical role of ABCA1 transporter in sphingosine 1-phosphate release from astrocytes." *J Neurochem* **103**(6): 2610-2619.

H. Satsu (2013). "A Sphingosine 1-phosphate receptor 2 selective allosteric agonist." *Bioorg Med Chem*.

Q. J. Sattentau and R. A. Weiss (1988). "The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor." *Cell* **52**(5): 631-633.

T. M. Savarese and C. M. Fraser (1992). "In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors." *Biochem J* **283** (Pt 1): 1-19.

- D. Scholten, M. Canals, D. Maussang, L. Roumen, M. Smit, M. Wijtmans, C. de Graaf, H. Vischer and R. Leurs (2011). "Pharmacological Modulation of Chemokine Receptor Function." *Br J Pharmacol*.
- T. Schoneberg, A. Schulz, H. Biebermann, T. Hermsdorf, H. Rompler and K. Sangkuhl (2004). "Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases." *Pharmacol Ther* **104**(3): 173-206.
- B. Schramm, M. L. Penn, R. F. Speck, S. Y. Chan, E. De Clercq, D. Schols, R. I. Connor and M. A. Goldsmith (2000). "Viral entry through CXCR4 is a pathogenic factor and therapeutic target in human immunodeficiency virus type 1 disease." *J Virol* **74**(1): 184-192.
- H. Schuitemaker, M. Koot, N. A. Kootstra, M. W. Dercksen, R. E. de Goede, R. P. van Steenwijk, J. M. Lange, J. K. Schattenkerk, F. Miedema and M. Tersmette (1992). "Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocyctotropic to T-cell-tropic virus population." *J Virol* **66**(3): 1354-1360.
- H. Schuitemaker, N. A. Kootstra, R. E. de Goede, F. de Wolf, F. Miedema and M. Tersmette (1991). "Monocyctotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture." *J Virol* **65**(1): 356-363.
- T. Schulze, S. Golfier, C. Tabeling, K. Rabel, M. H. Graler, M. Witzernath and M. Lipp (2011). "Sphingosine-1-phosphate receptor 4 (S1P4) deficiency profoundly affects dendritic cell function and TH17-cell differentiation in a murine model." *FASEB J*.
- B. Schweighardt, A. M. Roy, D. A. Meiklejohn, E. J. Grace, 2nd, W. J. Moretto, J. J. Heymann and D. F. Nixon (2004). "R5 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replicates more efficiently in primary CD4+ T-cell cultures than X4 HIV-1." *J Virol* **78**(17): 9164-9173.
- S. C. Sensken, M. Nagarajan, C. Bode and M. H. Graler (2011). "Local inactivation of sphingosine 1-phosphate in lymph nodes induces lymphopenia." *J Immunol* **186**(6): 3432-3440.
- S. C. Sensken, C. Staubert, P. Keul, B. Levkau, T. Schoneberg and M. H. Graler (2008). "Selective activation of G alpha i mediated signalling of S1P3 by FTY720-phosphate." *Cell Signal* **20**(6): 1125-1133.
- W. Shen, B. Li, M. A. Wetzel, T. J. Rogers, E. E. Henderson, S. B. Su, W. Gong, Y. Le, R. Sargeant, D. S. Dimitrov, J. J. Oppenheim and J. M. Wang (2000). "Down-regulation of the chemokine receptor CCR5 by activation of chemotactic formyl peptide receptor in human monocytes." *Blood* **96**(8): 2887-2894.
- M. Shirozu, T. Nakano, J. Inazawa, K. Tashiro, H. Tada, T. Shinohara and T. Honjo (1995). "Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene." *Genomics* **28**(3): 495-500.

- M. I. Simon, M. P. Strathmann and N. Gautam (1991). "Diversity of G proteins in signal transduction." Science **252**(5007): 802-808.
- Singer, II, M. Tian, L. A. Wickham, J. Lin, S. S. Matheravidathu, M. J. Forrest, S. Mandala and E. J. Quackenbush (2005). "Sphingosine-1-phosphate agonists increase macrophage homing, lymphocyte contacts, and endothelial junctional complex formation in murine lymph nodes." J Immunol **175**(11): 7151-7161.
- P. A. Singleton, S. M. Dudek, E. T. Chiang and J. G. Garcia (2005). "Regulation of sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cytoskeletal rearrangement and barrier enhancement by S1P1 receptor, PI3 kinase, Tiam1/Rac1, and alpha-actinin." FASEB J **19**(12): 1646-1656.
- A. Skoura and T. Hla (2009). "Lysophospholipid receptors in vertebrate development, physiology, and pathology." J Lipid Res **50** *Suppl*: S293-298.
- D. Sohy, H. Yano, P. de Nadai, E. Urizar, A. Guillabert, J. A. Javitch, M. Parmentier and J. Y. Springael (2009). "Hetero-oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the protean effects of "selective" antagonists." J Biol Chem **284**(45): 31270-31279.
- J. Song, C. Matsuda, Y. Kai, T. Nishida, K. Nakajima, T. Mizushima, M. Kinoshita, T. Yasue, Y. Sawa and T. Ito (2008). "A novel sphingosine 1-phosphate receptor agonist, 2-amino-2-propanediol hydrochloride (KRP-203), regulates chronic colitis in interleukin-10 gene-deficient mice." J Pharmacol Exp Ther **324**(1): 276-283.
- S. Sorce, R. Myburgh and K. H. Krause (2011). "The chemokine receptor CCR5 in the central nervous system." Prog Neurobiol **93**(2): 297-311.
- S. Spiegel and S. Milstien (2003a). "Exogenous and intracellularly generated sphingosine 1-phosphate can regulate cellular processes by divergent pathways." Biochem Soc Trans **31**(Pt 6): 1216-1219.
- S. Spiegel and S. Milstien (2003b). "Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(5): 397-407.
- S. Spiegel and S. Milstien (2011). "The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity." Nat Rev Immunol.
- J. Y. Springael, E. Urizar and M. Parmentier (2005). "Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences." Cytokine Growth Factor Rev **16**(6): 611-623.
- M. Stacey, H. H. Lin, S. Gordon and A. J. McKnight (2000). "LNB-TM7, a group of seven-transmembrane proteins related to family-B G-protein-coupled receptors." Trends Biochem Sci **25**(6): 284-289.
- A. D. Steele, I. Szabo, F. Bednar and T. J. Rogers (2002). "Interactions between opioid and chemokine receptors: heterologous desensitization." Cytokine Growth Factor Rev **13**(3): 209-222.

A. Steen, T. W. Schwartz and M. M. Rosenkilde (2009). "Targeting CXCR4 in HIV cell-entry inhibition." *Mini Rev Med Chem* **9**(14): 1605-1621.

R. M. Steinman (2000). "DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells." *Cell* **100**(5): 491-494.

C. D. Strader, T. M. Fong, M. R. Tota, D. Underwood and R. A. Dixon (1994). "Structure and function of G protein-coupled receptors." *Annu Rev Biochem* **63**: 101-132.

S. Suzuki, L. F. Chuang, P. Yau, R. H. Doi and R. Y. Chuang (2002). "Interactions of opioid and chemokine receptors: oligomerization of mu, kappa, and delta with CCR5 on immune cells." *Exp Cell Res* **280**(2): 192-200.

J. Symons, S. F. van Lelyveld, A. I. Hoepelman, P. M. van Ham, D. de Jong, A. M. Wensing and M. Nijhuis (2011). "Maraviroc is able to inhibit dual-R5 viruses in a dual/mixed HIV-1-infected patient." *J Antimicrob Chemother* **66**(4): 890-895.

I. Szabo, M. A. Wetzel, N. Zhang, A. D. Steele, D. E. Kaminsky, C. Chen, L. Y. Liu-Chen, F. Bednar, E. E. Henderson, O. M. Howard, J. J. Oppenheim and T. J. Rogers (2003). "Selective inactivation of CCR5 and decreased infectivity of R5 HIV-1 strains mediated by opioid-induced heterologous desensitization." *J Leukoc Biol* **74**(6): 1074-1082.

K. Takabe, R. H. Kim, J. C. Allegood, P. Mitra, S. Ramachandran, M. Nagahashi, K. B. Harikumar, N. C. Hait, S. Milstien and S. Spiegel (2010). "Estradiol induces export of sphingosine 1-phosphate from breast cancer cells via ABCC1 and ABCG2." *J Biol Chem* **285**(14): 10477-10486.

S. Takeda, S. Kadowaki, T. Haga, H. Takaesu and S. Mitaku (2002). "Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence." *FEBS Lett* **520**(1-3): 97-101.

Q. Tan, Y. Zhu, J. Li, Z. Chen, G. W. Han, I. Kufareva, T. Li, L. Ma, G. Fenalti, J. Li, W. Zhang, X. Xie, H. Yang, H. Jiang, V. Cherezov, H. Liu, R. C. Stevens, Q. Zhao and B. Wu (2013). "Structure of the CCR5 Chemokine Receptor-HIV Entry Inhibitor Maraviroc Complex." *Science*.

K. Tashiro, H. Tada, R. Heilker, M. Shirozu, T. Nakano and T. Honjo (1993). "Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins." *Science* **261**(5121): 600-603.

S. Terrillon and M. Bouvier (2004). "Roles of G-protein-coupled receptor dimerization." *EMBO Rep* **5**(1): 30-34.

M. Tersmette, R. E. de Goede, B. J. Al, I. N. Winkel, R. A. Gruters, H. T. Cuypers, H. G. Huisman and F. Miedema (1988). "Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex." *J Virol* **62**(6): 2026-2032.

- M. Tersmette, R. A. Gruters, F. de Wolf, R. E. de Goede, J. M. Lange, P. T. Schellekens, J. Goudsmit, H. G. Huisman and F. Miedema (1989). "Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates." *J Virol* **63**(5): 2118-2125.
- S. Thangada, K. M. Khanna, V. A. Blaho, M. L. Oo, D. S. Im, C. Guo, L. Lefrancois and T. Hla (2010). "Cell-surface residence of sphingosine 1-phosphate receptor 1 on lymphocytes determines lymphocyte egress kinetics." *J Exp Med* **207**(7): 1475-1483.
- P. T. Toth, D. Ren and R. J. Miller (2004). "Regulation of CXCR4 receptor dimerization by the chemokine SDF-1alpha and the HIV-1 coat protein gp120: a fluorescence resonance energy transfer (FRET) study." *J Pharmacol Exp Ther* **310**(1): 8-17.
- C. Treand, I. du Chene, V. Bres, R. Kiernan, R. Benarous, M. Benkirane and S. Emiliani (2006). "Requirement for SWI/SNF chromatin-remodeling complex in Tat-mediated activation of the HIV-1 promoter." *EMBO J* **25**(8): 1690-1699.
- V. Trouplin, F. Salvatori, F. Cappello, V. Obry, A. Brelot, N. Heveker, M. Alizon, G. Scarlatti, F. Clavel and F. Mammano (2001). "Determination of coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 1 from patient plasma samples by using a recombinant phenotypic assay." *J Virol* **75**(1): 251-259.
- T. Ulrych, A. Bohm, A. Polzin, G. Daum, R. M. Nusing, G. Geisslinger, T. Hohlfeld, K. Schror and B. H. Rauch (2011). "Release of sphingosine-1-phosphate from human platelets is dependent on thromboxane formation." *J Thromb Haemost* **9**(4): 790-798.
- A. B. van't Wout, N. A. Kootstra, G. A. Mulder-Kampinga, N. Albrecht-van Lent, H. J. Scherpbier, J. Veenstra, K. Boer, R. A. Coutinho, F. Miedema and H. Schuitemaker (1994). "Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission." *J Clin Invest* **94**(5): 2060-2067.
- J. R. Van Brocklyn, B. Behbahani and N. H. Lee (2002). "Homodimerization and heterodimerization of S1P/EDG sphingosine-1-phosphate receptors." *Biochim Biophys Acta* **1582**(1-3): 89-93.
- L. P. Vandekerckhove, A. M. Wensing, R. Kaiser, F. Brun-Vezinet, B. Clotet, A. De Luca, S. Dressler, F. Garcia, A. M. Geretti, T. Klimkait, K. Korn, B. Masquelier, C. F. Perno, J. M. Schapiro, V. Soriano, A. Sonnerborg, A. M. Vandamme, C. Verhofstede, H. Walter, M. Zazzi, C. A. Boucher and t. European Consensus Group on clinical management of tropism (2011). "European guidelines on the clinical management of HIV-1 tropism testing." *Lancet Infect Dis* **11**(5): 394-407.
- K. Venkataraman, Y. M. Lee, J. Michaud, S. Thangada, Y. Ai, H. L. Bonkovsky, N. S. Parikh, C. Habukowich and T. Hla (2008). "Vascular endothelium as a contributor of plasma sphingosine 1-phosphate." *Circ Res* **102**(6): 669-676.
- S. Venkatesan, A. Petrovic, D. I. Van Ryk, M. Locati, D. Weissman and P. M. Murphy (2002). "Reduced cell surface expression of CCR5 in CCR5Delta 32 heterozygotes is

mediated by gene dosage, rather than by receptor sequestration." *J Biol Chem* **277**(3): 2287-2301.

A. J. Vila-Coro, M. Mellado, A. Martin de Ana, P. Lucas, G. del Real, A. C. Martinez and J. M. Rodriguez-Frade (2000). "HIV-1 infection through the CCR5 receptor is blocked by receptor dimerization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3388-3393.

B. Visentin, J. A. Vekich, B. J. Sibbald, A. L. Cavalli, K. M. Moreno, R. G. Matteo, W. A. Garland, Y. Lu, S. Yu, H. S. Hall, V. Kundra, G. B. Mills and R. A. Sabbadini (2006). "Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages." *Cancer Cell* **9**(3): 225-238.

T. Walzer, L. Chiossone, J. Chaix, A. Calver, C. Carozzo, L. Garrigue-Antar, Y. Jacques, M. Baratin, E. Tomasello and E. Vivier (2007). "Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor." *Nat Immunol* **8**(12): 1337-1344.

H. Y. Wang and C. C. Malbon (2004). "Wnt-frizzled signaling to G-protein-coupled effectors." *Cell Mol Life Sci* **61**(1): 69-75.

J. Wang and M. Norcross (2008). "Dimerization of chemokine receptors in living cells: key to receptor function and novel targets for therapy." *Drug Discov Today* **13**(13-14): 625-632.

S. G. Ward and J. Westwick (1998). "Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology." *Biochem*.

J. Weber (2001). "The pathogenesis of HIV-1 infection." *Br Med Bull* **58**: 61-72.

J. Weber, A. C. Vazquez, D. Winner, R. M. Gibson, A. M. Rhea, J. D. Rose, D. Wylie, K. Henry, A. Wright, K. King, J. Archer, E. Poveda, V. Soriano, D. L. Robertson, P. D. Olivo, E. J. Arts and M. E. Quinones-Mateu (2013). "Sensitive cell-based assay for determination of human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism." *J Clin Microbiol* **51**(5): 1517-1527.

S. P. Welch, L. J. Sim-Selley and D. E. Selley (2012). "Sphingosine-1-phosphate receptors as emerging targets for treatment of pain." *Biochem Pharmacol* **84**(12): 1551-1562.

J. Wess (1997). "G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition." *FASEB J* **11**(5): 346-354.

N. Wettschureck and S. Offermanns (2005). "Mammalian G proteins and their cell type specific functions." *Physiol Rev* **85**(4): 1159-1204.

E. J. Whalen, S. Rajagopal and R. J. Lefkowitz (2011). "Therapeutic potential of beta-arrestin- and G protein-biased agonists." *Trends Mol Med* **17**(3): 126-139.

J. M. Whitcomb, W. Huang, S. Fransen, K. Limoli, J. Toma, T. Wrin, C. Chappay, L. D. Kiss, E. E. Paxinos and C. J. Petropoulos (2007). "Development and characterization of

a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism." Antimicrob Agents Chemother **51**(2): 566-575.

C. B. Wilen, J. C. Tilton and R. W. Doms (2012). "HIV: Cell Binding and Entry." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(8).

S. Wilson, G. Wilkinson and G. Milligan (2005). "The CXCR1 and CXCR2 receptors form constitutive homo- and heterodimers selectively and with equal apparent affinities." J Biol Chem **280**(31): 28663-28674.

R. T. Windh, M. J. Lee, T. Hla, S. An, A. J. Barr and D. R. Manning (1999). "Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G proteins." J Biol Chem **274**(39): 27351-27358.

R. Winklbauer, A. Medina, R. K. Swain and H. Steinbeisser (2001). "Frizzled-7 signalling controls tissue separation during *Xenopus* gastrulation." Nature **413**(6858): 856-860.

L. Wu, G. LaRosa, N. Kassam, C. J. Gordon, H. Heath, N. Ruffing, H. Chen, J. Humblias, M. Samson, M. Parmentier, J. P. Moore and C. R. Mackay (1997). "Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding." J Exp Med **186**(8): 1373-1381.

L. Wu, W. A. Paxton, N. Kassam, N. Ruffing, J. B. Rottman, N. Sullivan, H. Choe, J. Sodroski, W. Newman, R. A. Koup and C. R. Mackay (1997). "CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, *in vitro*." J Exp Med **185**(9): 1681-1691.

R. Wyatt and J. Sodroski (1998). "The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens." Science **280**(5371): 1884-1888.

J. Xu, J. He, A. M. Castleberry, S. Balasubramanian, A. G. Lau and R. A. Hall (2003). "Heterodimerization of alpha 2A- and beta 1-adrenergic receptors." J Biol Chem **278**(12): 10770-10777.

T. P. Xu, H. Shen, L. X. Liu and Y. Q. Shu (2013). "The impact of chemokine receptor CXCR4 on breast cancer prognosis: A meta-analysis." Cancer Epidemiol.

L. Yang, Y. Yatomi, Y. Miura, K. Satoh and Y. Ozaki (1999). "Metabolism and functional effects of sphingolipids in blood cells." Br J Haematol **107**(2): 282-293.

O. Yoshie, T. Imai and H. Nomiyama (2001). "Chemokines in immunity." Adv Immunol **78**: 57-110.

A. Zaslavsky, L. S. Singh, H. Tan, H. Ding, Z. Liang and Y. Xu (2006). "Homo- and hetero-dimerization of LPA/S1P receptors, OGR1 and GPR4." Biochim Biophys Acta **1761**(10): 1200-1212.

G. Zhang, J. J. Contos, J. A. Weiner, N. Fukushima and J. Chun (1999). "Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate." *Gene* **227**(1): 89-99.

G. Zhang, L. Yang, G. S. Kim, K. Ryan, S. Lu, R. K. O'Donnell, K. Spokes, N. Shapiro, W. C. Aird, M. J. Kluk, K. Yano and T. Sanchez (2013). "Critical role of sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1PR2) in acute vascular inflammation." *Blood*.

N. Zhang, D. Yang, H. Dong, Q. Chen, D. I. Dimitrova, T. J. Rogers, M. Sitkovsky and J. J. Oppenheim (2006). "Adenosine A2a receptors induce heterologous desensitization of chemokine receptors." *Blood* **108**(1): 38-44.

Y. Zhang, L. Tian, Y. Zheng, H. Qi, C. Guo, Q. Sun, E. Xu, Y. Zhang, D. Ma and Y. Wang (2011). "C-terminal peptides of chemokine-like factor 1 signal through chemokine receptor CCR4 to cross-desensitize the CXCR4." *Biochem Biophys Res Commun* **409**(2): 356-361.

Z. Y. Zhang, Z. Zhang, C. Zug, B. Nuesslein-Hildesheim, D. Leppert and H. J. Schluesener (2009). "AUY954, a selective S1P(1) modulator, prevents experimental autoimmune neuritis." *J Neuroimmunol* **216**(1-2): 59-65.

H. Zheng, H. H. Loh and P. Y. Law (2010). "Agonist-selective signaling of G protein-coupled receptor: mechanisms and implications." *IUBMB Life* **62**(2): 112-119.

P. Zhu, J. Liu, J. Bess, Jr., E. Chertova, J. D. Lifson, H. Grise, G. A. Ofek, K. A. Taylor and K. H. Roux (2006). "Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes." *Nature* **441**(7095): 847-852.

T. Zhu, N. Wang, A. Carr, D. S. Nam, R. Moor-Jankowski, D. A. Cooper and D. D. Ho (1996). "Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in blood and genital secretions: evidence for viral compartmentalization and selection during sexual transmission." *J Virol* **70**(5): 3098-3107.

Y. R. Zou, A. H. Kottmann, M. Kuroda, I. Taniuchi and D. R. Littman (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." *Nature* **393**(6685): 595-599.

Annexes

Annexe 1

ADN génomique de CXCR4 :

(A) Régions codantes et non codantes de CXCR4-A

(B) Régions codantes et non codantes de CXCR4-B

(A) Régions codantes et non codantes de CXCR4-A²⁴ :

```

Prev Page  Next Page  CXCR4/NM_001008540.1/NP_001008540.1  Flip Strands  Annotated
-13687633 | CAGAAATTATGCAAATCTAUCCTTCTTCTGAAAGTATCTCTAATATCTGCACTGACCCTAGTGTATGCTGTGAATGTGCAAGTATAGCTACATCTCC
-13687623 | GAAGGAAGGATCTTTACTCCCTTTTACTCCTCGAATGGGCTGGCTCTGCTGAAAGCCGCGGGAATGGCGTTGGAAGCTTGGCCCTACTTCCAGCATTGCCG
-13687613 | CCTACTGGTTGGGTACTCCAGCAAGTCACTCCCTTCCCTGGGCCTCAGTGTCTACTGTAGCATTCOCAGGTCTGGAATCCCATCCACTTTAGCAAG
-13687603 | GATGGACGCCCCAGAGAGACCGCTTCCAGCCCGCCTTCCACCTGTCTTCAAGGCGATCCCGCTTCCCTCAAACCTAGGAAATGCCCTCTGGGAGGT
-13687593 | CCTGTCCGGCTCCGGACTCACTACCGACCACCCGCAACAGCAGGCTCCCTGGGCTTCCCAAGCCGCGCACCTCTCCGCCCCCGCCCTGGCCCTCCTT
-13687583 | CCTCGGCTCTGCCCTTCCGCCACCCGCTTCTCCCTCCCGCCCGCAGCGGCGCATGGCCCGGCTCGGAGGCTGTTTTATAAAAGTCCGCGCCGGG
-13687573 | CCAGAACTTCAGTCTGTTGGCTGGCGCAGGAGTACCAAGTACGCCGAGCGGCTGAGTGTCCAGTACCCACCCCATCTGGAGAACCAGCGGTTACC
-13687563 | ATGGAGGGGATCAGTGTAACTCCAGTTTCAACCTGCTTTGTCAATAATGTACAACCGTTGAACCTAGAGCCGAGCCCTCTCCGAGCCGGGCAAGCGG
-13687553 | CCAGGACATTCGAGGATCCCGTACTCAAATAAAGGCTCAACCAAGGAGTTTCTTGAACATGTCTTCAAGGCGGATATATACTGCCGCTGGTGGGGGGGAGCAGGAT
-13687543 | CGAATCTTTTCTCTGTGAGTCCAGAGAGAAGCACTGGAAGAGCGTTCCAGTGGCTGCATGTCTCCCTTGTAGTCCCGCCGCGCGCCGCTGTGC
-13687533 | ACCTGTTTGCACAACGTAAGAACATCTGTGCACAAGTGCAGAGAAGCGCTGCGCGCTGCCCTGGGACTCAGACCACCGGCTCTCTCCCTGGGAAGCGG
-13687523 | GGATGCTTGGAGCGGATACATTGTCTGAATTTAGAGGCGGAGGGCGCGCTGCCCTGGGCTGAGTTCAGGAGGAGATTGCGCCCGCTTTAACTTCGGG
-13687513 | GTTAAAGCCCTCGTACTGTCTTGTACACTGGTGCCTGTGTTTAAACTCTGTGCGCCGACCGGAGCTCTCCAGCACAGTAGCCAGAGGG
-13687503 | CGGAGAGGCGGGTGGACCCACCGCCGATCTCTGAGGCGGTCAGTGTGCGCAGCAGTAGGAGTTGATCCGCCCGCGCTTGGGTTTGAGGGG
-13687493 | AAAACCTTCCCGGCTCGAAGCGGCTCTTCCCACCGCCGAGTGGGTCTGCAAGTTCGAGAGTTCGGCTGCTGCAGAGGTCAGCGGCTGAGGTTT
-13687483 | GACCTCCCTTTGACACCGCCGAGCTGCCAGCCTGAGATTTGGCTCCGCGGATAGGAGCGGTACGGGGTGGGGGGGGGGCGGTTAAAGCCCGCAC
-13687473 | TGGGCTGCCAGGTCCCGCCCGCAAGACTGCCAGGTGCAAGTGGCGAAAACCGTTTGGCTCTCTCCGAGTCCAGTTGTGATGTTTAAACCGTCCGGTGTTC
-13687463 | CAGAAACCTTTTGAACCTCTTGTAGGAGTGTGGTTTCTTCCAGCGGCGCGCAATCAAAAGACGCTCGCGCGGAGCCCGCCAGTCCCTCCCGAG
-13687453 | CACCCGTGGGACAGAGCTTGGCTGTCGCCAGCGGAGCCCTGCAGCGTGTGTTGGGGCGGTTCGGTGGGTGTAGTGGGCAGCCGGCGCCCGCCGG
-13687443 | GGCTGGACGCCGGCCCGCCCGGCTGCCACCGGCTGGAGGCTTCCAGTTCGCCACTCCCGCCGGGTTAACTGGATCAGTGGCGGGCTAATGGGAAGCC
-13687433 | ACCCGGAGAGTGAGGAATGAACTTGGGCGGAGGACCCAGGTCAGAGCCCGGTTACCTTCTCCAGCAGGAAAATGCCCGGCTCCCTAAGCTCCCAA
-13687423 | ACGCCGAAGTGATAAACCAGGAGTGCCAAAGCACACACCCGAGGAGCCCGCCCTGCGGGAGGAGGTGCCCTTTGTTCATTTTCTCAGCTCC
-13687413 | GCCAATATACCCCAAGCCGAAGGCGCTTGCCTTTAAGACCGCATCTTCTTACCCACTACAAAGTTCCTTGAAGTGGCTTGAAGTGGTGTATTTAGGCA
-13687403 | CGCGTGGGAAAATTAAGTTTTTGGCGTTTAGGAGAATGAGTCTTGTCAACGCCCGCCCGCTCCCGCGTATCCTCCCTCTCCCTCCCTGG
-13687393 | GCGAAAACCTTCTTACAAAAGTTAATCACTGCCCTCCTAGCAGCACCACCCACCCCGCCCGGCTGGGAGTGGCCTCTTGTGTGTATTTTTT
-13687383 | TTTCCCTAAAGGAGTTTTTTTTCTTCCCTCTAGTGGGCGGGCAGAGGAGTAGCCAAGATGTGACTTTGAACCCTCAGCGTCCAGTGGCCCTTT
-13687373 | GTTCTAAAGAAAGATTTGTAAATGGTTCTACAAAGAAGGATATAATGAAGTCACTATGGGAAAAGATGGGGAGGAGAGTGTAGGATTCTACATTA
-13687363 | TTCTCTTGCGCCCTTAGCCCACTTCCAGAATTTCTGAAGAAAGCCTGAATGGTTTTTAAATGCCTTTAAAAATTTTTTTAACTGGGTTAA
-13687353 | TCGTCTGTGAATGGAAAGTGCATCTCCCTTTCCCTTTTTCGAGATATACACTCAGATACTACAGGAAATGGGCTCAGGGGATGTA
-13687343 | CCATGAAGGAACCCCTGTTCCTGAAGAAAATTAATTTCAATAAATCTTCTGCCACCATCTACTCCATCATCTTTCACTGGCATTTGTGGCAA
-13687333 | TGGATGGCTCATCTCGTATGGGTACCAGAAGAACTGAGAAGCATGACCGCAAGTACAGGCTGCACCTGTCACTGGCCGACCTCCCTTTGTGTCATC
-13687323 | ACCTTCCCTCTCGGCGAGTGTATGCCGTGCCAAACTGGTACTTTGGGAATTCCTAAGCAAGGCAGTCCATGTCACTACAGACTCAACTCTACAGCA
-13687313 | GTGTCCTCACTCGCCCTTCACTAGTCTGGACCGCTACCTGGCCATCTGTCCAGCCACCAACAGTCAAGGCCAAGGAAGCTGTGGCTGAAAAGGTTGGI
-13687303 | CTATGTTGGGCTTGGATCCCTGCCCTCCTGACTATTCCCGACTTCTATTGTTGCCAAGCCTCAGTGAGGCAGATGACAGATATATCTGTGACCCGCTT
-13687293 | TACCCCAATGACTTGTGGGTGGTGGTTCCAGTTCTAGCACATCATGGITGGCCCTATCCGCTGGTATTGCATCCCTGCTCTGCTTGCATATCA
-13687283 | TCTCCAAAGCTGTACACTCCAAAGGCCACCAAGCGCAAGCCCTCAAGACCAGTCACTCCTCATCCTGGCTTCTTCCCTGTTGGCTGCCCTACTA
-13687273 | ISKLSHSHSGKHGQKRKALGKLTFTVILILILAFACWLPYI
-13687263 | CTAGCTTTCTCCACTGTTGTCTGAACCCCATCCTCTATTCTTCCCTGGAGCCAAATTTAAABACCTCTGCCAGCACGCACTCACTCTGTGACAGAG
-13687253 | GGTCCAGCCCAAGATCTCTCCAAAGGAAGCGAGTGCATTCTGTTTCCACTGAGTCTGAGTCTTCAAGTTTCTACTCCAGCTAACACAGATG
-13687243 | TAAAAGACTTTTTTATACGATAAATAACTTTTTTAAAGTACACATTTTCAGATATAAAGACTGACCAATATTGTACAGTTTTTATTGCTGTGTG
-13687233 | GATTTTTGTCTGTGTTCTTTAGTTTTTGTGAAGTTAAATTGACTTATTTATAAATAATTTTTTTGTTTTCATATGATGTGTCTAGGCAGGACCTGT
-13687223 | GGCAAGTTCTTAGTGTCTGTATGTTCTGTTGGTAGGACTGTAGAAAAGGAACTGAACATTCAGAGCGGTGATGATCAGTAAAGCTAGAATGATC
-13687213 | CCCAGCTGTTTATGCATAGATAATCTCCATTCCCGTGGAAAGTTTTTCTGTCTTAAAGCGTGATTTGCTGTAGAAGATGCCACTTATAACCAAG
-13687203 | CCCAAAAGTGGTATAGAAATGCTGGTTTTTCAAGTTTTCAAGAGTGGGTGATTTTCAAGCCTACAGTGACAGTCTTGTATTAAAGTTGTTAATAAAGTAC
-13687193 | ATGTTAAACTTACTTAGTGTATGTTCTGATTTCTGTTGACATCTTTTGGCTAGTAGAAGCAAAAAGTAAATACATTTATGGTATCAAAGCACTATCCT
-13687183 | ACGTATTTCAATTAATATTTTACTTACCCTTATCAACACTGTATAGATTCTGCTTCTGTACTAATTACATTTTATAGAAGAGGAAACCGAGGCCA
-13687173 | GAAAGCCTAAGTAACTTGGTTAAAGGCAATGTAGTAAATCAATCCTGATTTTAAACAGGTAACATGACTTAAAGAACTGAAAGCTTCCACCATT
-13687163 | AAATCAAATGGAAGTTTAAAGTGGCCAGCCAGCATTGTTATGAAGGTCATCTTTCAGAGGATAAGCATGTATAAAGAGAAAGGATGCGAGT
-13687153 | CGTGTGGAATTTTACTCCACCATCCACTTGTGAAACCAGGCTGTGCAATGCCAGACGGTGTGCTTCCCTCATCCAGTATCCTCAGGTAGATAAC
-13687143 |

```

- ATCG** : Intron épissé
- ATCG** : Région codante
- ATCG** : Région non codante

²⁴ Séquence PubMed NP_001008540.1.

(B) Régions codantes et non codantes de CXCR4-B²⁵ :

Prev Page	Next Page	CXCR4/NM_003467.2/NP_003458.1	Flip Strands	Annotated	Go To P
-13687662	1	CTTGTCTGGTTCACGCTGGATCCCAACGCCCTAGAACAGTCCGTGGCAGCAGTTCCTCTCTATAAATATCGGACTAAATGCATCTCTGTGATGGTAA			
-13687652	1	TACCCACACGGTGTGTGAGAAATGAATGAGTGATTCTGTGCAAGTTCCTAGTGTATCTGTACAAAAAGTACTGGTCCGTAATTTACTCTTATAATAAAGC			
-13687642	1	ATACTTTTAGGATAATAAAGCACTATTCCGGCAATTGGTTACCCTATTATGAAATTAAGTACTGAGCAATACATATCTACATCTGATCAGTCTCCAGAAATTATG			
-13687632	1	CCAATCTACCTTCTCTGAAAGTATCTCCTAATTTATCTGCACCTGACCTTAGTGTGATGTGAATGTGCAAGTATAGCTACATCTCCGGAAGGAAGGA			
-13687622	1	TCCTTACTCCCTTTTACCTCCTGAATGGCTCCGTCTCTGAAAGCCGGGGAATGGCGTTGGAAGCTTGGCCCTACTTCCAGCATTTCCCGCCTACTGGTT			
-13687612	1	GGGTACTCCAGCAAGTCACTCCCTTCCCTGGGGCTCAAGTGTCTCTACTGTAGCATTCACAGGCTCGGAATTCOCATCCACTTTAGCAAGGATGGACGGC			
-13687602	1	CCACAGAGAGACGGCTTCCCTAGCCCGCGCTTCCCACTGTCTTCAGGGCCTCCCGCTTCCCTCAAACCTTAGGAAATGCCCTGGGAGGTCCTGTCCGGC			
-13687592	1	TCCGGACTCACTACCAGACCACCGCAAACAGCAGGGTCCCTGGGCTCCCAAGCCGGCAGCTCTCCGGCCCGCCCTGCCCTTCTCTCCGTCT			
-13687582	1	GCCCTCTCCCCACCCCGCTTCTCCCTCCCGCCAGCGGGCATGCCCGCGCTCGGAGCGTGTTTTATAAAGTCCGGCCGGCCAGAAAGCTT			
-13687572	1	CAGTTTGTGGCTCGGGCAGCAGGTAGCAAAGTGACCCGAGGGCTGAGTGTCTCCAGTAGCCACCGCATCTGGAGAACCAGCGGTTACCATGGAGGGGA			
-13687562	1	TCAGT GTAAAGTCCAGTTTCAACCTGCTTTGTGCATAAATGTACAAACGTTTGAACCTAGAGCCGAGCCCTCTCCGAGCGGGCAGAAGCGCCAGGACATT		M E G	
		I S			
-13687552	1	GGAGGTACCCGTACTCCAAAAAAGGGTCCACGAAAGGAGTTTTCTTGACCATGCCTATATAGTCCGGGTGGTGGGGGGGAGCAGGATTGGAATCTTTT			
-13687542	1	TCCTCTGTGAGTCGAGGAGAAACGACTGGAAAGAGCGTTCACAGTGGCTGCATGTGTCTCCCTTGGTTCGCCCGCCGGCCGGCTGGACCGCTGTTTG			
-13687532	1	CAAACCTAAGAACATTCTGTCACAAAGTGCAGAGAAGCGCTGCGCCCTGCCTCGGACTCAGACCACCGGCTCTTCCCTTGGGAAGCGGGGATGTCTTG			
-13687522	1	GACCGAGTTACATTGCTGTAATTTAGAGCCGGAGGGCCGGCTGCCCTGGGCTGAGTTCACAGGAGGATTTGCCCGCCCTTAACTTCGGGGTTAAGCCCC			
-13687512	1	GGTGACTGTCTTGACACTGGTGCCTTTGTTAACTCTGTGCGCCAGCGAGCTGTCCAGTCTCCAGCAGTAGGCAAGGCGGGAGAGCC			
-13687502	1	GGGTGACCCACCGCTCCCTCTGAGGGATCGAGTGGTGGCAGCAGTAGGAGTTGATGCCCGCCGGCTTTGGGTTTGGGGGAAAAACTTCC			
-13687492	1	CGCCGTCGAAAGCGCCCTCTTCCCAACGGCCGGAGTGGGTCCTGCAGTTCGAGAGTTTGGGTCGTGCAGAGGTACAGCGAGTGGTTTGACCTCCCT			
-13687482	1	TTGACACCGCCAGCTGCCACCCCTGAGATTTGGCTCCGGGATAGGAGCGGTTACGGGTTGAGGGGGGGGGGGGTTAAGACCCAGCTGGCTGCCA			
-13687472	1	GGTCGCCCGCCGAAGACTGGCAGGTCCAAGTGGGAAACCGTTTGCTCTCTCCGAGTCCAGTTGTGATGTTTAAACCGTCCGTGGTTTCCAGAACCTT			
-13687462	1	TTGAAACCTCTGTCTAGGGAGTTTTGGTTTCCCTGCAGCCGGCCCAATCAAAGACGCTCGCGGGGAGCCCGCCAGTCCCTCCACAGCACCTGTGG			
-13687452	1	GACAGACCTGGCGTGTCCGCCAGCGGACCCCTGCAGCGCTGCTTGGCGCGGTTGGCGTGGTGTAGTGGGACGCGCGCCGGCCGGGGCTGGAGCGA			
-13687442	1	CCCGCCCGCCCGCTGCCACCCCTGGAGCTTCCAGCTGCCACCTCCGGCCGGGTTAACTGGATCAGTGGGGGGTAAATGGGAAGCCACCGGGGAGA			
-13687432	1	GTGAGAAATCAAACTTGGGGCAGGACCCAGCGGTTACCTTCTCCACCCAGGAAATGCCCGCTCCCTAACGTCCTCAACGCCCAAGCGCCAAAG			
-13687422	1	TCATAAACACGAGGATGGCAAGAGCCACACACCCGAGGAGCCCGCTTGGGGGAGGAGTCCGCTTTGTTCACTTTCTGCACACTCCGCCCAATATA			
-13687412	1	CCCCAACCGCAAGGGGCTCTGTTTAAAGACCGCATTCCTTTACCACTACAAGTGTCTGAAAGCCCAAGATGGTTGTATTTAGGCAAGGGTGGGAA			
-13687402	1	AAATTAAGTTTTGGCGTTTTAGGAGAATGAGTCTTTGCAACGCCCGCCCGCTCCCGCTGATCTCCCTCTCCCTCTCCCTGGCCGAAAACT			
-13687392	1	TCCTACAAAAAATTAATCACTGCCCTCTAGCAGCACCACCCACCCCAACCGCCCTGGGAGTGGCTCTTTGGTGTATTTTTTTTCTCCCTATA			
-13687382	1	AGGAAGTTTTTTTTTCTCCCTCTAGTGGCGGGCAGAGGAGTTAGCCAAAGTGTGACTTTGAAACCTCAGCGCTCAGTGGCCCTTTTTGTTTAAACA			
-13687372	1	AAAGATTTTTGTAATTTGGTTCTACCAAAGAAGGATATAATGAAGTCACTTGGGAAAGATGGGAGGAGATGTAGGATTCTACATTAATTTCTCTGTG			
-13687362	1	CCCTAGCCCACTACTTCCAGAAATTTCCCTGAAAGAAGCAGCCCTGAAATGGTTTTTAAATTCCTTTAAATAATTTTTTAACTGGGTAAATGCTGTGGA			
-13687352	1	ATTGGAAGTGAATGCCATTTCTTTGCCCTTTTGGCAGATACACTTCCAGATAAATGAGTCCAGGAGAAATGGGCTCAGGGGATGACTCCATCCATGGAAGA			
		I Y T S D N Y T E E M G S G D Y D S M K E			
-13687342	1	ACCCGTTTCCGTTGAAGAAATGCTAATTTCAATAAATCTTCCCTGCCACCTACTTCCATCATCTTCTTA ACTGGCATTTGGGGCAATGGATTGGTC			
		P C F R E E N A N F N K I F L P T I Y S I I F L T G I V G N L V			
-13687332	1	ATCCTGGTCATGGGTTACCAAGAAAATGAGAAGCATGACCGCAAGTACAGGCTGCACCTGTGAGTGGCCGAGCTCCTCTTTGTCATCAGCTCCCTCCCT			
		I L V M G Y Q K K L R S M T D K Y R L H L S V A D L L F V I T L P			
-13687322	1	TCGGGCAGTTGATGCCGTGGCAACTGGTACTTTGGGACTTCCATGCAAGGCAGTCCATGTCATCTACACAGTCAACCTCTACAGCAGTGTCTCAT			
		F W A V D A V A N W Y P G N F L C K A V H V I Y T V N L Y S S V L I			
-13687312	1	CCTGGCCTTCAAGTCTGGACCGCTACCTGGCCATCGTCCAGCCACCAAGTCAAGGCAAGGAGTGGTGGCTGAAAAGGTTGCTATGTTGGC			
		L A F I S L D R Y L A I V H A T N S Q R P R K L L A E K V V Y V G			
-13687302	1	GTCTGGATCCCTGCCCTGCTGACTATTCCCGACTTCCATCTTTGCCAAGCTTCCAGTGGGCGAGTGCAGATATATCTGTGACCGCTTCCACCCCATG			
		V W I P A L L L L T I P D F I F A N V S E A D D R Y I C D R F Y P N			
-13687292	1	ACTTGTGGGTTGGTTGGTTCCAGTTTCAGCACATGATGGTTGGCTTATCTGGCTTATCTGGCTATTGTGATCTCTGTCCCTGCTATTGCAATATCATCTCCAAGCT			
		D L W V V V F Q H I M V G L I L P G I V I L S C Y C I I I S K L			
-13687282	1	GTCCACTCCAAAGGGCCACGAAAGCGCCCTCAAGACCACAGTCACTCTCATCTGCTTTCTTCCCTGTGGCTGCCCTACTACATTTGGGATC			
		S H S K G H Q K R K A L K T T V I L I L A F F A C W L P F Y Y I G I			
-13687272	1	AGCATCGACTCTTCCATCTCTGGAAATCATCAAGCAAGGGTGTGAGTTTGGAAACTGTGCACAAAGTGGATTCCCATCCACCGAGCCCTAGCTTTCT			
		S I D S F I L L E I I K Q G C E F E N T V H K W I S I T E A L A F			
-13687262	1	TCCAGTGTGTCTGAACCCCTCTCTATGCTTTCTTGGGCAAAATTTAAACCTTCCAGCAGCAGCACTACCCTGTGAGCAGAGGGTCCAGCCT			
		F H C C L N P I L Y A F L G A K F K T S A Q H A L T S V S R G S S L			
-13687252	1	CAAGATCTCTCCAAAGGAAGCGAGTGGACATCTGTTCCACTGAGTCTGAGTCTCAAGTTTTCACTCCAGCTAACACAGATGTAAGAAGACTT			
		K I L S K G K R G G H S S V S T E S E S S S F H S S			
-13687242	1	TTTTTATACGATAAATAACTTTTTTAAAGTTACACATTTTTTCAGATATAAAGACTGACCAATATGTACAGTTTTTATGCTTGTGGATTTTTGTC			
-13687232	1	TTGTGTTCTTTAGTTTTTGTGAAGTTTTAATGACTTATTTATATAAATTTTTTGTTCATATGATGTGTCTAGGCAGGACCTGTGGCCAAGTTC			
-13687222	1	TTAGTGTCTGTATGCTCGTGGTAGGACTGTAGAAAAGGAACTGAACATTCACAGAGCGTGTAGTGAATCACGTAAGCTAGAAAATGATCCCGAGCTGTT			
-13687212	1	TATGCATAGATAAATCTCCATTCCTGGAAACGTTTTTCCCTGTTCTTAAGACGATGTTTTCTGTAGAAAGTGGCACTTATAACCAAGCCCAAGTGG			
-13687202	1	TATAGAAATGCTGGTTTTTTCAGTTTTTCAGGAGTGGGTTGATTTTCAGCACCTACAGTGTACAGTCTTGTATTAAAGTTGTTAAATAAAGTACATGTTAACT			
-13687192	1	TACTTAGTGTATGTTCTGATTTCTGTTGACATCTTTTGGCTAGTAGAAGCAAAAATTAACATTTATGGTATGCAAGACACTCCTAGGATTTTCA			
-13687182	1	TTGTAATATTTTACTTACCCTTTATCAACACTGTATGATTTCTGTTACTAATTTACATTTTATAGAAAGCAAGCCAGCCACAAAGCTTAA			
-13687172	1	GTAACTTGGTTAAAGCCTGTAGTAAGTATCAAACTCCGTATTTTTAAACAGGTAACATGACTTAAACGAATCGAAGGCTTACCACCTTAAATTCAAAT			

ATCG : Intron épissé

ATCG : Région codante

ATCG : Région non codante

²⁵ Séquence PubMed NP_003458.1.

Annexe 2

« The two human CXCR4 isoforms display different HIV receptor activities: consequences for the emergence of X4 strains ». C Duquenne, C Psomas, S Gimenez, Mj Carles, C Barbuat, Jp Lavigne, A Sotto, J Reynes, P Guglielmi, C Mettling, V François, P Corbeau.

Classification : Biological Sciences, Medical Sciences

The two human CXCR4 isoforms display different HIV receptor activities: consequences for the emergence of X4 strains

Charline DUQUENNE^a, Christina PSOMAS^{b,c}, Sandrine GIMENEZ^a, Marie-Josée CARLES^d, Claudine BARBUAT^e, Jean-Philippe LAVIGNE^{d,f,g}, Albert SOTTO^{e,f,g}, Jacques REYNES^{b,c,f}, Paul GUGLIELMI^h, Clément METTLING^a, Vincent FRANÇOIS^{a,1}, Pierre CORBEAU^{a,f,i,1}

^aInstitute for Human Genetics, CNRS UPR1142, 141 rue de la Cardonille, 34396 Montpellier cedex 5, France,

^bInfectious Diseases Department, University Hospital, 80 avenue A. Fliche, 34295 Montpellier cedex 5, France,

^cUMI 233, IRD-Montpellier I University, 911 avenue Agropolis, 34294 Montpellier cedex 5, France,

^dMicrobiology Department, University Hospital, Place du Pr Debré, 30029 Nîmes cedex, France, ^eInfectious

Diseases Department, University Hospital, Place du Pr Debré, 30029 Nîmes cedex, France, ^fMontpellier I

University, 5 Boulevard Henri IV, 34967 Montpellier cedex 2, France, ^gINSERM U1047, Place du Pr Debré,

30029 Nîmes cedex, France, ^hUMR 5235, CNRS-Montpellier II University, Place Eugène Bataillon 34095

Montpellier, France, ⁱImmunology Department, University Hospital, Place du Pr Debré, 30029 Nîmes cedex,

France

Authors contributions: CD performed research and analyzed data; SG and MJC performed research; CP, CB, JPL, AS, JR, PG, and CM contributed analytical tools; VF analyzed data; PC designed research, analyzed data, and wrote the paper.

Corresponding author : Pierre Corbeau, Institute for Human Genetics, CNRS UPR1142, 141 rue de la Cardonille, 34396 Montpellier cedex 5, France, tel : +33 434 359 932, fax: +33 434 359 901, e-mail address: pcorbeau@igh.cnrs.fr

Short title: CXCR4 isoforms and HIV-1 R5 to X4 switch

Keywords : HIV coreceptor, R5 to X4 switch, chemokine receptor, gene therapy Footnotes : ¹VF and PC contributed equally to this study

Abstract

CXCR4 is a chemokine receptor that plays key roles with its specific ligand, CXCL12, in stem cell homing and immune trafficking. It is also used as a coreceptor by some HIV-1 strains (X4 strains), whereas other strains (R5 strains) use an alternative coreceptor, CCR5. X4 strains mainly emerge at late stages of the infection and are linked to disease progression. Two isoforms of this coreceptor have been described in humans, CXCR4-A and CXCR4-B, corresponding to an unspliced and a spliced mRNA, respectively. Here, we show that CXCR4-B, but not CXCR4-A, mediates an efficient HIV-1 X4 entry and productive infection. Yet, the chemotactic activity of CXCL12 on both isoforms was similar. HIV-R5 infection favored CXCR4-B expression over that of CXCR4-A. Actually, *in vitro* infection with an R5 strain increased CXCR4-B / CXCR4-A mRNA ratio in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), and in R5-infected individuals this ratio correlated with HIV RNA plasma level. Moreover, CXCR4-B favored R5 to X4 switch more efficiently than CXCR4-A *in vitro*, and *in vivo* the capability of circulating HIV-1 strains to use CXCR4 was linked to the predominance of CXCR4-B over CXCR4-A expression in PBMC. Finally, we achieved a specific siRNA-mediated knock down of CXCR4-B, as a proof of concept for a gene therapeutic approach aiming at blocking the HIV coreceptor activity of CXCR4 without blocking its chemokine activity.

Introduction

The chemokine receptor CXCR4 is vital for embryonic development, and plays key roles in myelopoiesis, homeostasis, maintenance of the immune system, and cancer progression (1). Mutations in CXCR4 that increase its responsiveness to the chemokine ligand CXCL12 results in an immunodeficiency called WHIM (warts, hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis) syndrome (2). One consequence of increased agonist-induced CXCR4 signaling in this syndrome is an impaired egress of leukocytes, particularly neutrophils, from the bone marrow, causing neutropenia and possibly leukopenia.

Besides the chemokine receptor CCR5, used by Human Immunodeficiency type 1 (HIV-1) R5 strains, CXCR4 is used by the so-called HIV-1 R5X4 (CCR5- and CXCR4-using) and X4 (CXCR4-using) strains, in addition to the main receptor CD4 (3). In the early stages of the disease, HIV-1 R5 strains are mainly found, and the proportion of CXCR4-using strains increases with the duration of the infection (4). Of note, the emergence of CXCR4-using strains has been correlated with an increase in disease progression (3). One factor that could favor this R5 to X4 switch is the increase in CD4⁺ T cell CXCR4 surface density observed in about one-third of HIV-1-infected individuals with a CD4 count below 400 cells per microliter (5). Actually, *in vitro*, CXCR4 overexpression at the surface of HIV-1 R5-infected cells facilitates the emergence of CXCR4-using HIV-1 strains (6, 7). Moreover, patients with a high CD4⁺ T cell CXCR4 surface density harbor more frequently (R5)X4 strains than patients with physiological levels of CXCR4 expression (5). CXCR4 overexpression observed in advanced disease could be partly mediated by IL-7 which is overproduced as a consequence of CD4⁺ T cell lymphopenia (6, 8).

While CCR5 antagonists have been successfully developed as anti-HIV drugs (9), the long-term use of CXCR4 antagonists is limited by the physiological roles played by CXCR4 (10).

CCR5 and CXCR4 antagonists usually inhibit the binding of their natural ligands to CCR5 and CXCR4, but the role of CCR5 is dispensable, whereas the role of CXCR4 is not on the long term.

Two isoforms of CXCR4 have been described in Humans that are coexpressed in peripheral blood mononuclear cells (11). The main isoform, CXCR4-B, is coded by a spliced mRNA (Fig.1). The long variant (CXCR4-A) is coded by an unspliced mRNA containing a distinct 5'UTR and a coding region initiated from an alternative start codon (Fig.1). The CXCR4-A

receptor has a longer NH₂-terminal extremity (N-term) and is different from the CXCR4-B receptor by the first 9 amino acid residues (Fig. 1).

As CXCR4 N-term has been shown by some authors to be involved in HIV-1 X4 envelope binding (12-14), we examined the capacity of the A isoform to support HIV-1 infection.

Results

CXCR4-A is less efficient than CXCR4-B as an HIV-1 coreceptor

In order to study the characteristics of the two isoforms of CXCR4, we cloned the cDNA corresponding to each isoform in an HIV-1 vector, and transduced CD4+CCR5+ HOS cells. We thus obtained two cell lines, HOS-CXCR4-A and HOS-CXCR4-B that expressed the same cell surface density in each isoform (mean fluorescence intensity of 20 and 24, respectively, Fig. 2A-C). Thereafter, we evaluated the capacity of both isoforms to enable HIV-1 infection. With the aim of comparing one-round X4 infection in the two cell lines, we first exposed them to HIV-1 virions harboring a genome with a deletion in the *env* gene, a *luciferase* gene fused to the *nef* gene, and pseudotyped with an X4 envelope. Figure 2D shows that after a single cycle, HIV-1 expression, as quantified by luciferase activity, was higher in HOS-CXCR4-B cells than in HOS-CXCR4-A cells. This difference in productivity was not due to a difference in cell proliferation or in cell viability, since these two parameters were similar for the two cell lines (data not shown). When we performed the same experiment with virions pseudotyped with an HIV-1 R5 envelope (Fig. 2E) or the G protein of the vesicular stomatitis virus (Fig. 2F) instead of an HIV-1 X4 envelope, no difference in viral production was observed between the two cell lines. This difference was even more obvious when we exposed the two cell lines to the replicative CXCR4-using strain NL4.3 (Fig. 2G). By contrast, a wild-type R5 strain replicated as efficiently in HOS-CXCR4-B cells as in HOS-CXCR4-A cells (Fig. 2H).

CXCR4-A is as efficient as CXCR4-B as a chemokine receptor

We wanted to know whether the response of the two isoforms of CXCR4 to their natural ligand, the chemokine CXCL12, was similar. First, we compared the capacity of CXCL12 to inhibit X4 infection in both cell lines. Figure 3A shows that preincubation of HOS-CXCR4-A and HOS-CXCR4-B cells with a suboptimal concentration of CXCL12 inhibited X4 production with the same efficiency (inhibition of 53 ± 10 % and 56 ± 6 %, respectively, $p = 0,810$). Second, as CXCR4 activation has been shown to induce HIV gene expression (15), we analyzed the effect of CXCL12 binding to each CXCR4 isoform on LTR activation. To this end, using the HIV vectors we had previously produced, we transduced HeLa cells stably transfected with a reporter *luciferase* gene driven by the HIV-1 LTR either with *CXCR4-A* or with *CXCR4-B*, exposed them to 1 $\mu\text{g/ml}$ of CXCL12, and measured luciferase activity 24

hours later. As shown in figure 3B, LTR activity was boosted at a similar level upon CXCL12 exposition in both cell lines ($3.33 \pm 0,51$ and $3.27 \pm 0,8$ -fold, respectively, $p = 0,953$). Third, we measured the chemotactic effect of CXCL12 on both cell lines. HOS-CXCR4-A and HOS-CXCR4-B cells migrated with the same intensity towards increasing concentrations of the chemokine (Fig. 3C). These findings indicate that although CXCR4-A is used less efficiently than CXCR4-B by X4 virions to infect CD4⁺ cells, the responses of both isoforms to CXCL12 are undistinguishable in terms of inhibition of HIV infection, LTR activation, and chemotaxis.

X4 entry is more efficient in CXCR4-B than in CXCR4-A expressing cells

As CXCR4 N-term is known to be involved in X4 envelope binding to CXCR4 (12-14), and as the two CXCR4 isoforms do not have the same sequence at this extremity, we next wondered whether the difference in X4 infectibility we have observed between HOS-CXCR4-A and HOS-CXCR4-B cells could be due to a difference in viral entry efficiency. To test this hypothesis, we exposed both cell lines to a wild-type X4 strain in presence or absence of 1 μ M of the CXCR4 antagonist AMD3100 that is known to inhibit the binding of X4 envelopes to CXCR4. As expected, 72 hours later the HOS-CXCR4-B cells produced more virus than the HOS-CXCR4-A cells, and cells preincubated with the CXCR4 antagonist produced no virion (Fig. 4A). At 17 hours postinfection, we measured by quantitative PCR the amount of early reverse transcripts harbored in the cells. As shown in figure 4B, less early reverse transcripts were detected in HOS-CXCR4-A cells than in HOS-CXCR4-B cells. We also quantified late reverse transcripts in both cell lines, and noted that the difference was not further increased (Fig. 4C). Neither early nor late reverse transcripts were amplified in AMD3100-treated cells (Fig. 4B and 4C). We concluded that the CXCR4-B isoform allowed X4 virions entry into target cells more efficiently than the CXCR4-A isoform.

R5 infection induces CXCR4-B expression *in vitro* and *in vivo*

To know the level of physiological expression of the two CXCR4 isoforms, we measured by quantitative RT-PCR the amount of CXCR4-A and CXCR4-B mRNA harbored in the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy donors. Figure 5A shows that the PBMC of all the volunteers expressed both isoforms. Next, we studied the effect of R5 infection on this expression. For this purpose, we exposed the non-activated PBMC of 6 healthy donors to an R5 strain, and at day 6, when we detected viral production in the culture

supernatants, we quantified again CXCR4-A and CXCR4-B mRNA. R5 infection induced an increase in the CXCR4-B : CXCR4-A ratio of mRNA in the PBMC of all the volunteers (Fig. 5B). Concurrently, we infected the PBMC of these 6 healthy donors with an X4 strain. X4 infection induced a lower increase in CXCR4-B : CXCR4-A mRNA ratio (Fig. 5B, $p = 0.018$). We then quantified CXCR4-B mRNA : CXCR4-A mRNA ratio in the PBMC of 11 individuals infected with R5 strains, either treated or not. We observed a correlation between this ratio and viral load of these patients ($r = 0.601$, $p = 0.054$, Fig. 5C). Thus, R5 infection favors CXCR4-B expression over CXCR4-A expression *in vitro* as well as *in vivo*.

CXCR4-B induces R5 to X4 switch more rapidly than CXCR4-A

It is known that CXCR4 overexpression facilitates X4 replication (7). We have also previously shown that CXCR4 overexpression at the surface of target cells infected with an R5 strain favors the emergence of X4 strains (6, 7). In line with these observations, as X4 strains replicate more easily in CXCR4-B⁺ cells than in CXCR4-A⁺ cells, we questioned whether the presence of CXCR4-B at the surface of R5-infected cells could facilitate R5 to X4 switch more efficiently than the presence of CXCR4-A. To answer this question, we exposed HOS-CXCR4-A and HOS-CXCR4-B cells to an R5 strain, and monitored the appearance of CXCR4-using strains in the cell supernatant. As shown in figure 6A, X4 strains, detected by their capacity to induce syncytia in MT2 cells, emerged more rapidly in the HOS-CXCR4-B culture than in the HOS-CXCR4-A culture. We reasoned that, *in vivo*, the overexpression of CXCR4-B in the course of R5 infection could likewise increase the risk of emergence of CXCR4-using strains. A surrogate marker of the risk of R5 to X4 switch is the False-Positive Rate (FPR) score, calculated by the Geno2Pheno algorithm after the sequence of the V3 region of the envelope. The FPR corresponds to the risk of predicting falsely as R5 a virus that is in fact X4. Recently the FPR score has been shown to be correlated with the percentage of X4 strains detected by ultradeep sequencing (16). Therefore, we measured the CXCR4-B : CXCR4-A ratio of mRNA in the PBMC of 11 R5-infected individuals, and compared it with their FPR score. As shown in figure 6B, we observed a strong inverse correlation between these two parameters ($r = -0.633$, $p = 0.039$).

The specific knock-down of CXCR4-B as an anti-HIV therapy

As both CXCR4 isoforms are expressed in CD4⁺ T cells and mediate chemotaxis towards CXCL12, whereas only the B isoform supports a highly productive HIV-1 X4 infection, the

specific downregulation of CXCR4-B may be proposed as an anti-HIV-1 X4 strategy. With this project in mind, we designed an siRNA complementary with a sequence in CXCR4-B that is absent in CXCR4-A, and transfected it in HeLaP4 cells (17) that coexpress both CXCR4 isoforms. As a result we downregulated CXCR4-B mRNA, whereas CXCR4-A remained unchanged (Fig. 7A and B). Consequently, we observed a decrease in cell surface CXCR4 density (Fig. 7C, D and E). The specific inhibition of the CXCR4-B isoform resulted in a drastic decrease in X4 infectibility of the HeLaP4 cells (Fig. 7F).

Discussion

In the present study, we provide evidence that (i) the B isoform of CXCR4 is used by HIV-1 strains to enter and productively infect target cells much more efficiently than the A isoform, whereas both isoforms are used with the same efficiency by the natural ligand CXCL12, (ii) HIV-1 R5 infection favors CXCR4-B expression over that of CXCR4-A, a phenomenon that might facilitate the emergence of CXCR4-using HIV-1 strains, and (iii) it is possible to downregulate CXCR4-B mRNA without modifying CXCR4-A mRNA expression.

Our observation that the chemotactic response to CXCL12 of CXCR4-A- and CXCR4-B-positive cells is similar is in contradiction with the data reported by Gupta et al. (11). One explanation for this discrepancy might be technical. Gupta et al. worked with rat basophil leukemia cell lines stably transfected, whereas we worked with human cells transduced with the ORFs of each CXCR4 isoform. Stable transfectants need to be selected, and this selection may randomly isolate clones deficient for other characteristics than the one for which they are being selected for. In Gupta et al. study, no positive control certified that the chemotactic defect observed in the cells stably transfected with CXCR4-A ORF was specific. By contrast, as shown in figure 2, all the cells we transduced expressed CXCR4, and we did not need to perform any selection to obtain cells expressing one or the other CXCR4 isoform. Moreover, we confirmed this result with two other assays in which we measured the capacity of each CXCR4 isoform to mediate the effect of CXCL12 on HIV-1 infection and on HIV-1 LTR activation, respectively.

Previous works have already reported that, although gp120 and CXCL12 binding sites overlap, they are distinct. Most authors have shown the involvement of the N-term in CXCR4 coreceptor activity. Substitution of the CXCR4 N-term by that of CCR5 impairs the fusion capacity of X4 strains (12). Moreover, Tyr-7, Tyr-12 and Tyr-21 (13) as well as Glu-15 and Glu-32 (14) play a role in CXCR4-mediated viral entry. By contrast Doranz et al. reported that the first 27 residues of CXCR4 are not necessary for activation by CXCL12 (18).

Interestingly, the induction CXCR4-B expression over that of CXCR4-A as a consequence of HIV-1 R5 infection could be an additional factor that facilitates the emergence of CXCR4-using strains. Combined with the increase in CD4⁺ T cell surface CXCR4 density observed in one-third of the patients in the course of the infection, this preferential expression of the CXCR4 isoform that is the most efficient as an HIV-1 coreceptor could favor R5 to X4 switch. The increase in CD4⁺ T cell surface CXCR4 density and in CXCR4-B expression over that of

CXCR4-A could provoke this switch for the same reason, a higher rescue of the rare HIV-1 strains able to use CXCR4 as a coreceptor that randomly appear as a consequence of mutations in the *envelope* genes of R5 strains. The molecular mechanisms responsible for the variability of CXCR4-B : CXCR4-A ratio among the tissues and for its increase under HIV-1 R5 infection remain to be unveiled.

The discrepancy between the HIV-1 coreceptor and the chemokine receptor functions we brought to the fore opens a new therapeutic strategy. So far, the use of CXCR4 antagonists in HIV-1 infection has been limited by the fact that they blocked CXCL12 function. In this study, we show that it is possible, using a complementary siRNA, to specifically downregulate CXCR4-B expression. By transducing hematopoietic stem cells with a transgene encoding such an shRNA together with another transgene coding for CXCR4-A, it will be possible to generate cells specifically expressing the CXCR4-A isoform, partly resistant to HIV-1 X4 infection and able to respond to CXCL12 signals. Such a strategy could be combined with the gene therapeutic approaches that are currently being tested to make target cells resistant to HIV-1 R5 infection.

Methods

Cell culture. HOS, HEK-293T, and HeLa cells were cultivated in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamin, 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin (Lonza) at 37°C and 5% CO₂. CEM cells, MT2 cells and human PBMC were cultivated in RPMI supplemented as DMEM and in the same conditions. Cell viability was quantified after staining with 0.4% trypan blue (Sigma) with an automated cell counter (MACSQuant, Miltenyi) using cell counting chamber slides (Invitrogen).

Transduction. The CXCR4 cDNA was obtained via the AIDS Research Reagent Program (Rockville, MD) from Dr. Nathaniel Landau. It was amplified to give CXCR4-A (corresponding to PubMed sequence NM_001008540 from nucleotide 297 to 1375) or CXCR4-B (corresponding to PubMed sequence NM_003467 from nucleotide 36 to 1154). Each cDNA was inserted downstream of the CMV promoter in the lentiviral transfer vector pHR-BX (19). These CXCR4 transfer vectors were then cotransfected with the HIV packaging plasmid pAX2 and the plasmid pMD2G coding for the vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G (VSV-G) in HEK-293T cells by the calcium phosphate. Supernatants were collected at day 2 posttransfection and concentrated on sucrose (Sigma) by ultracentrifugation at 17,000 g for 1h30 at 4°C. HOS or HeLa cells were plated in 24-well culture plates and exposed to the same amount of p24 equivalent of HIV vectors harboring the CXCR4-B or the CXCR4-A transgene in 8 µg/ml polybrene (Sigma) and centrifuged for 90 min at 200 g and 30°C. Cells were washed 24 hours posttransduction, amplified and controlled for CXCR4 membrane expression by flow cytometry.

Single-round infection assay. To produce replication-defective HIV virions, pNL4.3-Luc.R⁻E⁻ transfer plasmid harboring a defective viral *env* gene with a *firefly luciferase* gene inserted in viral *nef* gene was cotransfected with either the R5 envelope plasmid pCMV-Ad8-Env, the X4 envelope plasmid VB34 or the VSV-G envelope plasmid pDM2G (AIDS Research Program) into HEK-293T cells at a molecular ratio of 2:1. The virions thus produced were collected in the culture supernatant 48 hours posttransfection, filtrated at 0.45 µm and concentrated on sucrose by centrifugation. For the one-round infection assay, HOS cells were cultivated in triplicates into 96-well culture plates at a density of 0.25 x10⁶ cells/ml and infected with the various virions. In some experiments, cells were incubated for one hour with CXCL12 (Peprotech) at indicated concentrations before infection. Cells were washed twice in phosphate buffered saline (PBS) 24 hours postinfection and kept in culture for 72 hours. Cells

were then washed once in PBS, lysed with 50 μ l lysis buffer and the firefly luciferase activity was measured on a luminometer using a commercial kit (Luciferase Assay System, Promega).

Multiple-round infection assay. The HIV-1 R5 Ad8 strain (AIDS Reagent Program) was expanded in CD4+CCR5+HOS cells. The HIV-1 X4 NL4.3 DNA (AIDS Reagent Program) was transfected into HEK-293T cells by the calcium-phosphate method, and the collected virions were amplified in the human CEM cell line. HOS cells were plated in 24-well culture plates at a density of 0.04×10^6 cells/ml. Cells were infected in triplicates with 10 ng/ml of p24 equivalent of Ad8 or NL4.3 overnight, washed with PBS and kept in culture with adjustment of the cell number twice a week. Virus production was monitored by measuring p24 gag concentration in the cell supernatant by using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (Innotest HIV AG MAB, Ingen).

Quantification of CXCR4-A and CXCR4-B mRNA. mRNA from 5×10^6 PBMC was extracted using a commercial kit (High pure RNA isolation kit, Roche). A reverse transcription was carried out using random primers (Promega) and Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) at 50°C for 30 min, 55°C for 30 min and 70°C for 15 min. cDNA was amplified with the appropriate primers: 5'-cttctgaattggaagtgaatg-3' and 5'-ggggggcaggaagattttattg-3' for CXCR4-A, 5'-cagcagtagcaaaagtgcg-3' and 5'-atggagtcatagtcacctgagc-3' for CXCR4-B in a LightCycler480 (Roche) with SYBR Green following the manufacturer's recommendations. Cellular genomic S14 (5'-accagtcacacggcagatg-3' and 5'- ggggaaggaaaagaaggaagaa-3') was used as a normalization. Standard curve was established by analyzing serial dilution of a positive control plasmid. The PCR cycle at which the amplification signal entered the exponential range was used to quantify the cellular DNA. CXCR4-A and S14 annealing were realized at 64°C and CXCR4-B annealing at 69°C. To quantify mRNA in infected cells, 5×10^6 PBMC at a density of 2×10^6 cells/ml were exposed for 18h to 350 ng of p24 equivalent of the R5 strain Ad8, washed twice in PBS, and cultivated for 6 days.

RNA interference. HeLa cells were cultured in a 24-well plate at a density of 0.025×10^6 cells/ml and transfected with 2 nM of the anti-CXCR4-B siRNA 5'-gcagcagguagcaaaguga-3' or of a non-targeting pool of siRNA (Thermo-scientific) with INTERFERin (Polyplus transfection). Three days posttransfection, cells were infected with 10 ng/ml of p24 equivalent of the X4 strain NL4.3 for 24 hours, washed in PBS, and cultured with adjustment of cells number twice a week. siRNA transfection was repeated once a week.

Flow cytometry For CXCR4 staining, 2×10^5 cells were incubated in PBS supplemented with

0.2% bovine serum albumin (Sigma) and labeled with the anti-human CXCR4 monoclonal antibody 12G5 or an isotype control (BD Biosciences) for 1 hour on ice at a final concentration of 10 μ g/ml. After washing, cells were incubated with a 1:100 dilution of Goat F(ab')₂ fragment anti-mouse IgG (H+L)-FITC (Beckman Coulter) for another hour on ice. Cells were then washed, fixed in BD Cell Fix and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences).

Chemotaxis assay. Chemotaxis of HOS cells in response to CXCL12 was measured across 8 μ m pore-size polycarbonate filters in 24-well transwell chambers such as previously described (20). HOS-CXCR4-A and HOS-CXCR4-B cells were added to the upper chamber of each transwell (0.1x10⁶ cells in 100 μ l of 1% FCS RPMI). CXCL12 at indicated concentrations was added to the lower chamber under a volume of 600 μ l. The plates were incubated for 4 hours at 37°C in 5% CO₂. Cells that had migrated into the lower chamber were collected and enumerated with a cell counter (MACSQuant).

R5 to X4 switch. PBMC from healthy donors at a density of 2x10⁶ cells/ml were activated with 1 μ g/ml of phytohemagglutinin M (Sigma) and 100 IU/ml of IL2 (Peprotech) for 3 days in culture medium, exposed to the plasma of an HIV-1 R5-infected subject, and cultured in 100 IU/ml of IL2. Then, we performed a coculture between these infected PBMC and HOS-CXCR4-A or HOS-CXCR4-B cells. HOS cell number was adjusted twice a week with addition of uninfected HOS cells. Viral production was monitored by measurement of gag p24 in cell supernatant twice a week. R5 to X4 switch was evaluated using MT2 cells cultured at a density of 0.1x10⁶ cells/ml in infected CXCR4-B and HOS-CXCR4-A cell supernatants as previously described (7).

Statistical analysis. All data are representative of at least three different experiments. Values are expressed as the mean \pm SD. Differences in infection, chemotaxis, LTR expression and CXCR4 isoforms mRNA ratio were analyzed with the unpaired Student's *t* test. Spearman rank correlations were used to evaluate the link between CXCR4-B : CXCR4-A mRNA ratio and viremia or FPR.

Patients. The observational study involving patients has been approved by the institutional review board Sud Méditerranée IV. Informed consent was obtained from all participants.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgments

We are grateful to the persons who volunteered for this study.

References

1. Murdoch C (2000) CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol. Rev.* 177:175-184.
2. Hernandez PA, *et al.* (2003) Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease *Nat. Genet.* 34(1):70-74.
3. Berger EA, Murphy PM, & Farber JM (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17:657- 700.
4. Shepherd JC, *et al.* (2008) Emergence and persistence of CXCR4-tropic HIV-1 in a population of men from a multicentric AIDS cohort study. *J. Infect. Dis.* 198(8):1104- 1112.
5. Lin Y-L, *et al.* (2005) CXCR4 overexpression during the course of HIV-1 infection correlates with the emergence of X4 strains. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 39(5):530-536.
6. Brieu N, Portalès P, Carles M-J, & Corbeau P (2011) Interleukin-7 induces HIV type 1 R5-to-X4 switch. *Blood* 117(6):2073-2074.
7. Fiser A-L, *et al.* (2010) High CD4+ T cell surface CXCR4 density as a risk factor for R5 to X4 switch in the course of HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 55(5):529-535.
8. Llano A, *et al.* (2001) Interleukin-7 in plasma correlates with CD4 T-cell depletion and may be associated with emergence of syncytium-inducing variants in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals. *J. Virol.* 75:10319-10325.
9. Corbeau P & Reynes J (2009) CCR5 antagonism in HIV infection: ways, effects, and side effects. *AIDS* 23:1931-1943.
10. Murakami T & Yamamoto N (2010) Role of CXCR4 in HIV infection and its potential as a therapeutic target. *Future Microbiol.* 5(7):1025-1039.
11. Gupta SK & Pillarisetti K (1999) CXCR4-Lo: molecular cloning and functional expression of a novel human CXCR4 splice variant. *J. Immunol.* 163:2368-2372.
12. Doranz BJ, *et al.* (1997) Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 71:6305-6314.
13. Brelot A, Heveker N, Montes M, & Alizon M (2000) Identification of residues of CXCR4 critical for human immunodeficiency virus coreceptor and chemokine activities. *J. Biol. Chem.* 275(31):23736-23744.
14. Chabot DJ, Zhang PF, Quinnan GV, & Broder CC (1999) Mutagenesis of CXCR4 identifies important domains for human immunodeficiency virus type 1 X4 isolate envelope-mediated membrane fusion and virus entry and reveals cryptic coreceptor activity for R5 isolates *J. Virol.* 73:6598-6609.

15. Montes M, *et al.* (2000) SDF-1-induced activation of ERK enhances HIV-1 expression. *Eur. Cytokine Natw.* 11(3):470-477.
16. Svicher V, *et al.* (2013) The genotypic false positive rate determined by V3 population sequencing can predict the burden of HIV-1 CXCR4-using species detected by pyrosequencing. *Plos one* 8(1):e53603.
17. Treand C, *et al.* (2006) Requirement for SWI/SNF chromatin-remodeling complex in Tat-mediated activation of the HIV-1 promoter. *EMBO J* 25(8):1690-1699.
18. Doranz BJ, *et al.* (1999) Identification of CXCR4 domains that support coreceptor and chemokine functions. *J. Virol.* 73(4):2752-2761.
19. Lin Y-L, *et al.* (2005) G-protein signaling triggered by R5 human immunodeficiency virus type 1 increases virus replication efficiency in primary T lymphocytes. *J. Virol.* 79(12):7938-7941.
20. Desmetz C, *et al.* (2006) The strength of the chemotactic response to a CCR5 binding chemokine is determined by the level of cell surface CCR5 density. *Immunology* 119(4):551-561.

Figure Legends

Figure 1. CXCR4-A and CXCR4-B isoforms. (A) Schematic representation of the mRNA coding for the CXCR4-B and CXCR4-A isoforms. Open boxes correspond to the coding sequences, and closed boxes to the noncoding sequences. (B) Aminoacid sequence of the CXCR4-A and -B isoforms.

Figure 2. HIV-1 X4 infectibility of HOS cells transduced with CXCR4-B or CXCR4-A. (A, B, C) CXCR4 expression on HOS cells transduced with CXCR4-A or CXCR4-B. CXCR4 expression at the surface of non-transduced cells (A), or cells transduced with CXCR4-B (B) or CXCR4-A (C) was analyzed by immunolabelling and flow cytometry. (D, E, F) Efficiency of one round of HIV-1 infection. HOS-CXCR4-A (closed bars) and HOS-CXCR4-B (open bars) cells were exposed to *env*-defective HIV-1 virus harboring the *luciferase* marker gene and pseudotyped with an HIV-1 X4 (D), an HIV-1 R5 (E) or a vesicular stomatitis virus (F) envelope at various quantities. Luciferase activity was measured in cell lysates 72 hours later. (G, H) Efficiency of replicative HIV-1 infection. HOS-CXCR4-A (●) and HOS-CXCR4-B (■) cells were exposed to the wild-type HIV-1 X4 strain NL4.3 (G) or the wild-type HIV-1 R5 strain AD8 (H) and viral production was monitored over time by measuring gag p24 concentration in the culture supernatant.

Figure 3. Effects of CXCL12 on HOS cells transduced with CXCR4-A or CXCR4-B. (A) Inhibitory effect of CXCL12 on X4 infection. HOS-CXCR4-A (closed bars) and HOS-CXCR4-B (open bars) cells were preincubated or not with CXCL12 and thereafter exposed to an *env*-defective HIV-1 X4 virus harboring the *luciferase* marker gene and pseudotyped with an X4 envelope. Luciferase activity was measured in cell lysates 72 hours later. (B) Activating effect of CXCL12 on HIV-1 LTR. HeLa cells harboring the *luciferase* marker gene driven by an HIV-1 LTR were transduced with CXCR4-A (closed bars) or CXCR4-B (open bars), and exposed to CXCL12. The effect of CXCR4 signaling on LTR activity was estimated 72 hours later by measuring luciferase activity in cell lysates. (C) Chemotactic effect of CXCL12. Migration of CXCR4-A- (closed bars) or CXCR4-B- (open bars) transduced cells towards various concentrations of CXCL12.

Figure 4. Efficiency of HIV-1 X4 entry and reverse transcription in HOS cells transduced with CXCR4-A or CXCR4-B. HOS-CXCR4-B and HOS-CXCR4-A cells were

preincubated or not with the CXCR4 antagonist AMD3100 and exposed to the wild-type X4 strain NL4.3. Seventeen hours post-infection, the quantity of early (B) and late (C) reverse transcripts was determined in cell lysates by quantitative PCR. To control infection, the amount of gag p24 antigen was measured three days later, in the culture supernatant (A).

Figure 5. CXCR4-A and CXCR4-B mRNA expression in the course of HIV-1 R5 infection. Expression of the mRNA encoding CXCR4-A (closed bar) and HOS-CXCR4-B (open bar) in PBMC of 11 healthy donors was quantified by RT-PCR (A). Increase in CXCR4-B : CXCR4-A mRNA ratio in PBMC of 6 healthy donors infected *in vitro* by a wild-type R5 strain (B). Correlation between CXCR4-B : CXCR4-A mRNA ratio in PBMC of 11 HIV-1 R5-infected persons and their viral load (C).

Figure 6. CXCR4-B expression and R5 to X4 switch. (A) Delay of R5 to X4 switch in HOS-CXCR4-A and HOS-CXCR4-B cells. HOS-CXCR4-A (●) and HOS-CXCR4-B (■) cells were infected with a primary R5 strain and viral production was monitored over time by measuring gag p24 concentration in the culture supernatant. The emergence of X4 virions, monitored by infecting MT2 cells with the culture supernatant, is indicated. (B) Correlation between CXCR4-B : CXCR4-A mRNA ratio in PBMC of 11 HIV-1 R5-infected persons and the R5/X4 phenotype of their circulating virions as determined by the False-Positive Rate (FPR) calculated by the Geno2Pheno algorithm.

Figure 7. Specific downregulation of CXCR4-B by RNA interference. HeLaP4 cells were transfected with an siRNA specific for CXCR4-B mRNA or a negative control siRNA (scramble). CXCR4-A (A) and CXCR4-B (B) mRNA were then quantified in transfected cells. CXCR4 expression at the surface of cells transfected with the nonspecific (D) or the specific (E) siRNA was analyzed by immunolabelling and flow cytometry. HeLa cells labeled with an irrelevant isotype-matched antibody were used as a negative control (C). (F) HeLaP4 cells transfected with the nonspecific (●) or the specific (■) siRNA were exposed to the wild-type HIV-1 X4 strain NL4.3 and viral production was monitored over time by measuring gag p24 concentration in the culture supernatant.

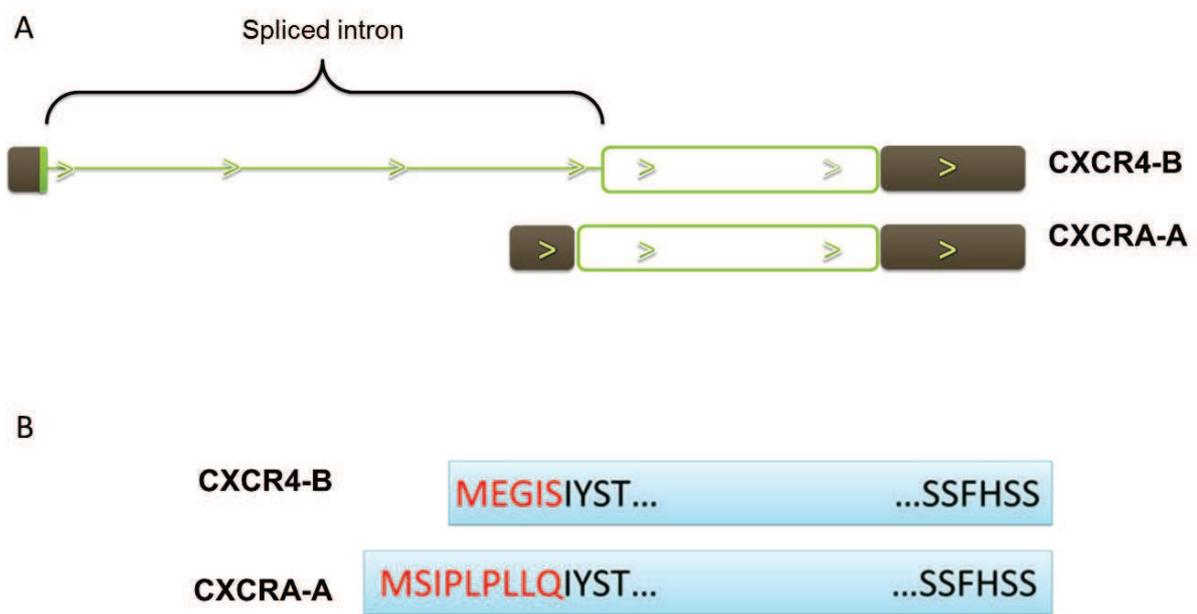


Figure 1

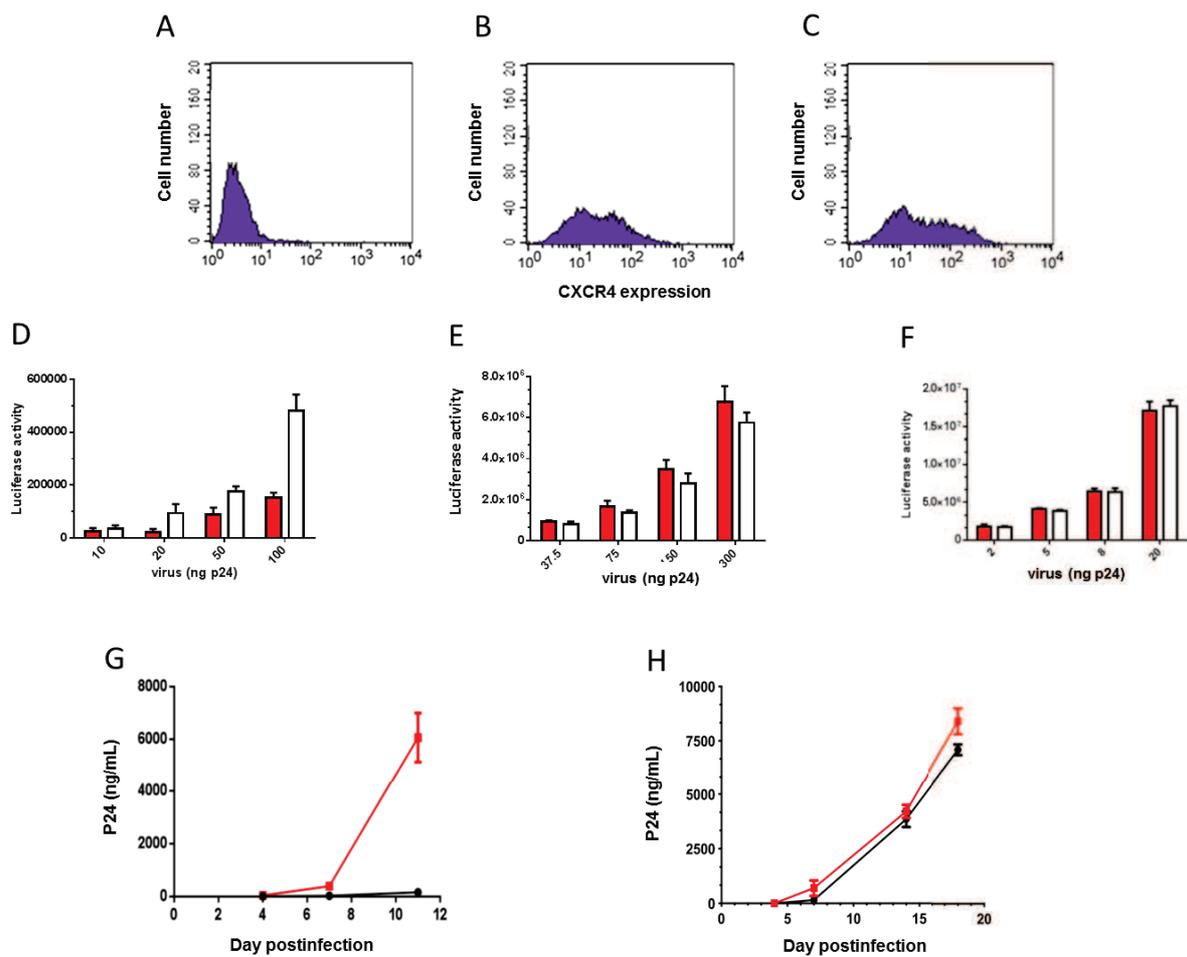


Figure 2

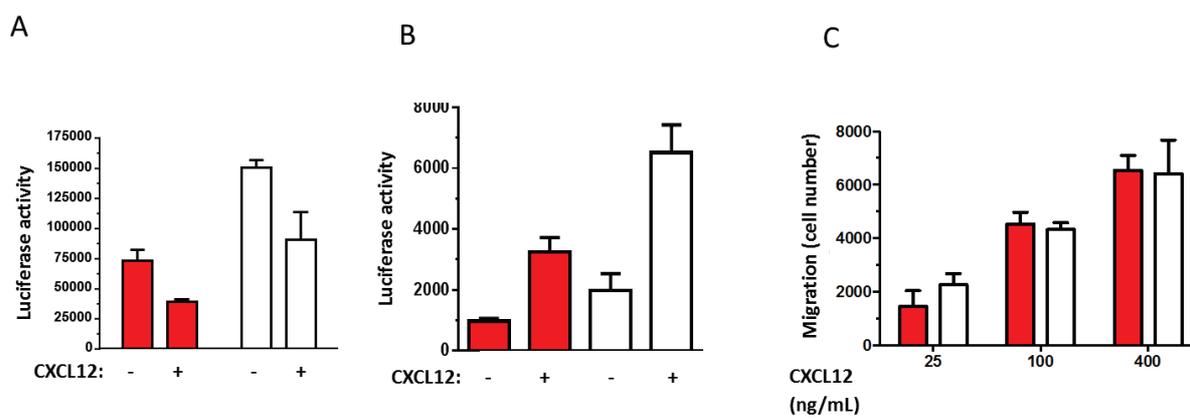


Figure 3

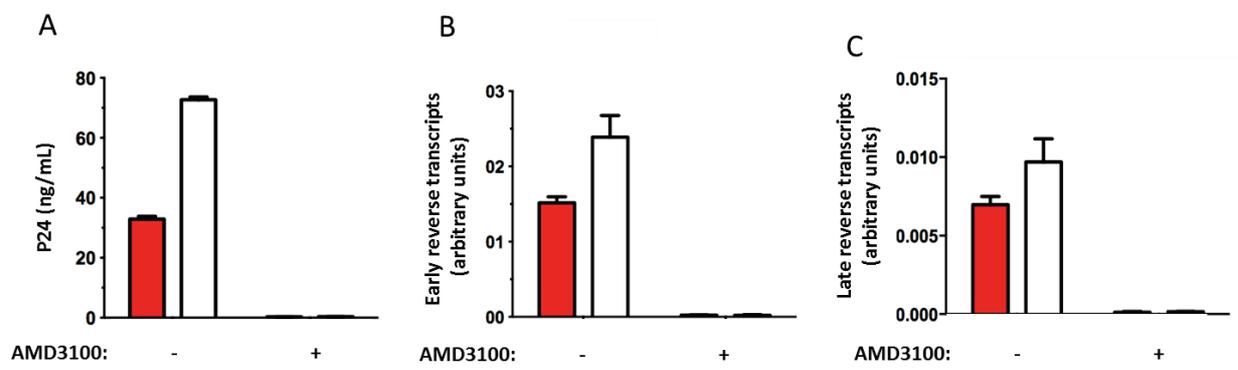


Figure 4

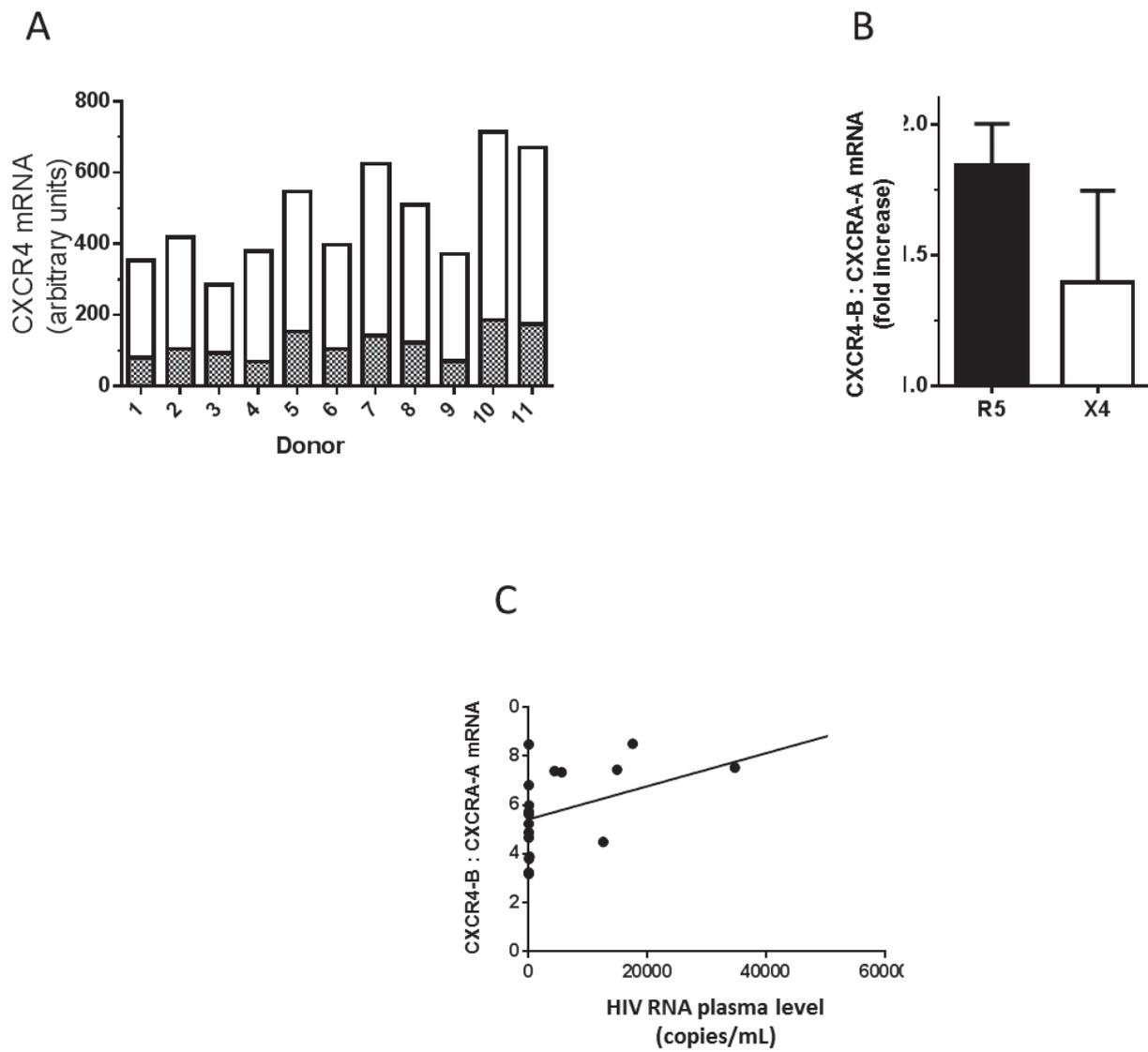


Figure 5

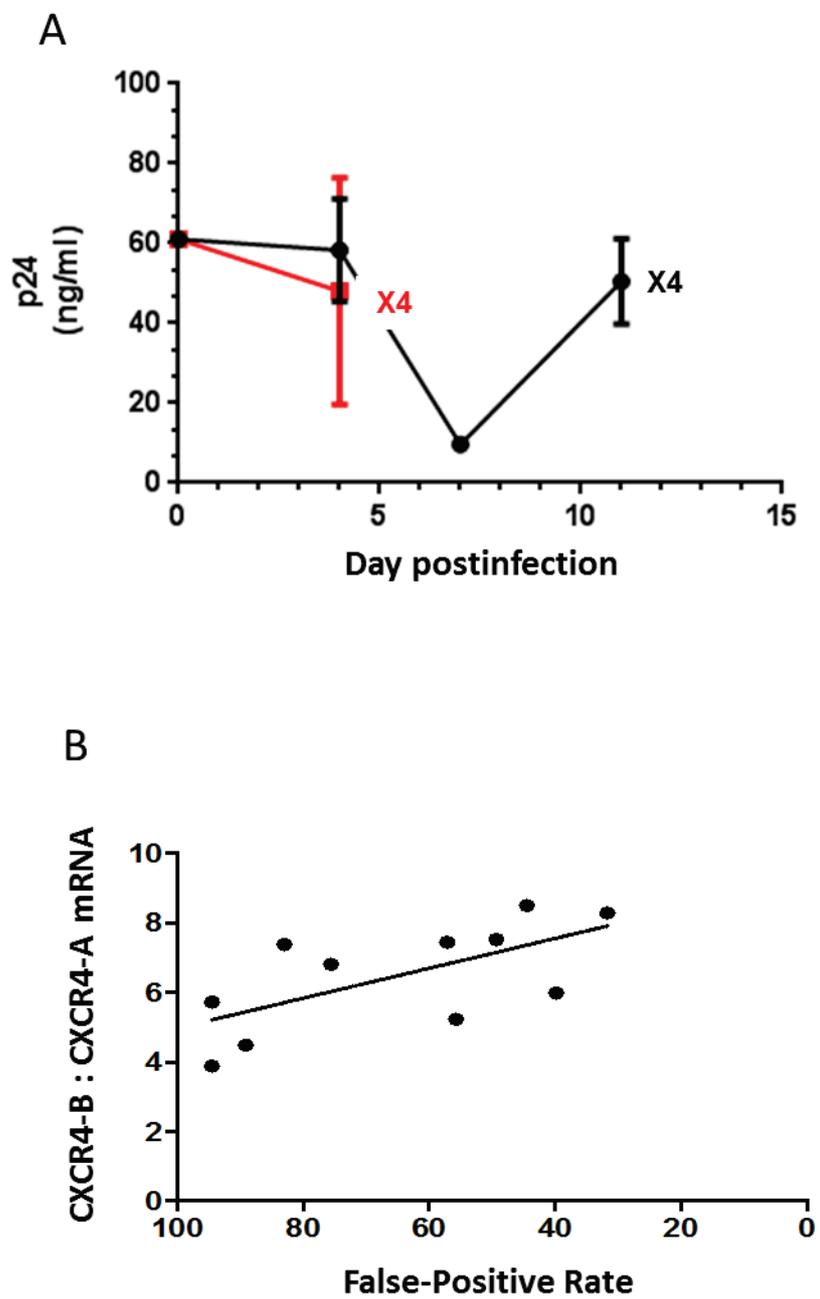


Figure 6

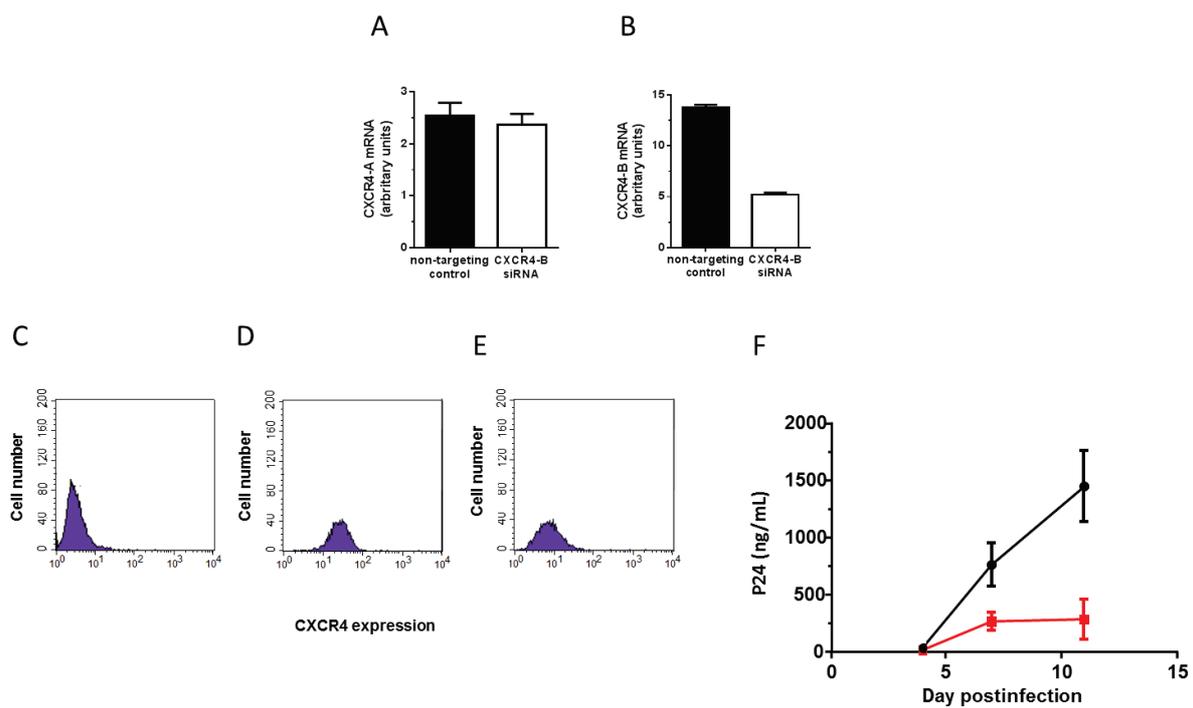


Figure 7

Annexe 3

« The S1P1 receptor interacts with CCR5 and enhances HIV-1 infection, whereas FTY720 opposes the virus *in vitro* and *in vivo* ». C Duquenne, S Gimenez, D Maurel, N Campos, A Guigues, E Doumazane, L Comps-Agrar, J Tazi, L Prézeau, P Corbeau, V François.

The S1P1 receptor interacts with CCR5 and enhances HIV-1 infection: anti-HIV effect of the S1P1 functional antagonist FTY720

Charline DUQUENNE ^a, Sandrine GIMENEZ ^a, Damien MAUREL ^b, Noëlie CAMPOS ^c,
Adeline GUIGUES ^a, Etienne DOUMAZANE ^d, Laetitia COMPS-AGRAR ^{d,e}, Jamal TAZI ^f,
Laurent PRÉZEAU ^d, Pierre CORBEAU ^{a,g,h,1}, Vincent FRANÇOIS ^{a,1}

^a Institut de Génétique Humaine, CNRS UPR1142, 141 rue de la Cardonille, 34396 Montpellier cedex 5, France.

^b ARPEGE Pharmacology Screening Interactome platform facility, Institut de Génétique Fonctionnelle, 141 rue de la Cardonille, 34094 Montpellier cedex 5, France.

^c Laboratoire coopératif SPLICOS SAS, IGMM-CNRS-UMR5535, 1919 route de Mende, F-34293 Montpellier Cedex 5.

^d Institut de Génétique Fonctionnelle, CNRS-UMR5203, INSERM-U661, Universités Montpellier 1 & 2, UMR5203, F-34094 Montpellier Cedex 5, France.

^e Present address: Genentech Inc., Department of Protein Chemistry, 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, USA.

^f Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, CNRS-UMR 5535, 1919 route de Mende, Montpellier F-34293, France.

^g Université Montpellier 1, 5 Boulevard Henri IV, 34967 Montpellier cedex 2, France.

^h Centre Hospitalier Universitaire Caremeau, Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, place du Pr Debré, 30029 Nîmes cedex 9, France.

Author contributions : C.D., D.M., E.D., L.P., J.T., P.C. and V.F. designed research ; C.D., S.G., N.C., A.G., P.C. and V.F. performed research ; C.D., D.M., E.D., L.C.-A., L.P., P.C. and V.F. analyzed data ; C.D., P.C. and V.F. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

Short title: interaction of S1P1 with CCR5 in HIV-1 infection.

Keywords: HIV coreceptor, lymphocyte homing, G protein-coupled receptor, oligomerization

Footnote: ¹ PC and VF contributed equally to this study.

To whom correspondence should be addressed: E-mail: vincent.francois@igh.cnrs.fr

Abstract

We identified the sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) for its ability to form heteromers with CCR5 and to modulate infectivity of CCR5-using (R5) HIV-1 strains in a screen designed to identify modifiers of CCR5 activity between G protein-coupled receptors transcribed in both CD4⁺ CCR5⁺ T cells and macrophages. S1P1 inhibited the first cycle of infection by free viral particles at the level of entry, but not thereafter when cell-to-cell contact is the primary mode of propagation. Furthermore, S1P1 cell surface expression boosted viral gene expression. This resulted in an increase in HIV-1 production by cells infected with a wild type replicative HIV R5 strain *in vitro*. Despite their high mRNA content, peripheral blood mononuclear cells do not express S1P1 at their surface. However, S1P1 is present on *in vitro* differentiated human dendritic cells (DCs) and on lymphocytes isolated from lymph nodes. Moreover, FTY720, a functional S1P1 antagonist used in the treatment of multiple sclerosis, reduced viral production of cultured infected DCs, and viremia of immunologically humanized *SCID* mice. Altogether, these data point to an important role of S1P1 in modulating R5 tropic infection.

Significance statement

As there is no ultimate treatment to cure AIDS thus far, new therapeutic approaches are required to counteract HIV progression in infected patients. In this study, we screened the large family of GPCR receptors for candidates for interaction with the chemokine receptor CCR5 used by HIV to infect cells. We identified S1P1, a receptor with important functions in immune cells trafficking in the body, for its aptitudes to form dimers with CCR5 and to enhance HIV production of cells that display this receptor at their surface. Furthermore, we have shown that a ligand of S1P1 already used to treat multiple sclerosis called fingolimod or FTY720 has an anti-HIV effect on immune cells.

Introduction

After binding to the CD4 receptor, HIV-1 utilizes one of the two coreceptors CCR5 or CXCR4 to enter and replicate into target cells. These two chemokine receptors belong to the large family of seven-transmembrane domain receptors (G protein-coupled receptors, GPCRs). GPCRs may form homo- as well as hetero-oligomers (1) including complexes between receptors belonging to different classes of GPCRs. Hetero-oligomers are new functional units compared to the respective homo-oligomers. Indeed, such direct receptor interactions influence the characteristics of one or both partners in different ways: They can affect receptor cell surface density (2-4), ligand specificity and/or affinity (5-7), coupling to G protein or other intracellular mediators (5, 7) and/or the nature and intensity of the signaling pathway (8, 9). GPCRs can also influence each other indirectly. For example, activation of one receptor by its ligand may attenuate the response of another GPCR to its own ligand, even if no physical interaction occurs between the two receptors, a phenomenon called hetero-desensitization. Of note, when GPCRs represent 3% of the human genome, they are targeted by more than 30% of the pharmaceutical drugs (10, 11).

CCR5 forms homo-oligomers independently of ligand binding (12), and co-immunoprecipitates with the mu, kappa and delta opioid receptors (13). Furthermore, mu opioid receptor and CCR5 heterodimerize and cross desensitize each other (14). CCR5 has also been found to heterodimerize with CCR2 (15), CXCR3 (16), and CXCR4 (17).

CCR5 interaction with GPCRs at the surface of a target cell, e.g. with the mu and delta opioid receptors modulate HIV infectability (18-21). This is also the case for other non-chemokine (22-29) and chemokine (15-17) GPCRs via heterodimerization or heterodesensitization.

In the present study, we screened the GPCR family for new interacting partners of CCR5 with the potential to interfere with HIV infection. Such a partner may directly influence cell surface CCR5 density, gp120 binding, and/or CCR5 signaling, parameters that correlate with HIV infection efficiency. Our approach yielded sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1P1) as a potential candidate. S1P1 is expressed in most immune cell types including T and B lymphocytes, NK cells, dendritic cells, macrophages and neutrophils (30-33). S1P1 plays a critical role in T and B cell egress from thymus and lymph nodes towards high sphingosine-1-phosphate (S1P) ligand concentration present in blood and lymph (30, 31, 34-38). We

investigated the influence of S1P1 *in vitro* and *in vivo* concluding that it had major effects on the process of HIV infection.

Results

Looking for GPCRs co-expressed with CCR5 in CD4 T cells and macrophages. The profile of mRNA expression of the various members of the GPCRs family in CD4⁺ CCR5⁺ T lymphocytes and macrophages was initially determined. We therefore sorted CD4 T cells expressing CCR5 derived from the peripheral blood of several healthy donors. We also differentiated macrophages from circulating monocytes. The expression of 250 and 223 different GPCRs was identified using quantitative RT-PCR in these CD4⁺CCR5⁺ T cells and macrophages, respectively. Most, two hundred GPCRs were found in both cell types (figure 1). In CD4⁺ CCR5⁺ T lymphocytes, 39 GPCRs were expressed with an mRNA level equal or superior to the level of expression of CCR5.

We found that S1P1 mRNA was very abundant in CD4⁺ CCR5⁺ T lymphocytes but low quantities were found in macrophages (Table 1). Of the four other S1P receptors, only S1P2 and S1P5 were expressed at a higher level than CCR5 in CD4⁺ CCR5⁺ T cells, but to a lower level when compared to S1P1 (Table 1).

S1P1 and CCR5 form heteromers at the cell surface. We then tested the ability of GPCRs, co-expressed at a high level with CCR5 in CD4 T cells, to interact with CCR5 at the cell membrane of HEK293 cells. To carry out this screen, we used time-resolved FRET technique (tr-FRET). Briefly, receptors are fused on their N-terminal extracellular domain with genetically encoded tags labeled with long-life time and non-permeant synthetic fluorescent substrates. This methodology produces high signal-to-noise ratio and a direct assessment of receptor cross-interaction at the plasma membrane of living cells (39). In this screen, SNAP and CLIP-tagged receptors were co-transfected in HEK293 cells and specifically labeled with fluorophores added simultaneously in the culture medium. In order to determine the ability of the receptors expressed at the outer membrane of the cells to interact, tr-FRET signal between cell surface tagged-receptors was measured including the fluorescence of each independent fluorophore to normalize tr-FRET with receptor expression. We ascertained that the S1P1 and CCR5 tagged receptors internalize into the cells in response to their respective natural ligands as their respective wild type forms. (Supplemental data S1).

In a first set of experiments, we performed multiple saturation curves between CLIP-CCR5 and SNAP-S1P1 by lowering the total amount of transfected plasmids. For each curve, a constant amount of CLIP-CCR5 is co-transfected with increasing amounts of SNAP-S1P1 (figure 2A). Note that for the two lowest plasmid amounts, the saturation curves are superposed with similar $FRET_{MAX}$ and $FRET_{50}$ values. The interpretation is that in these conditions the tr-FRET due to random collisions tends to be negligible in the measured tr-FRET signal. The results confirm the specific interaction between CCR5 and S1P1 (40).

We then addressed the specificity of CCR5-S1P1 interaction by adding a negative control, the beta-2 adrenergic receptor (β_2AR), a class A GPCR that was shown not to interact with CCR5 (41). As expected, SNAP- β_2AR gave a non-saturating tr-FRET signal with CLIP-CCR5, an indication of random collisions between the two receptors (figure 2B) (42). Conversely, CLIP-CCR5 is found to form homodimers with SNAP-CCR5 as expected (12), demonstrating the robustness and validity of this assay system.

Effects of S1P1 expression on HIV-1 R5 life cycle

S1P1 inhibits infection by a non-replicative HIV-1 R5 virus. To study the effect of S1P1 expression on HIV-1 R5 infection, we transduced $CD4^+CCR5^+$ human osteosarcoma (HOS) cells with an HIV vector harboring either the *S1P1* gene or the negative control *LacZ* gene to generate two lines, S1P1 HOS and LacZ HOS, respectively (figure 3). Both cell lines were exposed to varying amounts of HIV-1 virions harboring a genome with a deletion in the *env* gene, a *luciferase* gene fused to the *nef* gene, and pseudotyped with an R5 envelope. Infection was evaluated by measuring luciferase activity. We observed that for each viral input, S1P1 expression reduced luciferase activity approximately twofold (figure 4). This effect of S1P1 was not due to a reduction in cell viability or proliferation (supplemental data S2). We therefore concluded that S1P1 expression impaired a step in HIV cycle.

S1P1 has no effect on one-round infection with HIV-1 virions pseudotyped with the envelope of the Vesicular Stomatitis Virus. Considering that CCR5 and S1P1 interact at the cell surface and that one-round infection with virus particles pseudotyped with an R5 envelope is reduced, we hypothesized that S1P1 may have an inhibitory effect on viral entry. To test this

possibility, we infected LacZ and S1P1 HOS cell lines with *env* defective HIV-1 virus harboring a *luciferase* gene and pseudotyped with the G protein of the Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G). We observed no difference in the infectivity of the two cell lines after one viral life cycle (figure 5). Therefore, S1P1 expression decreases HIV-1 virions entry into cells via CCR5.

S1P1 expression reduces HIV production during the first cycle of replication. To evaluate the effect of S1P1 on a complete HIV cycle, we assessed early viral production by cells infected with fully replicative virions. For this purpose, we measured HIV RNA produced by cells infected with a wild-type HIV-1 R5 strain in the 3 first days post-infection. In these conditions, S1P1 had a strong negative impact on viral production (figure 6). Thus, when a full single HIV replication cycle is monitored after exposition to virions, S1P1 inhibited viral production in HOS cells.

S1P1 expression stimulates HIV transcription. We tested if S1P1 expression modified HIV transcription since S1P1 triggering may activate NF κ B via G $_{\alpha i}$ proteins (43-45). HeLa cells stably transfected with an HIV LTR driving a *luciferase* reporter gene (46) were transduced with the same amount of S1P1 or LacZ lentiviral vector as previously described. The effect of S1P1 expression on LTR activity was evaluated by measuring luciferase activity. We observed a ten-fold increase in luciferase expression in S1P1 transduced HeLa cells as compared with LacZ HeLa cells (figure 7A). Hence, the presence of S1P1 at the surface of a target cell increased LTR activity. However, this increase was not sufficient to compensate for the decrease in viral entry we observed during the first viral life cycle. Therefore, the resulting production is reduced after the first round of HIV replication.

To test our model that S1P1 expression hindered HIV entry but boosted the viral genome transcription, we repeated the one-round infection assay varying the time of infection. We delayed S1P1 transduction so that S1P1 expression occurred only after viral entry but still before HIV transcription. Under these conditions, we observed a two-fold increase in luciferase activity in the S1P1 HOS cells as compared with the LacZ HOS cells (Figure 7B).

Thus, expressing S1P1 between virion entry and viral transcription results in an increase in HIV production in a single-round infection assay.

Altogether, we concluded that S1P1 expression modulates viral production differentially with a reduction in HIV particles entry which is partly compensate by increased LTR activation when the first replication cycle is monitored.

S1P1 expression increases HIV production in the course of a replicative infection. Once the first round of HIV infection has been carried out, the transmission of the virus to new cells occurs mainly via cell-to-cell contact rather than via the viral particles that have been released in the medium (47). Therefore, we tested the effect of S1P1 expression on the transmission of the virus from infected to non-infected cells. HOS cells were infected by contact with HIV-1 R5-infected MOLT cells rather than with free viral particles. Under these conditions, the effect of S1P1 expression on early viral production was not any more negative but rather slightly positive (figure 8A). This suggests an inhibitory effect of S1P1 expression on infection by free HIV particles only, and not when cell-cell contact is the primary mechanism of virus transmission.

Actually, S1P1 expression boosted HIV production (23-fold increase in p24 concentration at day 11) when HOS lines were infected with a replicative R5 virus (figure 8B).

Finally, the only difference between X4 and R5 virus strains being the co-receptor envelope usage, we assumed that S1P1 would favor production of an X4 strain. Indeed, we observed that S1P1 promoted the production of an X4 strain after several cycles of infection as for a replicative R5 strain (figure 8C).

S1P1 receptor expression at the surface of immune cells. We looked for the expression of the S1P1 receptor at the surface of various immune cells by flow cytometry. No expression was detected at the surface of macrophages, spleen lymphocytes, and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) despite high mRNA content in PBMC. Actually, it is known that S1P1 is efficiently internalized in circulating mice PBMC due to the high blood concentration of its ligand S1P (48). In mice, T lymphocytes must re-express S1P1 at their cell surface to be able to exit from lymph nodes (31). We isolated lymphocytes from human lymph nodes and,

indeed, we detected significant S1P1 expression on T cells (figure 9). Specifically, we found a subpopulation of CD4⁺ CCR5⁺ S1P1⁺ cells in lymph nodes. Furthermore, we detected the S1P1 receptor at the surface of monocyte-derived dendritic cells (figure 9).

The S1P1 functional antagonist FTY720-P inhibits HIV-1 R5 infection in vitro and in vivo. As S1P1 expression may hinder the entry of HIV-1 R5 particles into CCR5⁺ cells and induce an activation pathway that facilitates HIV transcription, we surmised that some S1P1 ligands might modify the infection of target cells. To test this hypothesis, we used S1P, the natural ligand for all five S1P receptors (49), and phosphorylated FTY720 (FTY720-P), an S1P receptor agonist except for S1P2 (50). Over time, FTY720-P exerts an antagonistic effect due to S1P1 internalization and degradation (51). We also tested the agonists KRP230p, ligand of S1P1, -4 and -5 (52, 53), as well as SEW2871 that is specific of S1P1 (54). We observed no effect of S1P, FTY720-P, SEW2871 nor KRP230p on S1P1 HOS cell infection, neither with one-round nor with replicative HIV-1 R5 viruses. FTY720-P exerted a negative effect on the HIV-1 R5 infection that was inconsistent on PBMC, but consistent on dendritic cells. Figure 10A shows that the productive infection of *in vitro* differentiated dendritic cells was actually inhibited by the S1P1 functional antagonist FTY720-P.

To test the *in vivo* effect of FTY720 on HIV-1 R5 infection, SCID mice were reconstituted by intra-peritoneal injection of human PBMC. Mice were then force fed with 0.3 mg/kg/day FTY720 or vehicle, infected with a replicative R5 virus, and their HIV RNA plasma level was monitored. A 12-fold decrease in plasma viral load was observed in FTY720-treated mice (figure 10B).

Discussion

In an effort to identify new GPCR that interfere with HIV in immune target cells such as CCR5⁺ CD4⁺ T cells or macrophages, we first analyzed GPCR expression by RT-PCR in these cells. We found transcripts for more than 200 of these genes, with about 40 of them expressed with a similar or higher level than CCR5. We focused on the PBMC highly transcribed *S1P1* gene, and showed that this key receptor of the immune system is able to form heteromers with CCR5 on the outer cellular membrane of transfected HEK293 cells. It is likely that S1P1 and CCR5 physically interact on immune cells expressing both receptors *in vivo*.

S1P1 expression modulates HIV production in CCR5⁺ HOS cells. S1P1 expression at the surface of these cells inhibits HIV production of a one-round virus and a replicative virus when a full single cycle was monitored, an effect that was due to viral entry inhibition. Conversely, S1P1 enhances the production of wild type viral particles over several replicative cycles. This difference can be explained by two observations. First, we observed that S1P1 stimulated HIV transcription, an effect that compensates entry inhibition. Second, whereas the inhibitory effect of S1P1 on entry is observed in the case of infection of the cells by free viral particles, this effect disappears when the HOS cells are infected by contact with chronically infected cells, which is the common mode of intercellular transmission of the virus (47). We can assume that in these conditions, the inhibitory effect on the viral entry no longer prevails, and that the stimulation of HIV transcription is dominant. This is in line with the increase in HIV production we observed when S1P1 was expressed post-entry.

Divergence between the molecular mechanisms operating during cell-free virion and cell-to-cell transmissions have already been described and shed light on why S1P1 coexpression interferes with cell-free, but not with cell-to-cell infection. More immature HIV particles contribute to infection during cell-to-cell infection than during virion-to-cell infection (55). Moreover, some patients sera have been shown to block cell-free virus, but not cell-to-cell spread (55, 56). Likewise, HIV coreceptor antagonists have been reported not to inhibit cell-to-cell infection (56, 57). The difference between cell-free and cell-to-cell transmissions is quantitative with the latter being more efficient in delivering genome copies of HIV-1 across the interface between infected and non-infected cells at the virological synapse (58). As a

consequence cell-to-cell spread is more resistant to antiretroviral drugs than infection originating from cell-free virus (59).

It remains to be determined how S1P1 inhibits entry of a virus that uses CCR5 as a co-receptor. This may be a consequence of S1P1 hindering access of the viral particles to CCR5 when the two receptors are engaged in heteromers. Besides, we observed no inhibition of viral entry when CXCR4 is the co-receptor utilized by the virus. We do not know whether S1P1 and CXCR4 interact or not at the surface of the cells.

For *in vitro* infection experiments, cells are grown into culture medium containing fetal calf serum, a source of sphingosine-1-phosphate. S1P is produced by several cell types and may act in an autocrine or paracrine manner (60) without being released into the medium by the HOS cells. It is therefore possible that the effects we observed result not only from the presence of S1P1 at the membrane, but also from its stimulation by S1P present in the medium and/or produced by the cells. *In vivo*, S1P is abundant in blood and lymph, which implies that co-expression of S1P1 with CCR5 on immune cells will facilitate HIV production in infected circulating cells.

We found no expression of S1P1 at the surface of circulating lymphocytes, similarly to what was described in mice (48), whereas expression was detected on lymphocytes extracted from human lymph nodes. The abundance of S1P in blood versus its low concentration in lymphoid organs (61) explains this result. This may also explain why we did not observe a consistent effect of FTY720-P on PBMC infection *in vitro*. Conversely, FTY720-P reduced infection of *in vitro* differentiated dendritic cells, which express S1P1 at their surface. FTY720-P, in contrast to S1P, induces a rapid internalization and subsequent degradation of S1P1 (51), hence behaving not as an agonist like the natural ligand S1P but as a functional antagonist. We can reasonably assume that FTY720-P eventually inhibits the activation of S1P1 pathway in such a way that it prevents the stimulation of HIV transcription by S1P ligand present in the medium.

We observed a reduction of viremia in FTY720 pre-treated humanized mice. This is consistent with the results obtained by Murooka and collaborators (62) in a similar experiment. These authors concluded that FTY720 effect on viremia is due to the blocking of the egress of migratory T cells from the lymph nodes into efferent lymph vessels, and thus to interruption of T-cell recirculation, thereby limiting HIV dissemination in plasma (62).. The

inhibitory effect of FTY720 on viremia that we both observed may also be explained in part by direct inhibition of viral replication due to neutralization of S1P1 signaling on immune cells by FTY720. The fact that they did not observe a reduced viremia if they post-treat mice with FTY720 after infection with HIV indicates that the effect on T cell impediment of emigration from lymph nodes may be dominant. Similarly, Kersh and collaborators reported no reduction of viremia after treatment of infected macaques with FTY720 (63). However, in their study, the number of animals treated having a detectable viremia before the onset of the treatment was very low.

As S1P1 interferes with the HIV co-receptor function of CCR5, S1P1 may modify the chemokine functions of CCR5. Conversely, it is possible that CCR5 co-expression alters the chemotactic function of S1P1. Moreover, CCR5 stimulation by non-physiological ligands might further modify the response of S1P1 to S1P, and thereby hinder the T-cell egress from thymus and lymph nodes. This raises the interesting possibility that gp120, by binding to CCR5, may impair these physiological processes and participates in the altered T cell production (64), in the altered T cell responses to S1P (65) and in the adenopathies observed in viremic patients (66). Efficient antiretroviral therapy, by lowering HIV envelope production, might alleviate these pathogenic mechanisms.

Material and Methods

GPCR expression quantification in CD4⁺ CCR5⁺ lymphocytes and macrophages. Leucocytes were extracted by buffy coat from 100 ml of blood from healthy donors. CD4 CCR5 (2-3 million) positive cells were sorted using magnetic beads coupled antibodies (Dynabeads Pan Mouse IgG, Invitrogen). Only samples with a minimum of 93% double positive cells. Macrophages were obtained by *in vitro* differentiation with GM-CSF of PBMC isolated by low density gradient centrifugation. RNAs were extracted with Qiamp RNA blood (Qiagen) where an RNase free DNase treatment was included. cDNA was synthesized with the high capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems). Quality of sample was controlled by Q-PCR for correct GAPDH/CCR5 ratio. cDNA from 3 donors were mixed in equimolar amounts and 750 ng of this mixture were loaded on a 384-well microfluidic cards pre-loaded with primers for 361 different GPCR and 14 housekeeping genes as positive control (TaqMan Low Density Arrays from Applied Biosystems). Q-PCR was realized on a ABI Prism 7900HT Sequence Detection System.

Screening for GPCR that modify HIV infection. cDNAs for GPCR were cloned under the control of the CMV promoter into expression vector pcDNA3 or pCMV-Sport6. 50ng of plasmid for each cDNA was transiently co-transfected with lipofectamine into HEK293 CD4⁺ CCR5⁺ cell line (a kind gift of Martine Biart) (40 000 cells /well, 96 wells plate) along with 20 ng of a Renilla luc reporter plasmid (pRL). 36 hours after transfection, cells were infected with the HIV-luc virus, lysed after two days, and both Renilla and Firefly luc activities were measured simultaneously with the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). GPCR that modify Firefly luc activity (HIV reporter gene) while not or barely changing Renilla luc activity in comparison to a mock vector were considered for the next step of screening.

SNAP/CLIP receptor tagging, transfections, fluorescence and tr-FRET measurements.
Plasmid construction. The DNA fragments for CCR5, EDG1 were obtained by PCR amplification from plasmids from the second codon of each gene down to the STOP codon with primers carrying a MluI site and a XbaI site on the 5' and 3' end respectively. S1P1 plasmid is clone EDG0100000 from the Missouri cDNA Resource Center (identical to GenBank ACC #NM_001400 but a silent T558C mutation). The CCR5 wild type plasmid (NM_000579) was previously used in the laboratory. The primers used for amplification are 5'-acgcgtgattatcaagtgtcaagtcc-3' and 5'-tctagactacaagcccacagatatttc-3' for CCR5, 5'-

acgcgtgggcccaccagcgtc-3' and 5'-tctagactaggaagaagagttgacgtttcc-3' for EDG1. The PCR fragments were cloned as blunt ended fragments into the EcoRV site of pBluescript II KS. The digested MluI-XbaI fragment was then introduced into the MluI and XbaI sites in replacement of the mGlu2 gene of plasmids pRK5-HA-SNAP-mGlu2 or pRK5-FLAG-CLIP-mGlu2 described in (39) in replacement of the mGlu2 gene. This results in a fusion of a N-terminal signal peptide followed by a hemagglutinin (HA) or FLAG tag, and the SNAP or CLIP enzyme respectively, with the second residue of each receptor. The SNAP- β_2 AR receptor is described in (67).

Transfections and fluorescence measurements: For saturation curves, HEK293 cells were transfected in triplicate by lipofectamine 2000 (invitrogen) with a constant amount of the CLIP-CCR5 plasmid and increasing amounts of SNAP-GPCR plasmid, and plated at 10^5 cells/well in poly-ornithine-coated 96-well black plates. SNAP-tag is a 20 kDa modified enzyme that can be specifically and covalently labeled with O6-benzylguanine (BG) derivatives, while CLIP-tag is an alternative self-labeling protein that can be specifically labeled in the presence of SNAP-tag with a different class of substrates, O2-benzylcytosine (BC) derivatives. Here the BG substrate is linked to a fluorescent green fluorophore (BG-Green) as tr-FRET acceptor, while CLIP-tag is linked to terbium-cryptate (BC-Lumi4-Tb) as tr-FRET donor. 30 hours after transfection, SNAP and CLIP proteins were labeled with a mixture of BC-Lumi4-Tb (1 μ M) and BG-Green (0.3 μ M) in TagLite (TL) buffer (SNAP/CLIP lab medium, cisbio Bioassays) for 2 hours at 37°C. After labeling, cells were washed four times with TL buffer and the signal recorded in 100 μ l of TL buffer. The emission signal from the Lumi4-Tb (terbium-cryptate) was recorded at 620 nm on a time-resolved fluorimeter (PHERAstar FS, BMG Labtechnologies) after an excitation at 337 nm by a nitrogen laser, and the emission signal from the Green fluorophore was recorded at 520 nm after an excitation by a flash lamp at 485 nm on the same plate reader. The specific fluorescence signal of both fluorophores was determined by subtracting the total fluorescence signal from the cells expressing the cell surface tagged proteins with the non specific signal from mock transfected cells. In the same wells, tr-FRET signal was measured at 520 nm between 60 and 400 μ s after laser excitation at 337 nm. Tr-FRET signal is expressed by the Δ ratio = $(520/620)_{\text{samples}} - (520/620)_{\text{background}}$. The background signal corresponds to cells expressing SNAP- and CLIP-tagged proteins labeled with a mixture of BC-Lumi4-Tb (1 μ M) and O6-BG (0.3 μ M) as previously described. O6-BG is used to prevent low unspecific SNAP-tag labeling with BC-Lumi4-Tb.

Cell acquisition and culture. CD4⁺ HOS cells (Human OsteoSarcoma cells, AIDS Reagent Program, Rockville, MD), HEK-293T cells (simian virus 40 T antigen-transformed human embryonic kidney 293T, Genethon) and HeLa-LTR.Luc cells (expressing an integrated *luc* reporter gene under the control of the HIV-1 LTR promoter) (46) were cultivated in DMEM medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mmol/L L-glutamin (Lonza, ref. BE17-605E), 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin (Lonza, ref. DE17-602E) at 37°C and 5% CO₂. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from healthy blood donors by density gradient centrifugation on a lymphocytes separation medium (Eurobio, ref. CMSMSL01-01) and cultivated at 2x10⁶ cells/ml in RPMI-1640 medium supplemented as DMEM at 37°C, 5% of CO₂. To get macrophages and dendritic cells, monocytes were isolated from PBMC with CD14 antibody-coated magnetic beads (Milteny, ref 130-050-201). The purity of CD14-positive cells was verified by flow cytometry (FACSCalibur; BD Bioscience, Rungis, France) using a labeled anti-CD14 antibody (BD Biosciences, ref. 555395). After removing non-adherent cells, adherent cells were washed and cultivated for 5 days in RPMI medium supplemented as previously with 10 ng/ml recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF, Immunotools, ref. 11343123) for macrophages, or for 7 days with 10 ng/ml GM-CSF and 50 ng/ml IL4 (Immunotools, ref. 11340043) for dendritic cells. Lymphocytes were extracted from the lymph nodes by several injections of PBS after perforation into R with a syringe needle, and washed once with PBS.

Transduction. To produce HIV vectors that express CCR5, CXCR4, LacZ and S1P1 genes, pWPXL-CCR5 (68), pHRB3-CXCR4, pHRCMV-lacZ (69) and pWPXL-S1P1 plasmids were cotransfected with HIV packaging pAX2 plasmid and pMD2G plasmid encoding for the vesicular stomatitis virus (VSV) envelop glycoprotein in HEK-293T cells by the calcium phosphate method. The pWPXL-S1P1 plasmid was obtained by cloning a BamH1-Spe1 fragment after PCR amplification a S1P1 cDNA into the pWPXL lentiviral vector (addgene.org). Supernatants were collected at day 2 after transfection and concentrated on sucrose (Sigma Aldrich, ref. S7903) by ultracentrifugation at 26000 rpm for 1h30 at 4°C. HOS cells were plated in 24-well culture plates and were first transduced with the HIV-CCR5 vector (70) or the HIV-CXCR4, and then with HIV-S1P1 or HIV-LacZ vectors in 8 µg/ml polybrene (Sigma, ref. 107689) overnight. Cells were washed, amplified and controlled for CCR5 and S1P1 membrane expression by flow cytometry (FACSCalibur, BDBiosciences) by labeling cells with CD195 (BD Pharmingen, ref. 556889) and EDG1 (R&D, ref. MAB2016)

monoclonal antibodies, respectively. HeLa-LTR.Luc cells were transduced with HIV-S1P1 or HIV-LacZ vectors with the same amount of virus in 8 µg/ml polybrene (Sigma, ref. 107689). The cells were washed 24h after transduction, harvested 96h post transduction, and luc activity was measured in cellular extracts using a luc-based assay system (Promega, ref. E1500).

Pseudotyped virion production and single-round infections. To produce replication-defective HIV virions, the pNL4.3-Luc.R⁻E⁻ transfer plasmid harboring a defective viral *env* gene with a *firefly luc* gene inserted in viral *nef* gene (AIDS Reagent Program) was cotransfected with either the R5 envelop plasmid pCMV-Ad8-Env plasmid, the X4 envelop plasmid VB34 (NL4.3-Env) or the VSV-G envelop plasmid pDM2G (AIDS Research and Reference Reagent Program) into HEK-293T cells at a molecular ratio of 2:1. The virions, named R5-Luc, X4-Luc or VSV-G-Luc were collected 48h post-transfection, filtrated at 0.45 µm and concentrated on sucrose (Sigma Aldrich, ref. S7903) by centrifugation at 26 000 rpm for 1h30 at 4°C. For the one-round infection assay, HOS cells were cultivated in triplicates into 96-well culture plates at a density of 0.25 x10⁶ cells/ml and infected with different amount of Ad8-Luc, X4-Luc or VSV-G-Luc viruses. When necessary, cells were pre-incubated for one hour with FTY720-P (Echelon, ref. b 0721) before infection. Cells were washed twice in phosphate buffered saline (PBS) 24h post-infection and kept in culture for 72h. Cells were then washed once in PBS, lysed with 50 µl lysis buffer and the firefly luc activity was measured on a luminometer using a Promega kit (Luc Assay System, Promega, Charbonnieres, France, ref. E1500). PBMC were activated for 72h by culture in medium supplemented with 1 µg/ml phytohemagglutinin M (PHA, Sigma, ref. 61764) and 100 U/ml recombinant human interleukin 2 (IL2, Peprotech, ref. 200-02), washed in RPMI, incubated into 96-well culture plates in triplicate at a density of 1x10⁶ cells/ml. Cells were then infected with different amount of Ad8-Luc, washed twice in PBS 24h post-infection and kept in culture for 72h. Cells were then washed once in PBS, lysed with 50 µl lysis buffer and the firefly luc activity was measured with a luminometer using a Promega kit (Luc Assay System, Promega, Charbonnieres, France, ref. E1500). Cell viability was quantified in a countess automated cell counter using cell counting chamber slides (Invitrogen, ref. C10283) after staining with 0.4% trypan-blue (Sigma, ref. T8154).

Infection assays with replicative virus. R5 HIV-1 (Ad8) virus obtained from the AIDS Research and Reference Reagent Program was expanded in HOS-CD4-CCR5 cells (AIDS

Research and Reference Reagent Program, Bethesda, Maryland, USA). X4 HIV-1 (NL4.3) DNA from the AIDS Research and Reference Reagent program was transfected into HEK-293T cells by the calcium-phosphate method, and collected virus was then amplified in the human CEM cell line. HOS cells were plated in 24-well culture plates at a density of 0.04×10^6 cells/ml (When necessary, cells were incubated for one hour with FTY720-P (Echelon, ref. B-0721) at indicated concentrations). Cells were infected in triplicate with 10 ng/ml of the primary R5 strain Ad8 or of the primary X4 strain NL4.3 overnight, washed with PBS and kept in culture for 10 days or more with adjustment of the cells number twice a week. Virus production was monitored by measuring p24 gag concentration in the cell supernatant by using a commercial enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay (Innotest HIV AG MAB, Ingen, ref. 80563). For cell-cell contact infection of HOS cells, MOLT cells were pre-infected with 10 ng/ml of p24 equivalents of the Ad8 replicative virus at a density of 0.2×10^6 cells/ml for 18 hours, washed, and cultured another 6 days at the same density, and infection was monitored by p24 ELISA. 40 000 HOS cells were plated in 1 ml of medium in 24-well plates. S1P1 or lacZ HOS cells were then infected with 10 000 MOLT cells/ml for 5 hours, washed twice and cultured. Supernatant was collected at 24h, 48h and 72h after infection and viral RNA was quantified. PBMC were activated for 72h in RPMI-1640 medium or in X-VIVO (Lonza, ref. BE04-418F) supplemented with 1 μ g/ml phytohemagglutinin M (PHA, Sigma, ref. 61764) and 100 U/ml interleukin 2 (IL2, Peprotech, ref. 200-02), washed in RPMI or in X-VIVO, and incubated into 96-well culture plates in triplicate at a density of 1×10^6 cells/ml. Cells were incubated with FTY720-P (Echelon, ref. B-0721), and then infected with 40 ng gag p24 of Ad8 HIV-1 virus (R5 strain). Infected cells were washed twice in PBS 18h post-infection and incubated for 11 days with adjustment of the cells number twice a week. Viral production was quantified by measuring viral gag p24 protein in culture supernatant using an ELISA kit (Innotest HIV AG MAB, Ingen, ref. 80563). Dendritic cells were plated at a density of 0.5×10^6 cells/ml in 24-well culture plates and incubated with 100 nM FTY720-P (Echelon, ref. B-0721) for one hour before infection. Cells were then infected with 5 ng/ml gag p24 of Ad8 HIV-1 virus. Cells were then washed and cultured in RPMI. Twice a week, FTY720-P or a control at the same dilution is added to the supernatant and virus production was monitored by measuring p24 gag concentration in the cell supernatant by using a commercial enzyme-linked immunosorbent (ELISA) assay (Innotest HIV AG MAB, Ingen, ref. 80563). There was no difference in cell viability between control and treated cells during the infection periods.

Generation of hu-PBL-SCID mice. SCID mice are from *cb17/Icr-Prkdc^{scid}/Crl* genotype. Those immunodepressed mice were bred under specific-pathogen-free conditions in A3/L3 animal house facility. After one week of acclimation, animals were engrafted by intra-peritoneal injection of $30 \cdot 10^6$ PBMC obtained by Ficoll-Paque density gradient centrifugation of cytopheresis ring leukocytes from a healthy blood donor. Reconstitution was evaluated at day 13 by checking for plasma level of human immunoglobulin. Mice with total hu-Ig concentration higher than $100 \mu\text{g/ml}$ were infected with 1000 TCID₅₀ of JR-CSF HIV-1 virus (R5 virus) in $100 \mu\text{l}$. Daily force-feeding with $100 \mu\text{l}$ FTY720 (Cayman, sold by Interchim ref. BM8045) dissolved at $60 \mu\text{g/ml}$ in distilled water is begun one day before infection and is carried on for 12 days. Untreated mice were force-feeding with the same amount of distilled water. At days 6, 9 and 12 post infection, $50 \mu\text{l}$ blood was withdrawn retro-orbitally and diluted in 1 ml human plasma to dose viral load. with mpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 qPCR test (Roche Diagnostics, ref. 05212294190). Values lower than 20 RNA copies/ml (400 copies/ml in mice serum) are considered as zero (detection threshold).

Real-time PCR. Virions were treated with 1 U/ml RNase-free DNase 1h at 37°C with 10 mM MgSO₄. 24 post-infection, infected cells were washed in PBS and resuspended in lysis buffer (10 mmol/l Tris pH 8.0; 0.5 mmol/l EDTA; 0.0001 % SDS; 0.001% Triton; $100 \mu\text{g/ml}$ Proteinase K), incubated for 3h at 50°C and 10 min at 95°C . For the detection of early and late reverse transcripts, DNA was amplified with the appropriate primers at 70°C (5'-*agcctgggagctctctggcta*-3' and 5'-*cagacgggcacacactactttg*-3' for early transcripts or 5'-*caataagctgccttgagtctca*-3' and 5'-*cgagagatctcctctggcttta*-3' for late transcripts) in a LightCycler (Roche) with SYBR Green following the manufacturer's recommendations. Viral DNA was normalized by cellular genomic S14. Standard curve was established by analyzing serial dilution of a positive control plasmid. The PCR cycle at which the amplification signal entered the exponential range was used to quantify the cellular DNA.

Flow cytometry. For antibody staining, 2×10^5 cells were incubated in PBS supplemented with 0.2% bovine serum albumin (BSA, Sigma, ref. A4378) with anti-human CCR5-PE-Cy5 antibody (BD Pharmingen, ref. 556889), anti-human EDG1 antibody (R&D, ref. MAB2016) or an isotype control (BD Pharmingen, ref. 555575 and Beckman coulter, ref. 731597) for 1h on ice at a final concentration of $10 \mu\text{g/ml}$. After washing, cells were incubated with a 1:100 dilution of Goat F(ab')₂ fragment anti-mouse IgG (H+L)-FITC (Beckman Coulter, ref. PN

IM0819) for 1h on ice. Cells were then washed, fixed in BD Cell Fix (BD Biosciences, ref. 340181) and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson).

Statistical analysis. All data are representative of at least three different experiments. Values are expressed as the mean +/- SD. Differences in infection and LTR expression were analyzed with the unpaired Student's *t* test.

Aknowlegments: Cisbio Bioassays provided BC-Lumi4-Tb, BG-Green and O6-BG tr-FRET reagents. GPCR cDNA were obtained from Missouri S&T cDNA Resource Center at Rolla MO USA, geneservice in Cambridge UK or RZPD Deutches Ressourcenzentrum für Genomforshung GmbH in Berlin, or were kind gifts of authors. We thank Monsef Benkirane, Yamina Bannasser and Mathieu Ringeard for their help with dendritic cells obtention. We warmly thank Marc Sitbon, Naomi Taylor, Martine Biard, Hans Yssel, Stéphane Marullo, Eric Trinquet, Thierry Durroux and Jean-Philippe Pin for helpful discussions and to Jacques Corbeil for his critical reading of the manuscript. We are grateful to the “Etablissement Français du Sang” of Montpellier for providing cytapheresis ring leukocytes, to Annie Ramouneau-Pigot from Montpellier St-Eloi Hospital for providing lymph nodes, and to persons who volunteered for blood samples. Informed consent was obtained from the donors. This work was supported by grants from Sidaction and from the “Agence Nationale de Recherche sur le SIDA et les Hépatites Virales” (ANRS). CD was funded by a fellowship from ANRS.

References

1. Pin JP, *et al.* (2007) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXVII. Recommendations for the recognition and nomenclature of G protein-coupled receptor heteromultimers. *Pharmacol Rev* 59(1):5-13.
2. Hillion J, *et al.* (2002) Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors. *J Biol Chem* 277(20):18091-18097.
3. Pfeiffer M, *et al.* (2002) Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem* 277(22):19762-19772.
4. Xu J, *et al.* (2003) Heterodimerization of alpha 2A- and beta 1-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 278(12):10770-10777.
5. Jordan BA & Devi LA (1999) G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399(6737):697-700.
6. Mellado M, *et al.* (2001) Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways. *EMBO J* 20(10):2497-2507.
7. Terrillon S & Bouvier M (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. *EMBO Rep* 5(1):30-34.
8. George SR, *et al.* (2000) Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem* 275(34):26128-26135.
9. Charles AC, *et al.* (2003) Coexpression of delta-opioid receptors with micro receptors in GH3 cells changes the functional response to micro agonists from inhibitory to excitatory. *Mol Pharmacol* 63(1):89-95.
10. Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, & Mitaku S (2002) Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* 520(1-3):97-101.
11. Schoneberg T, *et al.* (2004) Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacol Ther* 104(3):173-206.
12. Issafras H, *et al.* (2002) Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *J Biol Chem* 277(38):34666-34673.

13. Suzuki S, Chuang LF, Yau P, Doi RH, & Chuang RY (2002) Interactions of opioid and chemokine receptors: oligomerization of mu, kappa, and delta with CCR5 on immune cells. *Exp Cell Res* 280(2):192-200.
14. Chen C, *et al.* (2004) Heterodimerization and cross-desensitization between the mu-opioid receptor and the chemokine CCR5 receptor. *Eur J Pharmacol* 483(2-3):175-186.
15. Rodriguez-Frade JM, Mellado M, & Martinez AC (2001) Chemokine receptor dimerization: two are better than one. *Trends Immunol* 22(11):612-617.
16. O'Boyle G, *et al.* (2012) Chemokine receptor CXCR3 agonist prevents human T-cell migration in a humanized model of arthritic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(12):4598-4603.
17. Isik N, Hereld D, & Jin T (2008) Fluorescence resonance energy transfer imaging reveals that chemokine-binding modulates heterodimers of CXCR4 and CCR5 receptors. *PLoS One* 3(10):e3424.
18. Steele AD, Szabo I, Bednar F, & Rogers TJ (2002) Interactions between opioid and chemokine receptors: heterologous desensitization. *Cytokine Growth Factor Rev* 13(3):209-222.
19. Steele AD, Henderson EE, & Rogers TJ (2003) Mu-opioid modulation of HIV-1 coreceptor expression and HIV-1 replication. *Virology* 309(1):99-107.
20. Szabo I, *et al.* (2003) Selective inactivation of CCR5 and decreased infectivity of R5 HIV-1 strains mediated by opioid-induced heterologous desensitization. *J Leukoc Biol* 74(6):1074-1082.
21. El-Hage N, *et al.* (2013) A novel bivalent HIV-1 entry inhibitor reveals fundamental differences in CCR5 - mu- opioid receptor interactions in human glia. *AIDS*.
22. Chakera A, Seeber RM, John AE, Eidne KA, & Greaves DR (2008) The duffy antigen/receptor for chemokines exists in an oligomeric form in living cells and functionally antagonizes CCR5 signaling through hetero-oligomerization. *Mol Pharmacol* 73(5):1362-1370.
23. Huttenrauch F, Pollok-Kopp B, & Oppermann M (2005) G protein-coupled receptor kinases promote phosphorylation and beta-arrestin-mediated internalization of CCR5 homo- and hetero-oligomers. *J Biol Chem* 280(45):37503-37515.
24. Shen W, *et al.* (2000) Down-regulation of the chemokine receptor CCR5 by activation of chemotactic formyl peptide receptor in human monocytes. *Blood* 96(8):2887-2894.

25. Le Y, *et al.* (2001) Desensitization of chemokine receptor CCR5 in dendritic cells at the early stage of differentiation by activation of formyl peptide receptors. *Clin Immunol* 99(3):365-372.
26. Li BQ, *et al.* (2001) The synthetic peptide WKYMVm attenuates the function of the chemokine receptors CCR5 and CXCR4 through activation of formyl peptide receptor-like 1. *Blood* 97(10):2941-2947.
27. Zhang N, *et al.* (2006) Adenosine A2a receptors induce heterologous desensitization of chemokine receptors. *Blood* 108(1):38-44.
28. By Y, *et al.* (2010) Monoclonal antibody-assisted stimulation of adenosine A2A receptors induces simultaneous downregulation of CXCR4 and CCR5 on CD4+ T-cells. *Human immunology* 71(11):1073-1076.
29. Branch DR, *et al.* (2002) VPAC1 is a cellular neuroendocrine receptor expressed on T cells that actively facilitates productive HIV-1 infection. *Aids* 16(3):309-319.
30. Liu Y, *et al.* (2000) Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 106(8):951-961.
31. Matloubian M, *et al.* (2004) Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427(6972):355-360.
32. Choi JW, Lee CW, & Chun J (2008) Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: an update. *Biochim Biophys Acta* 1781(9):531-539.
33. Zhang G, Contos JJ, Weiner JA, Fukushima N, & Chun J (1999) Comparative analysis of three murine G-protein coupled receptors activated by sphingosine-1-phosphate. *Gene* 227(1):89-99.
34. Allende ML, Dreier JL, Mandala S, & Proia RL (2004) Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem* 279(15):15396-15401.
35. Lee MJ, *et al.* (1999) Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 99(3):301-312.
36. Allende ML, Yamashita T, & Proia RL (2003) G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. *Blood* 102(10):3665-3667.
37. Garcia JG, *et al.* (2001) Sphingosine 1-phosphate promotes endothelial cell barrier integrity by Edg-dependent cytoskeletal rearrangement. *J Clin Invest* 108(5):689-701.
38. Singleton PA, Dudek SM, Chiang ET, & Garcia JG (2005) Regulation of sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cytoskeletal rearrangement and barrier enhancement

- by S1P1 receptor, PI3 kinase, Tiam1/Rac1, and alpha-actinin. *FASEB J* 19(12):1646-1656.
39. Doumazane E, *et al.* (2011) A new approach to analyze cell surface protein complexes reveals specific heterodimeric metabotropic glutamate receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25(1):66-77.
 40. Mercier JF, Salahpour A, Angers S, Breit A, & Bouvier M (2002) Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 277(47):44925-44931.
 41. Angers S, Salahpour A, & Bouvier M (2001) Biochemical and biophysical demonstration of GPCR oligomerization in mammalian cells. *Life sciences* 68(19-20):2243-2250.
 42. Terrillon S, *et al.* (2003) Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis. *Molecular endocrinology* 17(4):677-691.
 43. Okamoto H, *et al.* (1998) EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca²⁺ mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylyl cyclase inhibition. *The Journal of biological chemistry* 273(42):27104-27110.
 44. Windh RT, *et al.* (1999) Differential coupling of the sphingosine 1-phosphate receptors Edg-1, Edg-3, and H218/Edg-5 to the G(i), G(q), and G(12) families of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 274(39):27351-27358.
 45. Kluk MJ & Hla T (2002) Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* 1582(1-3):72-80.
 46. Treand C, *et al.* (2006) Requirement for SWI/SNF chromatin-remodeling complex in Tat-mediated activation of the HIV-1 promoter. *EMBO J* 25(8):1690-1699.
 47. Chen P, Hubner W, Spinelli MA, & Chen BK (2007) Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. *J Virol* 81(22):12582-12595.
 48. Pappu R (2007) Promotion of Lymphocyte Egress into blood and lymph by distinct sources of S1P. *Science* 316.

49. Spiegel S & Milstien S (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(5):397-407.
50. Brinkmann V (2007) Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther* 115(1):84-105.
51. Graler MH & Goetzl EJ (2004) The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB J* 18(3):551-553.
52. Huwiler A & Pfeilschifter J (2008) New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets. *Biochem Pharmacol* 75(10):1893-1900.
53. Song J, *et al.* (2008) A novel sphingosine 1-phosphate receptor agonist, 2-amino-2-propanediol hydrochloride (KRP-203), regulates chronic colitis in interleukin-10 gene-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther* 324(1):276-283.
54. Sanna MG, *et al.* (2004) Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J Biol Chem* 279(14):13839-13848.
55. Hubner W, *et al.* (2009) Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses. *Science* 323(5922):1743-1747.
56. Chen P, Hubner W, Spinelli MA, & Chen BK (2007) Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. *Journal of virology* 81(22):12582-12595.
57. Blanco J, *et al.* (2004) High level of coreceptor-independent HIV transfer induced by contacts between primary CD4 T cells. *The Journal of biological chemistry* 279(49):51305-51314.
58. Del Portillo A, *et al.* (2011) Multiploid inheritance of HIV-1 during cell-to-cell infection. *Journal of virology* 85(14):7169-7176.
59. Sigal A, *et al.* (2011) Cell-to-cell spread of HIV permits ongoing replication despite antiretroviral therapy. *Nature* 477(7362):95-98.
60. Rosen H & Goetzl EJ (2005) Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nat Rev Immunol* 5(7):560-570.
61. Pyne S & Pyne NJ (2000) Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *The Biochemical journal* 349(Pt 2):385-402.

62. Murooka TT, *et al.* (2012) HIV-infected T cells are migratory vehicles for viral dissemination. *Nature* 490(7419):283-287.
63. Kersh EN, *et al.* (2009) Evaluation of the lymphocyte trafficking drug FTY720 in SHIVSF162P3-infected rhesus macaques. *J Antimicrob Chemother* 63(4):758-762.
64. Resop RS, Douaisi M, Craft J, & Uittenbogaart C (2013) HIV-1 infection reduces emigration of mature thymocytes from the human thymus by downregulation of the sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1. *IAS 2013. 7th IAS conference on HIV pathogenesis, treatment and prevention.*
65. Mudd JC, *et al.* (2013) Impaired T cell responses to sphingosine-1-phosphate in HIV-1 infected lymph nodes. *Blood.*
66. Lederman MM & Margolis L (2008) The lymph node in HIV pathogenesis. *Semin Immunol* 20(3):187-195.
67. Maurel D, *et al.* (2008) Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization. *Nat Methods* 5(6):561-567.
68. Desmetz C, *et al.* (2007) Cell surface CCR5 density determines the intensity of T cell migration towards rheumatoid arthritis synoviocytes. *Clin Immunol* 123(2):148-154.
69. Naldini L, *et al.* (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272(5259):263-267.
70. Lin YL, *et al.* (2002) Cell surface CCR5 density determines the postentry efficiency of R5 HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24):15590-15595.
71. Laguette N, *et al.* (2011) SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474(7353):654-657.

Figure Legends

Figure 1. GPCR co-expressed with CCR5 in CD4 T cells and macrophages. Expression of 270 GPCR was measured by q-PCR on microfluidic cards after extraction of mRNA from blood CD4⁺ CCR5⁺ lymphocytes and *in vitro* differentiated macrophages was determined. Each GPCR/CCR5 ratio is represented for the receptors for which expression was detected.

Figure 2. Tr-FRET saturation assays reveal that CCR5 form heteromers with S1P1. A. tr-FRET saturation curve of CLIP-CCR5 with SNAP-S1P1. Cells were co-transfected with a constant amount of CLIP-CCR5 plasmid (2 ng, ▲; 4ng, ▼; 8ng, ■ or 16 ng, ●) and increasing amounts of SNAP-S1P1 plasmid (1ng to 50 ng), and labelled with BC-Lumi4-Tb and BG-green. Between curves, the amount of CLIP-CCR5 plasmid was reduced by twofold to lower receptor density at the membrane. tr-FRET signal normalized with the CLIP-CCR5 expression signal is represented in function of SNAP-S1P1/CLIP-CCR5 expression ratio. Data are mean of triplicates from a typical experiment. Note that the two curves with the lowest CLIP-CCR5 amount are superposed. The curves are obtained by non linear regressions with $R^2 = 0.9940, 0.9901, 0.9984$ and 0.9986 for CLIP-CCR5 = 2ng, 4ng, 8ng and 16ng, respectively. B. tr-FRET saturation curve of CLIP-CCR5 with SNAP-S1P1, -CCR5, or β_2 AR. For each curve, cells were co-transfected with a constant amount of CLIP-CCR5 plasmid (2 ng) and increasing amounts of the SNAP plasmid (1 ng to 25 ng) and labeled as in A. tr-FRET signal is normalized as in A, and represented in function of SNAP-S1P1 (■), -CCR5 (●) or β_2 AR (▼) /CLIP-CCR5 expression ratio. Data are mean of triplicates from a typical experiment. The curves are obtained by non linear regressions with $R^2 = 0.9741$ and 0.9844 for SNAP-CCR5 and SNAP-S1P1 respectively, and by a linear regression for SNAP- β_2 AR ($p < 0.001$).

Figure 3. S1P1 expression on HOS cells transduced with S1P1 or LacZ. CCR5⁺ HOS cells were transduced with S1P1 or LacZ. CCR5 and CCR5 expression at the surface of cells was analyzed by flow cytometry after immunolabelling. The isotype control is represented in (A). (B) shows S1P1 expression at the surface of cells transduced with LacZ and (C) represents cells transduced with S1P1. CCR5 expression was also controlled in those cells: (D) isotype control, (E) CCR5 expression at the surface of cells transduced with LacZ and (F) CCR5 expression at the surface of cells transduced with S1P1.

Figure 4. S1P1 decreases one-round infection in HOS cells. CCR5⁺S1P1⁺ HOS (open bars) and CCR5⁺LacZ⁺ HOS (closed bars) cells were exposed overnight, in triplicate, to various amount of *env* defective HIV harboring the luc gene and pseudotyped with an R5 envelope. Luc activity was measured 72h post-infection. With 20 ng of virus, the difference is X 2.12 +/- 0.26, p=0.0028.

Figure 5. S1P1 expression has no effect on infection by VSV-G pseudotyped virions. CCR5⁺S1P1⁺ HOS (open bars) and CCR5⁺LacZ⁺ HOS (closed bars) cells were exposed in triplicate to various amount of the *env*- one-round virus pseudotyped with a CXCR4 (A) or VSVG (B) envelop. For infection by the CXCR4-pseudotyped virus, the HOS CCR5⁺ cells were first transduced with a lentiviral vector to express CXCR4, and transduced again with S1P1 or LacZ as described previously. Infection was quantified by measure of luc activity in cell lysates 72h post-infection as above.

Figure 6. Diminution of viral RNA production after HOS infection by a replicative HIV-R5 virus. CCR5⁺S1P1⁺ (●) and CCR5⁺LacZ⁺ (■) HOS cells were infected for 5h with 10 ng/ml of p24 equivalents of the R5 strain Ad8, washed and cultured. Viral RNA was quantified by RT-qPCR with mpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 RT-qPCR test in the cell supernatant at 24h, 48h and 72h post-infection. At 48h and 72h, inhibition is X 15 and X 8, respectively.

Figure 7. S1P1 expression stimulates HIV transcription. A. S1P1 activates gene expression from the LTR in HeLa cells. HeLa harboring a HIV-1 LTR-driven luc gene were transduced with the equal units of S1P1 or LacZ lentiviral vectors, and S1P1 expression was checked by flow cytometry. Luciferase activity was measured in triplicate for both strains. Inhibition is X 10.6 +/- 1.0, p < 0.0001. B. S1P1 stimulates post-entry steps of the viral cycle in HOS cells. CCR5⁺ HOS cells were transduced with the same amount of S1P1 and LacZ plasmids as previously described. 24 hours post-transduction, CCR5⁺S1P1⁺ HOS and CCR5⁺LacZ⁺ HOS cells were exposed over-night, in triplicate, to 10 ng of p24 equivalents of defective virions harboring the luc gene and pseudotyped with an R5 envelope. Luc activity was measured 72h post-infection by luminometry. Increase is X 2.0 +/- 0.3, p = 0.0002.

Figure 8. S1P1 expression increases HIV production in the course of a replicative infection. A. S1P1 enhances a single cycle of viral production in HOS cells infected by cell-to-cell contact. MOLT cells were infected with 20 ng/ml of p24 equivalents of the R5 strain

Ad8 and kept in culture for one week. CCR5⁺S1P1⁺ (●) and CCR5⁺LacZ⁺ (■) HOS cells were infected, in triplicate, for 24h with MOLT cells pre-infected with a replicative R5-HIV, washed and cultured. Infection was monitored by measuring p24 concentration in the cell supernatant by ELISA at 48h and 72h post-infection. At 72h, the difference is X 1.5 +/- 0.3, p = 0.0522. B. S1P1 enhances replicative R5-HIV production in HOS cells. CCR5⁺S1P1⁺ (●) and CCR5⁺LacZ⁺ (■) HOS cells were infected over-night, in triplicate, with 10 ng/ml of p24 equivalents of the R5-HIV strain Ad8, washed and cultured for 11 days with adjustment of cell number twice a week. Infection was monitored by measuring p24 concentration in the cell supernatant by ELISA. At day 11, the difference is X 23 +/- 6, p=0.0008. C. S1P1 enhances replicative X4-HIV production in HOS cells. CCR5⁺S1P1⁺ (●) and CCR5⁺LacZ⁺ (■) HOS cells were infected over-night, in triplicate, with 10 ng/ml of the X4-strain NL4.3 HIV virus, washed 24h post-infection and cultured for 11 days with adjustment of cell number twice a week. Infection was monitored by measuring p24 concentration in the cell supernatant using ELISA.

Figure 9. S1P1 expression on primary cells. Cell surface expression of S1P1 was assessed by flow cytometry using an anti-S1P1 antibody compared to a negative control isotypic antibody, labeled with a secondary FITC-conjugated anti-mouse Ig a.) dendritic cells and b.) lymph node lymphocytes.

Figure 10. The S1P1 functional antagonist FTY720-P inhibits HIV-1 R5 infection in vitro and in vivo. A. FTY720-P reduces replicative R5-HIV infection in dendritic cells. Dendritic cells differentiated as above were pre-incubated with vpx containing virus-like particles in order to neutralize SAMHD1, the viral restriction factor expressed in these cells (71). DCs were then exposed to 100 nM of FTY720-P or vehicle for one day prior infection and infected over-night, in triplicate, with 5 ng/ml of p24 equivalents of the R5 strain Ad8, washed and cultured. FTY720-P was added again on the days of p24 quantification by replacement of 100 µl of supernatant. PBMC were isolated by density centrifugation and activated with PHA/IL2 as described previously for 72h, washed in RPMI and cultured in RPMI/IL2. Cells were pre-incubated for 1h with FTY720-P at 500 nM or with vector prior infection, and then infected for 24h with 47 ng of p24 equivalents of the R5 strain Ad8, washed and cultured in RPMI complemented with FTY720-P (■) or a control (●) with adjustment of the cells number twice a week. Infection was monitored by measuring p24 concentration in the cell supernatant by ELISA. B. FTY720-P inhibits replicative R5-HIV

infection in humanized SCID mice. HU-PBL-SCID mice were force fed daily with FTY720 at 0.3 mg/kg or vehicle, starting one day before infection with a replicative R5 HIV-1 virus, and for 12 more days. Viral load was checked at days 6, 9 and 12 post-infection. Values lower than 20 RNA copies/ml (400 copies/ml in mice serum) are considered as zero. Average viremia for all samples (vehicle or FTY720) were pooled. The difference of viraemia is 12.8 ($p = 0.0243$).

Table 1: S1P receptor expression in CD4⁺ CCR5⁺ lymphocytes and macrophages.

S1P receptor	S1PR / CCR5 in PBMC	S1PR/ CCR5 in macrophages
S1P1/EDG1	33	0.1
S1P2 /EDG5	2	2
S1P3/EDG3	0,04	0.01
S1P4/EDG6	0,5	0.1
S1P5/EDG8	2	0.03

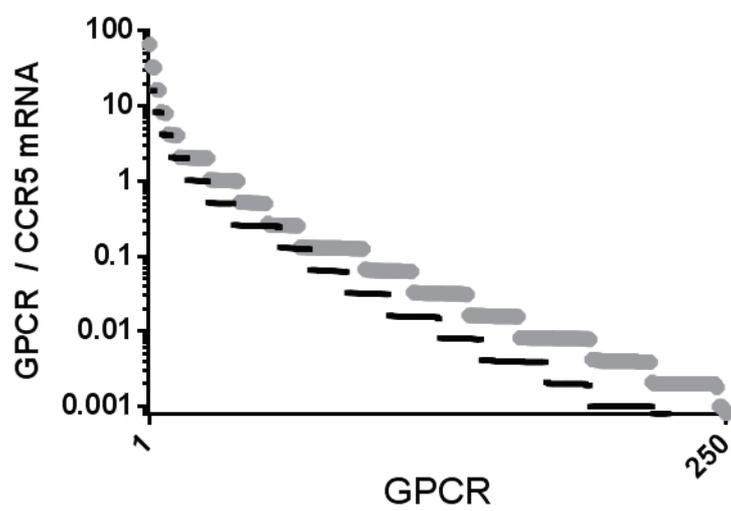
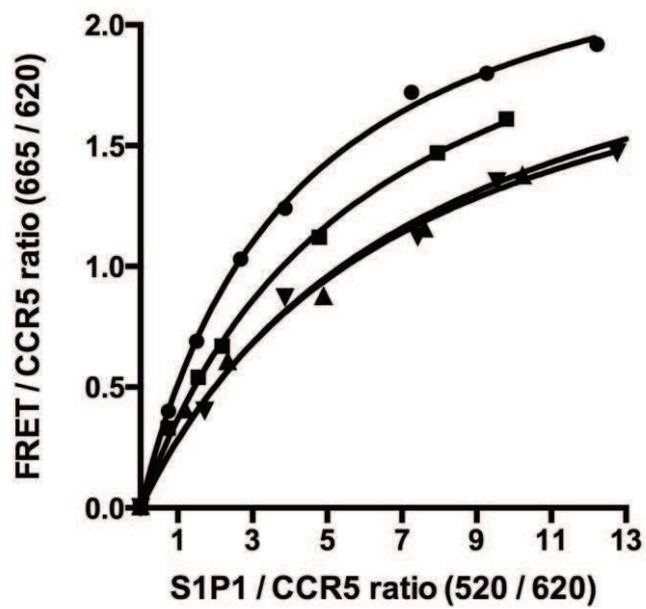


Figure 1

A)



B)

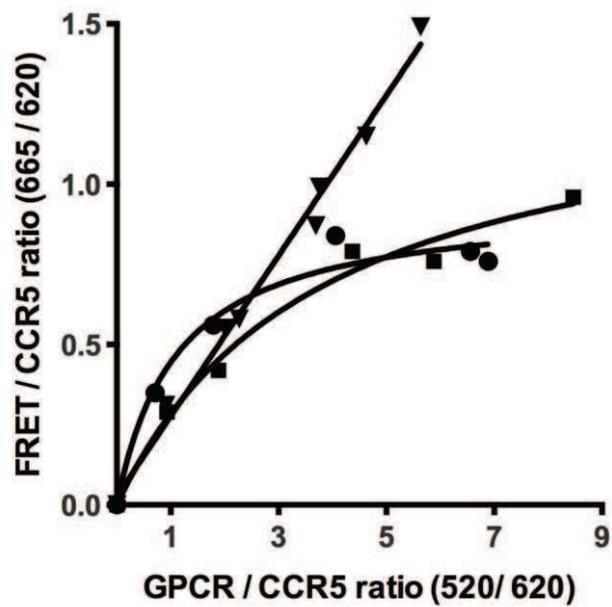


Figure 2

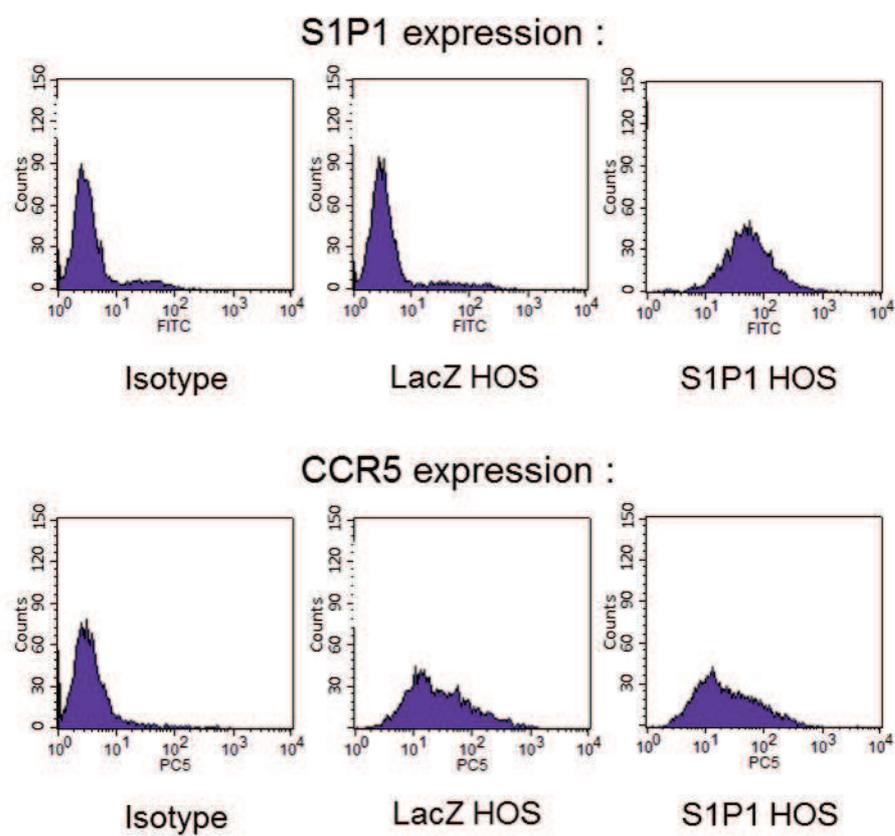


Figure 3

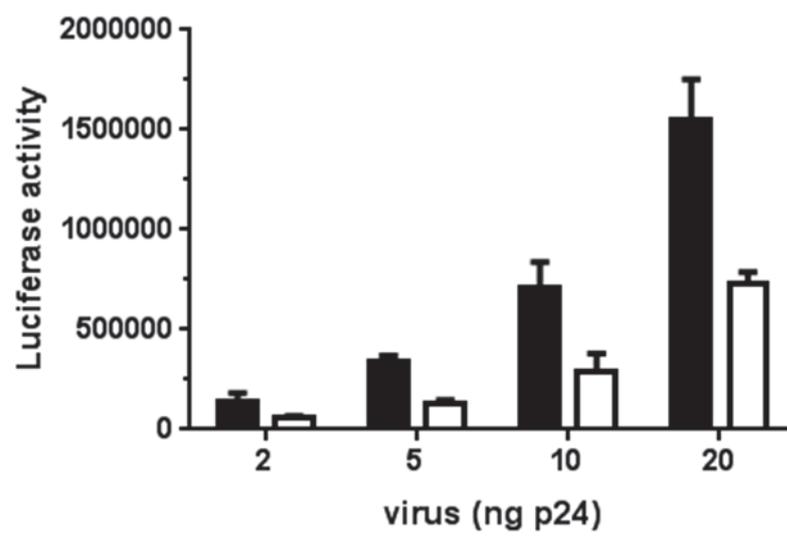


Figure 4

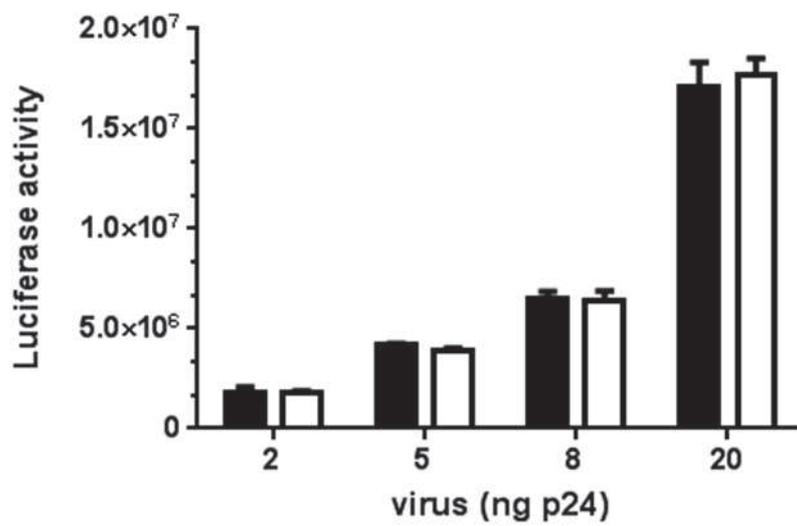


Figure 5

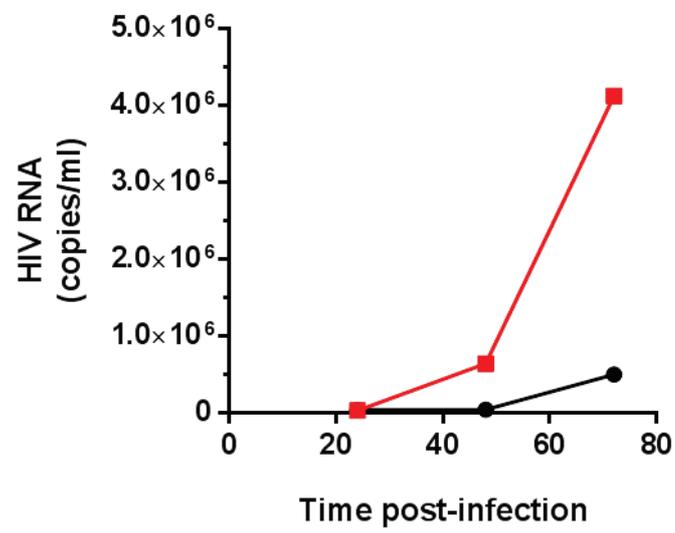
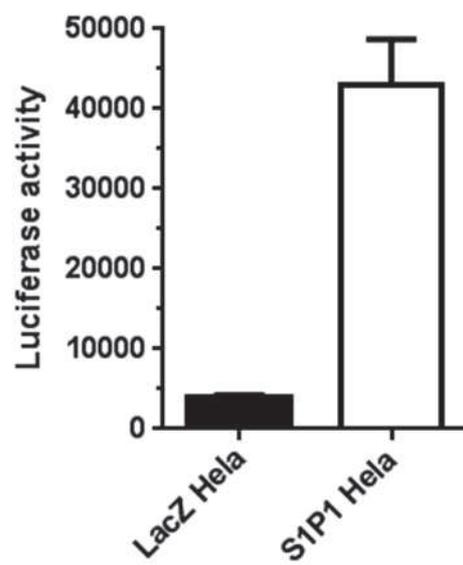


Figure 6

A)



B)

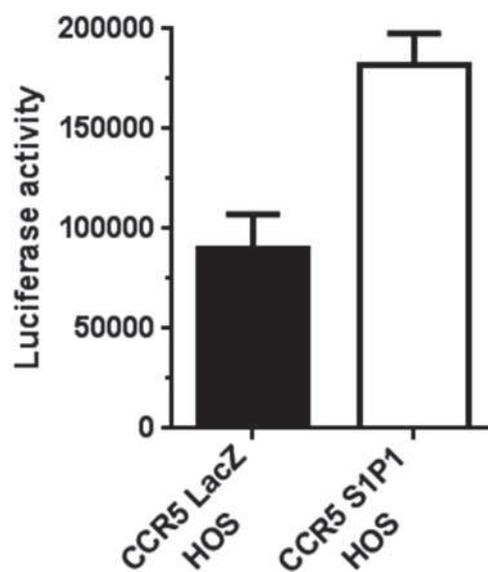
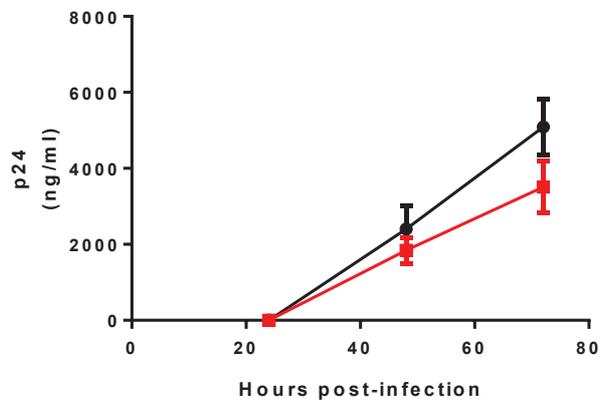
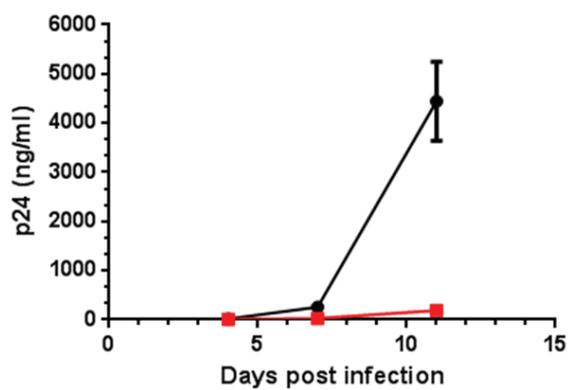


Figure 7

A)



B)



C)

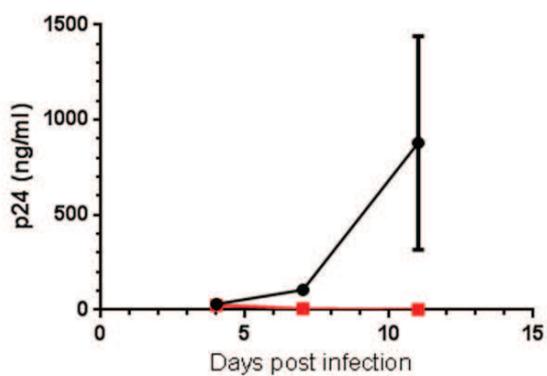
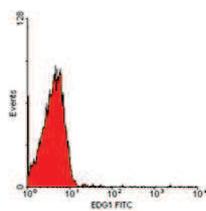


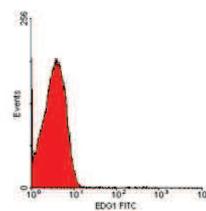
Figure 8

S1P1 expression

- In PBMC:

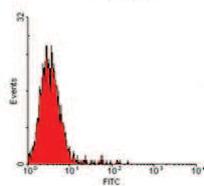


Isotype

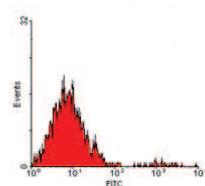


S1P1

- In dendritic cells:

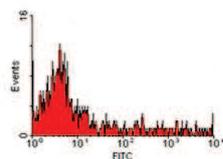


Isotype

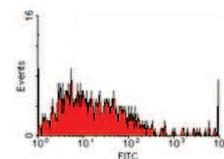


S1P1

- In lymph node lymphocytes:



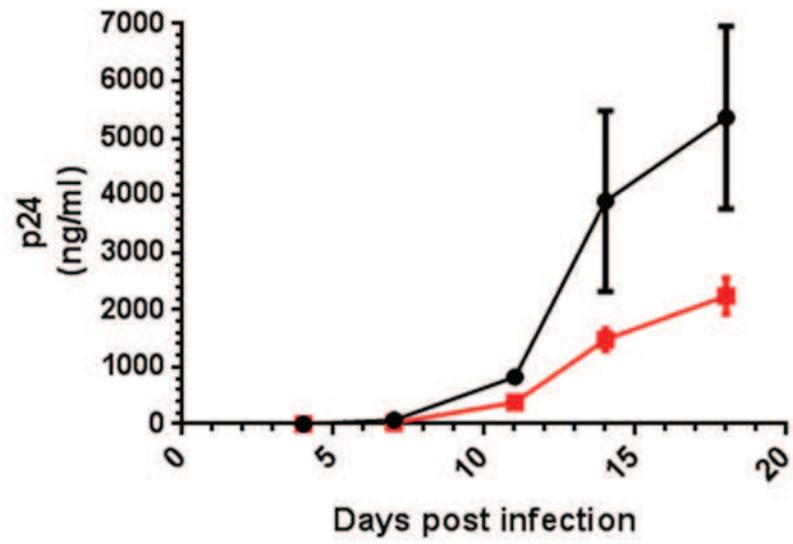
Isotype



S1P1

Figure 9

A)



B)

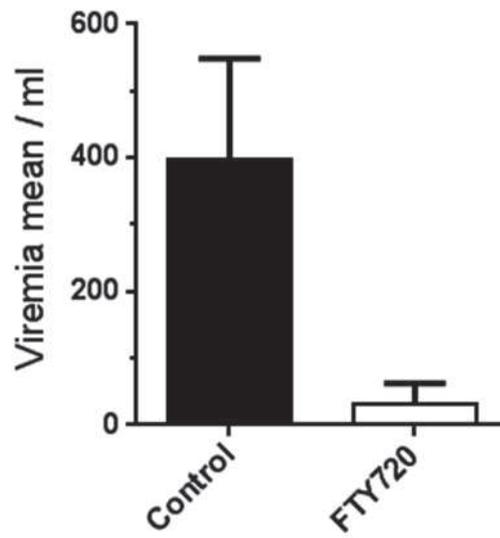


Figure 10

Supplemental data

S1. CLIP and SNAP tags do not affect CCR5 and S1P1 functionality.

We compared the ability of the WT and S1P1-SNAP or CCR5-CLIP tagged receptors to internalize in response to respective agonist stimulation, FTY720-P for S1P1 and PSC-Rantes for CCR5. No significant difference was observed.

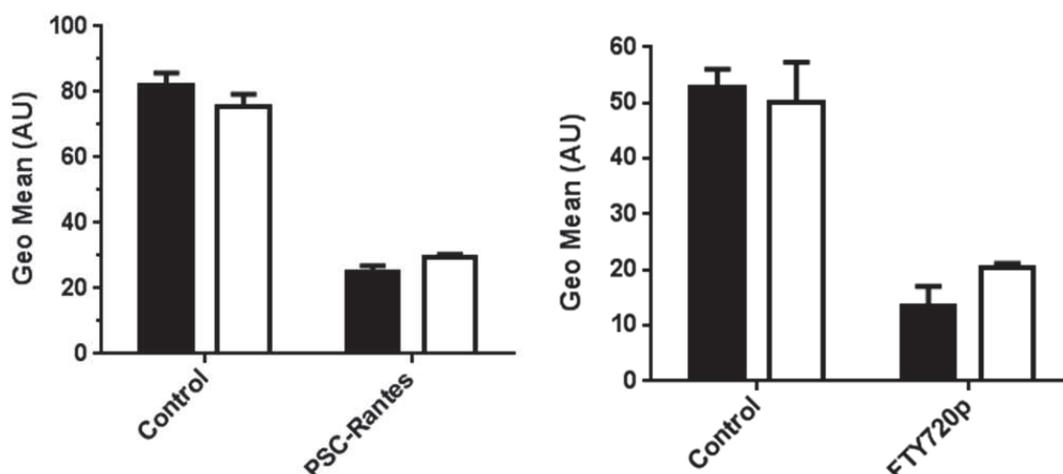
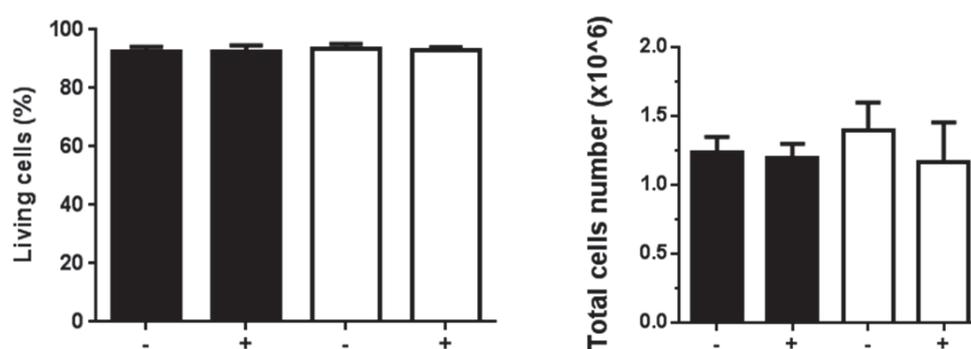


Figure S1. CLIP and SNAP tags do not affect CCR5 and S1P1 capability to internalize in response to agonist stimulation.

200 000 cells of HEK 293T cells were transfected in a 24-well plate with 40 ng of CCR5 / CCR5-CLIP / S1P1 or S1P1-SNAP plasmids with Lipofectamin in 0.5 ml of DMEM without antibiotic. 48h post-transfection, cells were incubated for 1h30 with 10 μ M of FTY720-P or 100 nM of PSC-Rantes. S1P1 and CCR5 membrane expression were evaluated as previously described by flow cytometry.

S2. S1P1 has no effect on proliferation or viability of the HOS cells lines.**Figure S2. S1P1 has no effect on proliferation or viability of the HOS cells lines.**

CCR5⁺S1P1⁺ and CCR5⁺LacZ⁺ HOS cells were infected for 24h with 60 ng of a one-round R5 virus. 72h post-infection, proliferation and cell viability of infected or non-infected CCR5⁺S1P1⁺ HOS and CCR5⁺LacZ⁺ HOS cells was quantified in a countess automated cell counter (using cell counting chamber slides) after staining without (A) or with (B) 0.4% trypan-blue.

Annexe 4

« Inhibiteurs des infections à VIH et leurs utilisations ». V François, P Corbeau, C Duquenne. 2012, Pub. N° WO/2012/080641, International Application N° PCT/FR2011/052948.



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Accusé de réception

Par la présente, nous accusons réception de votre demande de traitement d'une demande internationale au titre du Traité de coopération en matière de brevets, comme suit:

Numéro de soumission	1000133251	
Numéro de demande PCT	PCT/FR2011/052948	
Date de réception	12 décembre 2011	
Office récepteur	Institut National de la Propriété Industrielle	
Votre référence Demandeur	BCT110459 QT	
Nombre de demandeurs	UNIVERSITE DE MONTPELLIER 1 5	
Pays Titre	FR	
	INHIBITEURS DES INFECTIONS À VIH ET LEURS UTILISATIONS	
Documents produits	eolf-pkda.xml eolf-appb.xml eolf-fees.xml eolf-othd-000001.pdf (29 p.) eolf-appb-P000001.pdf (3 p.)	eolf-requ.xml eolf-seql.txt eolf-vlog.xml eolf-abst.txt
Effectué par	CN=Celine BERNARDI,O=CABINET PLASSERAUD,C=FR	
Méthode de soumission	En ligne	
Date et heure de réception	12 décembre 2011, 16:20:26 (CET)	
Digest	6C:4B:4E:B6:E3:52:C4:0C:26:A4:BB:51:EC:9B:64:56:E4:57:39:41	

/INPI, section dépôt/

0	Réservé à l'office récepteur	
0-1	Demande internationale n°	
0-2	Date du dépôt international	
0-3	Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"	
0-4	Formulaire PCT/RO/101 - Requête PCT	
0-4-1	Préparée avec	PCT Online Filing Version 3.5.000.225 MT/FOP 20020701/0.20.5.20
0-5	Pétition Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets	
0-6	Office récepteur (choisi par le déposant)	Institut national de la propriété industrielle (France) (RO/FR)
0-7	Référence du dossier du déposant ou du mandataire	BCT110459 QT
I	Titre de l'invention	INHIBITEURS DES INFECTIONS À VIH ET LEURS UTILISATIONS
II	Déposant	
II-1	Cette personne est :	Déposant seulement
II-2	Déposant pour :	Tous les Etats désignés sauf US
II-4	Nom :	UNIVERSITE DE MONTPELLIER 1
II-5	Adresse :	5 Bld Henri IV CS 19044 34967 MONTPELLIER Cx 2 France
II-6	Nationalité (nom de l'État) :	FR
II-7	Domicile (nom de l'État) :	FR
III-1	Déposant et/ou inventeur	
III-1-1	Cette personne est :	Déposant seulement
III-1-2	Déposant pour :	Tous les Etats désignés sauf US
III-1-4	Nom :	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS -
III-1-5	Adresse :	3, rue Michel Ange 75794 PARIS CEDEX 16 France
III-1-6	Nationalité (nom de l'État) :	FR
III-1-7	Domicile (nom de l'État) :	FR

<p>III-2</p> <p>III-2-1 III-2-2-4 III-2-5 III-2-6 III-2-7</p>	<p>Déposant et/ou inventeur</p> <p>Cette personne est : Déposant pour :</p> <p>Nom (NOM DE FAMILLE, prénom) :</p> <p>Adresse :</p> <p>Nationalité (nom de l'État) : Domicile (nom de l'État) :</p>	<p>Déposant et inventeur US seulement</p> <p>FRANCOIS, Vincent</p> <p>11 rue Jean Coulazou 34080 MONTPELLIER France FR FR</p>
<p>III-3</p> <p>III-3-1 III-3-2 III-3-4 III-3-5 III-3-6 III-3-7</p>	<p>Déposant et/ou inventeur</p> <p>Cette personne est : Déposant pour :</p> <p>Nom (NOM DE FAMILLE, prénom) :</p> <p>Adresse :</p> <p>Nationalité (nom de l'État) : Domicile (nom de l'État) :</p>	<p>Déposant et inventeur US seulement</p> <p>CORBEAU, Pierre</p> <p>231 rue de la Jalade 34090 MONTPELLIER France FR FR</p>
<p>III-4</p> <p>III-4-1 III-4-2 III-4-4 III-4-5 III-4-6 III-4-7</p>	<p>Déposant et/ou inventeur</p> <p>Cette personne est : Déposant pour :</p> <p>Nom (NOM DE FAMILLE, prénom) :</p> <p>Adresse :</p> <p>Nationalité (nom de l'État) : Domicile (nom de l'État) :</p>	<p>Déposant et inventeur US seulement</p> <p>DUQUENNE, Charline</p> <p>283 rue du pré aux clercs K1, appt 15 34090 MONTPELLIER France FR FR</p>
<p>IV-1</p> <p>IV-1-1 IV-1-2 IV-1-3 IV-1-4 IV-1-5</p>	<p>Mandataire ou représentant commun; ou adresse pour la correspondance</p> <p>La personne nommée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme</p> <p>Nom (NOM DE FAMILLE, prénom) :</p> <p>Adresse :</p> <p>n° de téléphone :</p> <p>n° de télécopieur :</p> <p>Courrier électronique :</p>	<p>Mandataire</p> <p>BERNARDI, Céline</p> <p>Cabinet Plasseraud 52 rue de la Victoire 75440 PARIS CEDEX 09 France 00 33 1 40 16 70 00 00 33 1 42 80 01 59 info@plass.com</p>
<p>IV-2</p> <p>IV-2-1</p>	<p>Mandataire(s) supplémentaire(s)</p> <p>Nom(s)</p>	<p>Mandataires supplémentaires ayant la même adresse que le mandataire nommé en premier</p> <p>BOULINGUIEZ, Didier; NARGOLWALLA, Cyra; NIEMANN, Frédéric; PERIN, Georges;</p>

		ROCABOY, Nadine; TOUATI, Catherine; VINATIER, Jacqueline; WAJS, Nathalie
V	DÉSIGNATIONS	
V-1	Le dépôt de la présente requête vaut, selon la règle 4.9.a), désignation de tous les États contractants liés par le PCT à la date du dépôt international, aux fins de la délivrance de tout titre de protection disponible et, le cas échéant, aux fins de la délivrance à la fois de brevets régionaux et nationaux.	
VI-1	Revendication de priorité d'une demande nationale antérieure	
VI-1-1	Date de dépôt	13 Decembre 2010 (13.12.2010)
VI-1-2	Numéro	10 60432
VI-1-3	Pays	FR
VI-2	Demande de document de priorité L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures mentionnées ci-dessus sous la/les rubriques :	VI-1
VI-3	Incorporation par renvoi : lorsqu'un élément de la demande internationale visé à l'article 11.1)iii) d) ou e) ou une partie de la description, des revendications ou des dessins visée à la règle 20.5.a) n'est pas contenu ailleurs dans cette demande internationale mais est intégralement contenu dans une demande antérieure dont la priorité est revendiquée à la date à laquelle un ou plusieurs des éléments visés à l'article 11.1)iii) ont été initialement reçus par l'office récepteur, cet élément ou cette partie est, sous réserve de la confirmation selon la règle 20.6, incorporé par renvoi dans cette demande internationale aux fins de la règle 20.6.	
VII-1	Administration chargée de la recherche internationale choisie	Office européen des brevets (OEB) (ISA/EP)
VII-2	Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; référence à cette recherche	
VII-2-1	Date de dépôt	13 Decembre 2010 (13.12.2010)
VII-2-2	Numéro de dépôt	1060432
VII-2-3	Pays (ou office régional)	EP

VIII Déclarations		Nombre de déclarations	
VIII-1	Déclaration relative à l'identité de l'inventeur	-	
VIII-2	Déclaration relative au droit du déposant, à la date du dépôt international, de demander et d'obtenir un brevet	-	
VIII-3	Déclaration relative au droit du déposant, à la date du dépôt international, de revendiquer la priorité de la demande antérieure	-	
VIII-4	Déclaration relative à la qualité d'inventeur (seulement aux fins de la désignation des États-Unis d'Amérique)	-	
VIII-5	Déclaration relative à des divulgations non opposables ou à des exceptions au défaut de nouveauté	-	
IX Bordereau		Nombre de feuilles	Fichier(s) électronique(s) joint(s)
IX-1	Requête (y compris les feuilles pour déclaration)	5	✓
IX-2 IX-3	Description	27	✓
IX-4 IX-5	Revendications	1	✓
IX-6a	Abrégé	1	✓
	Dessins	3	✓
IX-7	Partie de la description réservée au listage des séquences (qui servira également aux fins de la recherche internationale)	-	✓
	TOTAL	37	
Eléments joints		Document(s) papier joint(s)	Fichier(s) électronique(s) joint(s)
IX-8 IX-	Feuille de calcul des taxes	-	✓
18	Support matériel PCT-SAFE	-	-
IX-20	Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé		
IX-21	Langue de dépôt de la demande internationale	français	
X-1	Signature du déposant, du mandataire ou du représentant commun	(PKCS7 Signature Digital)	
X-1-1	Nom (NOM DE FAMILLE, prénom) : Nom du signataire	BERNARDI, Céline	
X-1-2	Qualité (si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête)	FR, CABINET PLASSERAUD, Celine BERNARDI	
X-1-3		(Mandataire)	

RÉSERVÉ À L'OFFICE RÉCEPTEUR

10-1	Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale	
10-2	Dessins :	
10-2-1	Reçus Non reçus	
10-2-2		
10-3	Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
10-4	Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT	
10-5	Administration chargée de la recherche internationale	ISA/EP
10-6	Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche	

RÉSERVÉ AU BUREAU INTERNATIONAL

11-1	Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international	
------	--	--

INHIBITEURS DES INFECTIONS A VIH ET LEURS UTILISATIONS

DOMAINE DE L'INVENTION

L'invention concerne des composés qui sont des agonistes d'un récepteur choisi parmi les récepteurs S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 et S1PR5 pour une utilisation dans le traitement des infections à VIH.

INTRODUCTION

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est un rétrovirus infectant l'homme et responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (sida), qui est un état affaibli du système immunitaire le rendant vulnérable à de multiples infections opportunistes. Transmis par plusieurs fluides corporels : sang, sécrétions vaginales, sperme ou lait maternel, le sida est aujourd'hui considéré comme une pandémie ayant causé la mort d'environ 25 millions de personnes entre 1981 (date de la première identification de cas de sida) et janvier 2006. Il est estimé qu'environ 1% des personnes âgées de 15 à 49 ans vivent avec le VIH, principalement en Afrique subsaharienne. Bien qu'il existe des traitements antirétroviraux luttant contre le VIH et retardant par conséquent l'apparition du sida, réduisant ainsi la mortalité et la morbidité, il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin ou traitement définitif.

Il y a donc un besoin pour de nouvelles molécules permettant de traiter efficacement les infections à VIH.

RESUME DE L'INVENTION

Le VIH ou HIV pénètre dans une cellule cible par liaison de la protéine gp120 de l'enveloppe virale avec le récepteur CD4, liaison qui permet alors la formation d'un complexe ternaire avec le corécepteur CCR5 (virus à tropisme R5 ou VIH-R5). Ceci conduit à la fusion de l'enveloppe virale via la protéine gp41 avec la membrane cellulaire, ce qui permet l'entrée du virus. CCR5 est un récepteur de chimiokines présent sur différents types de lymphocytes, et appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). CCR5 étant le principal corécepteur du VIH, il représente un intérêt physiopathologique particulier et une cible thérapeutique de choix.

Les inventeurs ont pu montrer que le récepteur S1PR1 s'hétérodimérise avec le corécepteur CCR5 et qu'il diminue l'infectivité du VIH. Les inventeurs ont également montré que les agonistes du récepteur S1PR1 peuvent diminuer l'infection des cellules par le VIH. A l'issue d'études longues et approfondies, les inventeurs ont également montré que les agonistes des récepteurs S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 et S1PR5 sont susceptibles de diminuer l'infection par VIH.

Sans vouloir être liés par une théorie, les inventeurs envisagent plusieurs hypothèses pour expliquer le fonctionnement des agonistes selon l'invention.

Une première hypothèse est que l'agoniste, en se fixant sur un récepteur S1PR, favoriserait l'internalisation de l'hétérodimère S1PR1-CCR5, comme cela a été proposé pour le récepteur S1PR1 seul par Markus H. Gräler dans *Cell Physiol Biochem* 2010 ; 26 :79-86, pour expliquer l'immunomodulation induite par l'agoniste FTY720-P. Cette internalisation de l'hétérodimère S1PR1-CCR5 diminuerait par conséquent la quantité de corécepteur CCR5 à la surface de la cellule, expliquant ainsi la baisse de l'infection par le VIH.

Une deuxième hypothèse est que la stimulation d'un récepteur S1PR induite par la fixation de l'agoniste diminuerait la signalisation du récepteur CCR5. Ce phénomène, appelé hétérodésensibilisation, est bien connu. Ainsi, l'activation d'un récepteur S1PR, par son effet « inhibiteur » sur CCR5, pourrait influencer l'infection et la propagation du VIH. Un tel effet anti-VIH a notamment été documenté dans les cas de la stimulation de CXCR1 par l'interleukine 8 (Richardson et al., 2003. *J Biol Chem* 278:15867-15873), de celle du FPR par le peptide bactérien fMLF (Shen, W. et al., 2000. *Blood* 96:2887-2894), et de A2A par l'adénosine (Zhang et al., 2006. *Blood* 108:38-44).

Une troisième hypothèse est que la stimulation d'un récepteur S1PR induite par la fixation de l'agoniste modifierait l'interaction de CCR5 avec CD4 ou gp120, ce qui entraînerait une diminution de l'infection des cellules par le virus.

Enfin, à la lumière de résultats obtenus à l'aide de virus VIH-1 dont l'enveloppe est remplacée par celle du virus de la stomatite vésiculaire (VSVG) et donc qui pénètrent dans la cellule par endocytose et indépendamment de CCR5, les inventeurs ont émis une quatrième hypothèse. Cette dernière repose sur la possibilité que la signalisation induite par la liaison d'un agoniste à son récepteur S1PR stimulerait la voie de transduction de ce récepteur d'une manière qui interfère avec le cycle réplcatif du VIH par un mécanisme indépendant de CCR5.

L'invention concerne donc des composés qui sont des agonistes du récepteur S1PR1 pour une utilisation dans des méthodes de traitement d'infections à VIH chez l'homme ou l'animal.

DESCRIPTION DETAILLÉE DE L'INVENTION

Selon l'invention, on entend par "agoniste du récepteur du sphingosine-1-phosphate" ou agoniste d'un récepteur S1PR", un composé qui se lie à au moins un récepteur du sphingosine-1-phosphate choisi parmi S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4, S1PR5.

Plus précisément, on entend par « agoniste du récepteur S1PR1 » un composé qui se lie au récepteur S1PR1 et qui, par exemple, entraîne l'internalisation du récepteur, et/ou la dissociation de l'hétérotrimère intracellulaire de protéines G en $G\alpha$ -GTP et $G\beta\gamma$, et/ou une augmentation de la phosphorylation du récepteur, et/ou l'activation de la voie de signalisation du récepteur. Ce terme englobe les agonistes dits « complets » ainsi que les agonistes dits « partiels » du récepteur du sphingosine-1-phosphate.

Dans la suite, les expressions "récepteur S1PR1" et "récepteur S1P1" sont utilisées indifféremment.

Selon l'invention, on entend par le terme « traitement » ou « traiter », l'action de supprimer, réduire, inhiber la progression, ou prévenir l'apparition de la condition ou de la maladie à laquelle ce terme s'applique ; ou l'action de supprimer, réduire, inhiber la progression, ou prévenir l'apparition d'un ou plusieurs symptômes de la condition ou de la maladie à laquelle ce terme s'applique.

Selon l'invention, on entend par « infection à VIH » ou « infection à HIV » une infection par n'importe quel type, groupe ou clade de virus de l'immunodéficience humaine (VIH). En effet, le VIH est un virus qui possède une très importante variabilité génétique et présente ainsi une très grande diversité. Le VIH peut être de deux types : VIH-1, le plus présent dans le monde, ou VIH-2, moins pathogène que VIH-1. Il comprend le VIH-2A et le VIH-2B. Au sein de chaque type existent plusieurs groupes qui, à leur tour, comportent des clades. Le VIH-1 est classé en quatre groupes : groupe M (pour major group), groupe O (pour outlier group), groupe N (pour non-M, non-O group) et groupe P. En 2005, le groupe M prédominait largement avec plus de 40 millions de personnes contaminées, contre un peu plus de 500 pour le groupe O et seulement 7 pour le groupe N. Le groupe M comprend neuf sous-types ou clades (de A à D, de F à H, J et enfin K). S'ajoutent plusieurs formes recombinantes (en anglais « circulating recombinant form » ou

CRF), qui ont pour origine la multiple infection d'une cellule par des sous-types différents, ce qui entraîne des mélanges dans le génome viral.

Agonistes des récepteurs du sphingosine-1-phosphate (S1PR)

L'invention concerne un composé qui est un agoniste d'au moins un récepteur du sphingosine-1-phosphate pour une utilisation dans des méthodes de traitement d'infections à VIH chez l'homme ou l'animal.

Aussi, l'invention concerne un composé qui est un agoniste d'au moins un récepteur choisi parmi les récepteurs S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 et S1PR5 pour une utilisation dans une méthode de traitement d'une infection à VIH chez l'homme ou l'animal.

Le S1PR1 (ou S1P1) a une séquence de 382 acides aminés, accessible sous le numéro d'accèsion NP_001391.2 sur la base NCBI. Cette séquence est représentée par SEQ ID N°1.

Le S1PR2 (ou S1P2) a une séquence de 353 acides aminés accessible sous le numéro d'accèsion NP_001391 sur la base NCBI. Cette séquence est représentée par SEQ ID N°2. Le S1PR3 (ou S1P3) a une séquence de 378 acides aminés accessible sous le numéro d'accèsion NP_005217 sur la base NCBI. Cette séquence est représentée par SEQ ID N°3. Le S1PR4 (ou S1P4) a une séquence de 384 acides aminés accessible sous le numéro d'accèsion NP_003766 sur la base NCBI. Cette séquence est représentée par SEQ ID N°4. Le S1PR5 (ou S1P5) est présent sous forme de deux isoformes.

La première isoforme a une séquence de 310 acides aminés accessible sous le numéro d'accèsion AAH67781 sur la base NCBI. Cette séquence est représentée par SEQ ID N°5. La seconde isoforme a une séquence de 398 acides aminés accessible sous le numéro d'accèsion NP_001159687 sur la base NCBI. Cette séquence est représentée par SEQ ID N°6.

Les agonistes des récepteurs du sphingosine-1-phosphate (S1PR) sont connus de l'art antérieur et l'homme du métier dispose des connaissances générales suffisantes pour identifier des composés agonistes d'un récepteur S1PR. Pour ce faire, il peut mettre en œuvre un test fonctionnel de liaison de ³⁵S-GTPγS in vitro. Il peut par exemple se référer à la publication DS. Im et al., Mol. Pharmacol. 2000 ; 57-753. Dans ce test fonctionnel, la liaison entre le GTPγS et les protéines G médiée par le ligand est mesurée dans un tampon de liaison du GTP (en mM : 50 HEPES ; 100 NaCl, 10 MgCl₂, pH 7,5) en utilisant 25 μg d'une membrane préparée à partir de cellules HEK293 transfectées transitoirement. Le ligand est ajouté aux membranes en présence de 10 μM de GDP et de 0,1 nM de ³⁵S- GTPγS (1200 Ci/mmol) et incubé à 30°C pendant 30

minutes. Le GTP γ S lié est séparé du GTP γ S non-lié par un collecteur Brandel (Gaithersburg, MD), et compté avec un compteur de scintillant liquide. Typiquement, le composé selon l'invention est choisi dans le groupe comprenant la sphingosine-1-phosphate, FTY720, FTY720-P, AUY954, CYM-5442, CYM-5181, SEW2871, VPC01091, DS-SG-44, KRP-203-P, DihydroS1P, Composé 26, Composé 12, la sphingosylphosphorylcholine et AFD-R.

Dans un autre mode de réalisation, l'invention concerne un composé qui est un agoniste d'au moins deux récepteurs choisis parmi les récepteurs S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 et S1PR5 pour une utilisation dans une méthode de traitement d'une infection à VIH chez l'homme ou l'animal.

Typiquement, ledit composé est un agoniste d'au moins :

- des récepteurs S1PR1 et S1PR2; ou
- des récepteurs S1PR1 et S1PR3; ou
- des récepteurs S1PR1 et S1PR4; ou
- des récepteurs S1PR1 et S1PR5; ou
- des récepteurs S1PR2 et S1PR3; ou
- des récepteurs S1PR2 et S1PR4; ou
- des récepteurs S1PR2 et S1PR5; ou
- des récepteurs S1PR3 et S1PR4; ou
- des récepteurs S1PR3 et S1PR5; ou
- des récepteurs S1PR4 et S1PR5.

Dans ce mode de réalisation, le composé selon l'invention est choisi parmi les composés cités dans le tableau ci-dessous:

COMPOSES	AGONISTE DE S1PR1	AGONISTE DE S1PR2	AGONISTE DE S1PR3	AGONISTE DE S1PR4	AGONISTE DE S1PR5
sphingosine-1-phosphate	X	X	X	X	X
FTY720-P	X		X	X	X
AUY954	X		X		X
VPC01091	X			X	X
DS-SG-44	X	X	X		
KRP-203-P	X			X	
DihydroS1P	X	X	X	X	X
composé 26	X		X	X	X
Composé 12				X	X
Sphingosyl- phosphorylcholine	X	X	X	X	X
AFD-R	X		X	X	X

Agonistes du S1PR1

Dans un mode de réalisation préféré, ledit agoniste est un agoniste du récepteur S1PR1. Typiquement, il s'agit d'un agoniste de bas poids moléculaire, par exemple une petite molécule organique (naturelle ou pas). Le terme « petite molécule organique » se réfère à une molécule, naturelle ou pas, d'une taille comparable à celle des molécules organiques généralement utilisées comme médicament. Ce terme exclu les macromolécules (par exemple les protéines, les molécules d'acide nucléique, etc.). Des petites molécules organiques préférées ont une taille d'au plus 10 000 Da, de préférence d'au plus 5 000 Da, plus préférentiellement d'au plus 2 000 Da, encore plus préférentiellement d'au plus 1 000 Da.

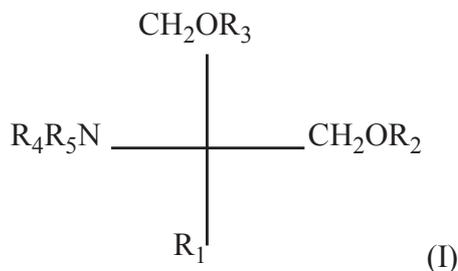
Les récepteurs du sphingosine-1-phosphate sont connus. Parmi ces récepteurs, le S1PR1 ou (« Sphingosine-1-phosphate receptor 1 ») est largement décrit dans la littérature. Il s'agit d'un récepteur appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G, dont le ligand naturel est la sphingosine-1-phosphate (S1P). S1PR1 est également connu sous les noms suivants : EDG1, S1P1, ECGF1, EDG-1, CHEDG1, D1S3362, FLJ58121. Il est exprimé de manière

aliphatique, alicyclique, aromatique et/ou hétérocyclique. La molécule résultante fonctionne comme un agoniste d'un récepteur S1PR1.

De manière préférée, au moins un de Z et R_{1z} est ou comprend un résidu de formule (a).

Des exemples d'agonistes du récepteur S1PR1 comprennent :

(i) les composés décrits dans EP627406A1, par exemple un composé de formule I :



où R₁ est une chaîne C₁₂₋₂₂ linéaire ou ramifiée

- qui peut avoir dans la chaîne une liaison ou un hétéroatome choisi parmi une liaison double, une liaison triple, O, S, NR₆, où R₆ est H, C₁₋₄ alkyle, aryl-C₁₋₄alkyle, acyle ou (C₁₋₄alkoxy)carbonyle, et carbonyle, et/ou
- qui peut avoir comme substituant C₁₋₄alkoxy, C₂₋₄alcényloxy, C₂₋₄alcynyloxy, arylC₁₋₄alkyl-oxy, acyle, C₁₋₄alkylamino, C₁₋₄alkylthio, acylamino, (C₁₋₄alkoxy)carbonyle, (C₁₋₄alkoxy)-carbonylamino, acyloxy, (C₁₋₄alkyl)carbamoyle, nitro, halogène, amino, hydroxyimino, hydroxy ou carboxy;

ou R₁ est

- un phénylalkyle où l'alkyle est une chaîne carbonée linéaire ou ramifiée en C₆₋₂₀ ; ou
- un phénylalkyle où l'alkyle est une chaîne carbonée linéaire ou ramifiée en C₁₋₃₀ où ledit phénylalkyle est substitué par
 - une chaîne carbonée linéaire ou ramifiée en C₆₋₂₀ optionnellement substituée par un halogène,
 - une chaîne alkoxy linéaire ou ramifiée en C₆₋₂₀ optionnellement substituée par un halogène,
 - une chaîne alcényloxy linéaire ou ramifiée en C₆₋₂₀,
 - un phényl-C₁₋₁₄alkoxy, halophényl-C₁₋₄alkoxy, phényl-C₁₋₁₄alkoxy-C₁₋₁₄alkyl, phénoxy-C₁₋₄alkoxy or phénoxy-C₁₋₄alkyle,

où X_a est O, S, NR_{1s} ou un groupe $-(CH_2)_{n_a}-$, ledit groupe étant substitué ou non par 1 à 4 halogènes ; n_a est 1 ou 2, R_{1s} est H ou (C_{1-4}) alkyle, ledit alkyle étant substitué ou non par un halogène, R_{1a} est H, OH, (C_{1-4}) alkyle ou $O(C_{1-4})$ alkyle où l'alkyle est substitué ou non par 1 à 3 halogènes ; R_{1b} est H, OH ou (C_{1-4}) alkyle, où l'alkyle est substitué ou non par un halogène ; chaque R_{2a} est indépendamment choisi parmi H ou (C_{1-4}) alkyle, ledit alkyle étant substitué ou non par un halogène ; R_{3a} est H, OH, halogène ou $O(C_{1-4})$ alkyle où l'alkyle est substitué ou non par un halogène ; et R_{3b} est H, OH, halogène, (C_{1-4}) alkyle où l'alkyle est substitué ou non par hydroxyle, ou $O(C_{1-4})$ alkyle où l'alkyle est substitué ou non par un halogène ; Y_a est $-CH_2-$, $-C(O)-$, $-CH(OH)-$, $-C(=NOH)-$, O ou S, et R_{4a} est (C_{4-14}) alkyl ou (C_{4-14}) alcényle ; ou un sel ou un hydrate pharmaceutiquement acceptable de celui-ci.

Lorsque les composés de formules I, IIa ou IIb possèdent un ou plusieurs centres asymétriques, la présente invention doit être comprise comme couvrant les différents isomères optiques, racémates, diastéréoisomères et leurs mixtures. Les composés de formule IIa ou IIb, lorsque l'atome de carbone portant le groupement amine est asymétrique, ont de préférence la configuration R pour cet atome de carbone.

Les composés de formules I, IIa ou IIb peuvent être sous forme libre ou sous forme de sel.

Des exemples de sels pharmaceutiquement acceptables des composés de formules I, IIa ou IIb comprennent les sels d'acide inorganique, tels que hydrochloride, hydrobromide et sulfate ; les sels d'acide organique, tels que acétate, fumarate, maléate, benzoate, citrate, malate, méthanesulfonate et benzènesulfonate ; ou lorsque cela est approprié, les sels de métaux, tels que sodium, potassium, calcium, aluminium ; des sels d'amines, tels que triéthylamine ; et des sels d'acide aminé dibasique, tel que la lysine. Les composés et leurs sels selon l'invention couvrent également leurs formes hydrate et solvate.

Dans les définitions ci-dessus :

- acyle peut être un résidu R_y-CO- où R_y est C_{1-6} alkyle, C_{3-6} cycloalkyle, phényle ou phényl- C_{1-4} alkyle,
- sauf si indiqué autrement, alkyle, alkoxy, alcényle ou alcynyle peuvent être linéaires ou ramifiés,
- aryle peut être phényle ou naphtyle, de préférence phényle,
- « groupe hétérocyclique » représente un groupe hétérocyclique de 5 à 7 chaînons, ayant 1 à 3 hétéroatomes choisis parmi S, O et N. Des exemples de tels groupes

hétérocycliques comprennent les groupes hétéroaryles indiqués précédemment, et les composés hétérocycliques correspondant à des groupes hétéroaryles partiellement ou complètement hydrogénés, comme par exemple furyle, thienyle, pyrrolyle, azepinyle, pyrazolyle, imidazolyle, oxazolyle, isoxazolyle, thiazolyle, isothiazolyle, 1,2,3-oxadiazolyle, triazolyle, tetrazolyle, thiadiazolyle, pyranyle, pyridyle, pyridazinyle, pyrimidinyle, pyrazinyle, tetrahydropyranyle, morpholinyle, thiomorpholinyle, pyrrolidinyle, pyrrolyle, imidazolidinyle, pyrazolidinyle, piperidinyle, piperazinyle, oxazolidinyle, isoxazolidinyle, thiazolidinyle or pyrazolidinyle. Des groupes hétérocycliques préférés sont les groupes hétéroaryles à 5 ou 6 chaînons et les plus préférés sont les groupes morpholinyle, thiomorpholinyle or piperidinyle.

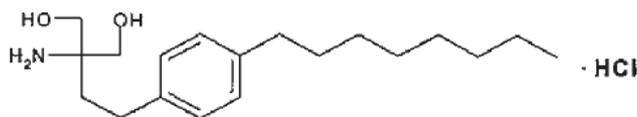
Lorsque la chaîne carbonée comme R_1 est substituée dans les composés de formule I, cette chaîne est de préférence substituée avec un halogène, nitro, amino, hydroxy ou carboxy. Quand la chaîne carbonée est interrompue par un phénylène optionnellement substitué, la chaîne carbonée est de préférence non substituée. Quand le groupement phénylène est substitué, il est de préférence substitué par un halogène, nitro, amino, méthoxy, hydroxy ou carboxy.

Des composés préférés de formule I sont ceux dans lesquels R_1 est C_{13-20} alkyle, optionnellement substitué par nitro, halogène, amino, hydroxy ou carboxy, et, plus préférentiellement, ceux où R_1 est un phénylalkyle substitué par une chaîne C_{6-14} alkyle optionnellement substituée par un halogène et le groupement alkyle est un C_{1-6} alkyle optionnellement substitué par un hydroxy. Plus préférentiellement, R_1 est un phényl- C_{1-6} alkyle substitué sur le phényle par une chaîne C_{6-14} alkyle, linéaire ou ramifiée, de préférence linéaire. La chaîne C_{6-14} alkyle peut être ortho, méta ou para, de préférence para. De préférence, chacun de R_2 à R_5 est H.

Un composé de formule I préféré est le 2-amino-2-tétradécyl-1,3-propanediol.

Un composé particulièrement préféré de formule I est le FTY720, c'est-à-dire le 2-amino- 2-[2-(4-octylphényl)éthyl]propane-1,3-diol dans sa forme libre ou sous forme d'un de ses sels pharmaceutiquement acceptable, ou une pro-drogue de celui-ci.

Dans un mode de réalisation, le composé selon l'invention est FTY720 hydrochloride, comme indiqué ci après :



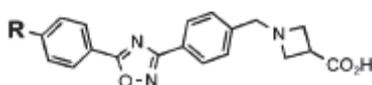
Un composé préféré de formule IIa est le FTY720-phosphate ou FTY720-P (R_{2a} est H, R_{3a} est OH, X_a est O, R_{1a} et R_{1b} sont OH).

Un composé préféré de formule IIb est le un composé-phosphate dans lequel R_{2a} est H, R_{3b} est OH, X_a est O, R_{1a} et R_{1b} sont OH, Y_a est O et R_{4a} est heptyle.

Selon un mode de réalisation, le composé selon l'invention est choisi dans le groupe comprenant la sphingosine-1-phosphate, FTY720, FTY720-P, AUY954, CYM-5442,

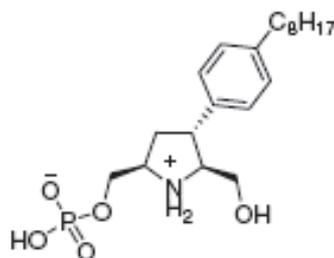
CYM-5181, SEW2871, VPC01091, DS-SG-44, KRP-203-P, DihydroS1P, Composé 26, Composé 12, la sphingosylphosphorylcholine et AFD-R. Ces composés sont notamment cités par Dong-Soon IM dans *Acta Pharmacologica Sinica* (2010) 31 :1213-1222.

Par "Composé 26", on entend le composé décrit dans la publication Li et al, "*Discovery of potent 3,5-diphenyl-1,2,4-oxadiazole sphingosine-1-phosphate (SIP₁) receptor agonists with exceptional selectivity against SIP₂ and SIP₃*", *Journal of Medicinal Chemistry*, 2005 et ayant la formule suivante

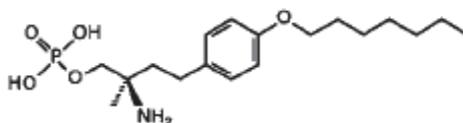


où $R = (\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2-$

Par "Composé 12", on entend le composé décrit dans la publication Hanessian et al, "*Constrained azacyclic analogues of the immunomodulatory agent FTY720 as molecular probes for sphingosine 1-phosphate receptors*", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007 et ayant la formule suivante:



Par AFD-R, on entend le composé décrit dans la publication Brinkmann et al, "*The immune modulator FTY720 targets sphingosine-1-phosphate receptors*", The Journal of Biological Chemistry, 2002 et ayant la formule suivante:



De manière préférée, le composé selon l'invention est un agoniste des récepteurs S1PR1, S1PR3, SPR4 et S1PR5. De manière encore préférée, le composé selon l'invention est FTY720 (également connu sous le nom « fingolimod ») ou FTY720-P, qui est la forme phosphorylée du FTY720. FTY720 et FTY720-P ont notamment été décrits par Mandala S. et al. dans Science 2002 ; 296 :346-9 et par Brinkmann V. et al. dans J Biol Chem 2002 ; 277 :21453-7.

Le FTY720 est un substrat de la sphingosine kinase 2 et est, sous sa forme phosphorylée, un agoniste des récepteurs S1PR1, S1PR3, S1PR4 et S1PR5.

Le FTY720-P est particulièrement pertinent pour une utilisation dans le traitement d'une infection à VIH. Cela s'explique notamment du fait de la synergie des effets du FTY720-P sur les récepteurs S1PR1, S1PR3, S1PR4 et S1PR5. Les inventeurs ont montré l'effet de protection contre l'infection à VIH de ce composé sur des lignées cellulaires, des cellules primaires. Enfin, ils ont également montré l'effet de cette molécule *in vivo* sur des souris sur lesquelles des lymphocytes humains ont été greffés avant d'être infectés par le VIH.

En outre, les inventeurs ont montré que le FTY720-P permettait une diminution de l'infection à VIH chez des cellules n'exprimant pas le S1PR1. Ce résultat confirme que les récepteurs S1PR3 et/ou S1PR4 et/ou SPR5 ont également un rôle primordial dans la protection contre l'infection à VIH.

Dans un mode de réalisation, les agonistes de l'invention sont des agonistes spécifiques du récepteur S1PR1 et d'au moins un récepteur choisi parmi S1PR2, S1PR3, S1PR4, S1PR5.

Dans un autre mode de réalisation particulier, l'agoniste du récepteur S1PR1 est spécifique du récepteur S1PR1. Typiquement, ledit composé est choisi parmi CYM-5442, CYM-5181, SEW2871. De manière encore plus préférée, ce composé est le SEW2871. Un agoniste spécifique du récepteur S1PR1 est typiquement un composé qui possède une spécificité pour le récepteur S1PR1 par rapport à un autre récepteur S1PR (e.g. S1PR2-5) au moins 20 fois supérieure, typiquement 100, 500, 1000 ou 2000 fois supérieure, comme mesurée par le ratio EC_{50} pour le récepteur S1PR1 / EC_{50} pour l'autre récepteur S1PR (e.g.

S1PR2-5) tel que mesuré par un essai de liaison ^{35}S -GTP γ S, et où ledit composé possède une EC_{50} pour le récepteur S1PR1 de 100 nM ou moins, comme mesurée par l'essai de liaison ^{35}S -GTP γ S. L'essai de liaison ^{35}S -GTP γ S est décrit dans la demande de brevet WO03/097028 et suit le protocole suivant :

L'essai de liaison ^{35}S -GTP γ S est réalisé comme décrit par DS. Im et al., Mol. Pharmacol. 2000 ; 57-753. La liaison entre le GTP γ S et les protéines G médiée par le ligand est mesurée dans un tampon de liaison du GTP (en mM : 50 HEPES ; 100 NaCl, 10 MgCl₂,

pH 7,5) en utilisant 25 μg d'une membrane préparée à partir de cellules HEK293 transfectées transitoirement. Le ligand est ajouté aux membranes en présence de 10 μM de GDP et de 0,1 nM de ^{35}S -GTP γ S (1200 Ci/mmol) et incubé à 30°C pendant 30 minutes. Le GTP γ S lié est séparé du GTP γ S non-lié par un collecteur Brandel (Gaithersburg, MD), et compté avec un compteur de scintillant liquide.

Méthodes de traitement

L'invention concerne également des méthodes de traitement d'un sujet souffrant d'une infection à VIH comprenant l'étape d'administrer audit sujet une quantité thérapeutiquement efficace d'au moins un composé qui est un agoniste d'au moins un récepteur choisi parmi les récepteurs S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 et S1PR5, et préférentiellement qui est un agoniste du récepteur S1PR1.

Les composés selon l'invention peuvent également être administrés sous la forme de compositions pharmaceutiques, telles que définies ci après.

Par « quantité thérapeutiquement efficace » on entend une quantité suffisante pour traiter et/ou prévenir l'infection à VIH.

Compositions pharmaceutiques

Les composés selon l'invention peuvent également être utilisés pour préparer des compositions pharmaceutiques pour le traitement d'infections à VIH.

Ainsi, l'invention concerne aussi des compositions pharmaceutiques pour une utilisation dans des méthodes de traitement d'infections à VIH chez l'homme ou l'animal, lesdites compositions comprenant au moins un composé selon l'invention et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

N'importe quel composé selon l'invention peut être combiné à tout type de véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable, et optionnellement à une matrice à diffusion prolongée, telle qu'un polymère biodégradable, pour former une composition pharmaceutique selon l'invention.

Les termes « pharmaceutiquement acceptable » se réfèrent à des entités moléculaires et des compositions qui ne produisent pas de réaction inverse, allergique ou autre réaction non désirée lorsqu'elles sont administrées à un mammifère, particulièrement un humain. Un véhicule ou excipient pharmaceutiquement acceptable peut être solide, semi-solide ou liquide.

La forme des compositions pharmaceutiques, leur voie d'administration, leur dosage et leur posologie dépendent naturellement de la sévérité de l'infection, de son stade d'évolution, de l'âge, du sexe, du poids du sujet à traiter, etc.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être formulées pour une administration topique, orale, intra-nasale, parentérale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, ou autre.

Selon un mode de réalisation de l'invention, ladite infection à VIH est une infection à VIH-1.

Selon un autre mode de réalisation, ladite infection à VIH étant une infection à VIH-2.

Les exemples suivants sont donnés à titre illustratif seulement, et ne sauraient limiter la portée de l'invention.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1: Mesure de l'infectabilité des lignées HOS CCR5 LacZ et HOS CCR5 S1PR1 par le virus Ad8Luc.

L'infectabilité est mesurée par l'activité luciférase. Cette figure montre que la présence du récepteur S1PR1 inhibe l'infection de la lignée HOS par le virus VIH.

Figure 2: Effet du FTY720-P sur une lignée cellulaire HOS CCR5 S1PR1. L'infectabilité est mesurée par l'activité luciférase. Cette figure montre que la pré- incubation avec FTY720-P des cellules exprimant S1PR1 diminue l'infection.

Figure 3: Mesure de l'infectabilité sur une lignée HOS CCR5 n'exprimant pas S1PR1.

Des cellules HOS CCR5 lacZ ont été préincubées pendant 1 heure, avec :

- un agoniste spécifique de S1PR1, le SEW2871, ou
- l'agoniste naturel de tous les récepteurs S1PR (S1PR1 à S1PR5), la sphingosine-1-phosphate (S1P), ou
- un agoniste de S1PR1, S1PR3, S1PR4 et S1PR5, le FTY720-P.

Aucune différence significative n'est observée avec le SEW2871 tandis que le S1P et le FTY720-P permettent une diminution d'environ 50% de l'infection à VIH.

Figure 4 : Inhibition de l'infection de cellules primaires lymphocytaires par le FTY720-P.

Cette figure montre l'effet du S1PR1 et du FTY720-P sur des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC).

Cette figure confirme l'effet du FTY720-P sur des cellules primaires.

Figure 5 : Mesure de la production virale dans le milieu de culture de cellules primaires infectées avec un virus répliquatif Ad8 et préincubées avec du FTY720-P.

Cette figure montre une nette inhibition de la production virale par les PBMC.

Figure 6: Effet de FTY720 *in vivo*

Cette figure montre une nette diminution de la virémie chez des souris greffées avec des cellules lymphocytaires humaines et infectés au VIH. Cette figure confirme l'effet *in vivo* du FTY720 sur la prévention de l'infection à VIH.

EXEMPLES

MATERIEL ET METHODES

Les matériels et méthodes utilisés pour l'ensemble de la partie expérimentale sont détaillés ci après.

Cellules

Les lignées HOS-CD4 (AIDS Reagent Program, Rockvill, MD) et HEK-293T (simian virus 40 T antigen-transformed human embryonic kidney 293T, Genethon) sont cultivées en milieu DMEM supplémenté avec 10% de SVF (sérum de veau foetal), 10mM glutamax- 1, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. La lignée HEK-293T CD4+ CCR5+ (don de Martine Biard-Piechaczyk, Institut de Biologie, Montpellier, France) a été obtenue par transfection des gènes CD4 et CCR5 à partir de la lignée HEK-293T.

Les PBMC humaines en culture sont isolées à partir de sang de donneurs sains par centrifugation de densité sur milieu de séparation des lymphocytes (Eurobio) et cultivées en milieu RPMI supplémenté comme le DMEM à 37°C, 5% de CO₂.

Effet de S1PR1 sur l'infection de la lignée HEK-293T

Pour tester l'influence de l'expression de S1PR1 sur l'infection par HIV-1, 50 000 cellules de HEK-293T CD4+ CCR5+ ont été transfectées transitoirement par lipofection en les incubant pendant 24h avec un mélange de 50 ng de plasmide CMV-S1PR1, 20 ng du plasmide pRL-TK-Renilla Luciferase (Promega) et 0,5 µl de lipofectamine (Lipofectamine™ 2000, Invitrogen) dans 150 µl de milieu DMEM 10% SVF en plaque 96 puits, préalablement incubée avec une solution de D-polylysine pendant 30 min. Le clone plasmidique de S1PR1 a été obtenu auprès du Missouri S&T cDNA Resource Center (www.cdna.org). Un fragment portant S1PR1 a été cloné sous contrôle du promoteur CMV dans le vecteur d'expression pcDNA3.1+ (Invitrogen). 24h après la transfection, les puits sont lavés au DMEM (BioWhittaker), puis les cellules sont infectées avec 40 ng du virion Ad8-luc dans 180 µl de milieu de culture. Le virion Ad8-luc est un virus non répliquatif pseudotypé R5 obtenu par co-transfection de cellules HEK293T avec le plasmide de transfert pNL4.3 Luc.R-E- qui porte un gène viral *env* défectif ainsi que le gène de la luciférase Firefly inséré dans le gène viral *nef* (AIDS Reagent Program), et le plasmide pCMV-AD8-env qui code pour l'enveloppe R5 du prototype AD8 HIV-1 (Cho, Shibata

& Martin (1996) *J. Virol.* 70, 7318-7321). 24h après l'infection, les cellules sont lavées une fois avec du milieu de culture, et remises en culture avec 200 µl de DMEM, 10% SVF. 40h à 48h après l'infection, les cellules sont lavées une fois au PBS, lysées avec 50 µl de tampon puis les activités luciférase Firefly et Renilla sont mesurées séquentiellement dans un luminomètre à l'aide du système Dual-Luciferase[®] Reporter Assay (Promega, cat: E1910). L'activité luciférase Renilla est utilisée comme mesure du niveau de métabolisme cellulaire.

Transduction des cellules HOS pour l'expression de CCR5 et S1PR1

Pour produire des vecteurs HIV exprimant les gènes CCR5, lacZ et S1PR1, les plasmides pWPXL-CCR5 (Desmetz *et al.*, 2007, *Clin Immunol* 123, 148-154), pHRCMV-lacZ (Naldini *et al.*, 1996, *Science* 272, 263-267) et pWPXL-S1PR1 ont été cotransfectés avec le plasmide packaging p8.2 et le plasmide pMD2G qui code pour l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire dans des cellules 293T comme décrit précédemment (Lin *et al.*, 2002, *PNAS* 99, 15590-15595). Pour construire le plasmide pWPXL-S1PR1, la séquence codante de S1PR1 a été amplifiée par PCR à partir du plasmide pCDNA3.1-S1PR1 puis le fragment BamH1-Spe1 obtenu cloné dans le vecteur lentiviral pWPXL (addgene.org). Les cellules HOS ont été transduites (Lin *et al.*, 2002) d'abord avec le vecteur HIV-CCR5 et la lignée obtenue a été retransduite avec le vecteur HIV-S1PR1 ou le vecteur HIV-lacZ avec des quantités égales de virus en équivalent p24. L'expression membranaire des récepteurs CCR5 et S1PR1 a été évaluée en cytométrie de flux (FACScalibur, BDBiosciences) après marquage des cellules avec les anticorps monoclonaux de souris anti-human CD195 (BD Pharmingen) et anti-human EDG1 (R&D), respectivement.

Tests d'infection des cellules HOS avec le virus non répliquatif Ad8-luc

50 000 cellules HOS sont cultivées en triplicatas en plaque 96 puits, puis infectées avec 50 ng de virus Ad8-luc. 24h après l'infection, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS, et remises en culture pendant 48h. Les cellules sont alors lavées une fois au PBS, lysées avec 50 µl de tampon, puis l'activité luciférase Firefly est mesurée dans un luminomètre à l'aide du kit Promega (Luciferase Assay System).

Tests d'infection des PBMC avec le virus répliquatif Ad8

Les PBMC sont activées par incubation pendant 72h dans du milieu de culture additionné de phytohémagglutinine (PHA, 1µg/ml) et d'interleukine 2 (IL2, 100 U/ml), puis après un lavage au

RPMI, incubées en plaques 96 puits en triplicatas à 200 000 cellules dans 200 μ l par puits. Elles sont ensuite infectées avec 70 ng d'équivalent p24 du prototype Ad8 HIV-1 pendant 18h, puis lavées 2X au PBS et incubées pendant 11 jours en ajustant le nombre de cellules à chaque prélèvement du surnageant de culture à J4, J7 et J9. La production de virus est suivie dans le surnageant de culture par mesure de la concentration de la protéine gag p24 par ELISA au moyen d'un kit commercial (Innotest HIV AG MAB, Ingen,réf:80563).

Tests des molécules pharmacologiques

Pour les cellules HEK-293T CD4+ CCR5+, 24h après transfection par le plasmide S1PR1 ou par le vecteur vide, les cellules ont été incubées pendant 30 min puis infectées avec l'anticorps anti-CCR5 à 10 μ g/ml (clone 2D7, Pharmingen, ref. 555991), ou avec CCL4 à 100 ng/ml (R&D systems, ref. 271-BME) ou avec (S)-FTY720 Phosphate (FTY720-P) à 80 ng/ml (Echelon, ref. B-0721).

Pour les cellules HOS et les PBMC, les molécules S1P (Enzo, vendu par covalab ref. SL- 140), FTY720-P (Echelon) ou SEW2871 (Cayman, ref. 10006440) ont été ajoutées dans le milieu de culture 1 heure avant l'infection aux concentrations indiquées.

Modèle animal de souris immunologiquement humanisées

Les souris SCID sont de génotype $cb17/Icr-Prkdc^{scid}/Crl$. Ces souris immunodéprimées sont hébergées dans une animalerie A3/L3 dans des cages avec couvercle à filtre dans un portoir ventilé. Après une semaine d'acclimatation, les animaux sont reconstitués par injection intrapéritonéale de $30 \cdot 10^6$ PBMC obtenues par centrifugation de densité sur les leucocytes d'un anneau de cytophère non qualifié d'un donneur sain volontaire. La reconstitution est évaluée au 13^{ème} jour par dosage des Immunoglobulines (Ig) humaines présentes dans le sérum des souris par test Elisa à l'aide de l'anticorps anti-human whole Ig-PO, (MP Biomedical, cat n°55230). Les souris dont la concentration en Ig totale est supérieure à 100 μ g/ml sont conservées pour l'expérience, et sont infectées 14 jours après la reconstitution avec la souche JR-CSF de HIV-1 (souche R5) à 1000 TCID50 dans 100 μ l. Un gavage journalier avec 100 μ l de FTY720 (Cayman, vendu par Interchim ref. BM8045) dissout à 60 μ g/ml dans de l'eau distillée est débuté un jour avant l'infection et continué pendant 12 jours. Les souris non-traitées sont gavées avec le même volume d'eau distillée. 50 μ l de sang est prélevé rétro-orbitalement et dilué avec 1 ml de plasma humain pour doser la charge virale au 6ème, 9ème et 12ème jour après l'infection après

anesthésie à l'isoflurane. Les virémies sont évaluées par quantification de l'ARN viral dans le plasma des souris en qPCR avec le test AmpliPrep/COBAS TaqMan HIV-1 (Roche Diagnostics, ref. 05212294190). Les valeurs inférieures à 20 copies d'ARN/ml (soit 400 copies/ml de sérum de souris) étant inférieures au seuil de détection du kit sont considérées égales à zéro.

Expériences de TR-FRET

La séquence codante de S1PR1 a été amplifiée par PCR à partir du 2^{ème} codon jusqu'au codon stop entre des sites MluI et XbaI, puis insérée à l'aide de ces sites de restriction dans les plasmides pRK5-HA-SNAP-mGlu2 et pRK5-FLAG-CLIP-mGlu2 (Doumazane, E. et al., FASEB J. 2010 Sep 27) en remplacement du gène mGlu2, de telle sorte que le récepteur S1PR1 est fusionné à l'extrémité N terminal soit avec un épitope de l'hémagglutinine (HA) et l'enzyme SNAP, soit avec un épitope FLAG et l'enzyme CLIP, insérés derrière un peptide signal.

Des cellules HEK293 ont été transfectées par lipofection avec de l'ADN des plasmides CLIP-CCR5 (7 ng pour 100 000 cellules) et SNAP-RCPG (gamme de 1 à 100 ng pour 100 000 cellules) et déposées à raison de 100 000 cellules par puits en plaque 96 puits noires pré-incubées avec une solution de polyornithine. 24 à 30h après la transfection, les cellules adhérentes sont lavées puis incubées avec du milieu de culture contenant les substrats des enzymes SNAP et CLIP couplés à des fluorophores pendant 2h à 37°. Les fluorophores sont du Lumi4®- Cryptate de Terbium lié à l'*O*⁶-benzylguanine (BG-Lumi4) utilisé à 0,3 µM, et de la fluorescéine liée à l'*O*²-benzylcytosine (BC-Fluorescéine) utilisé à 1 µM, substrats des enzymes SNAP et CLIP, respectivement. BG-Lumi4 et BC-Fluorescéine viennent de Cisbio Bioessays (Bagnols-sur-Cèze, France). Dans ces conditions, le marquage des récepteurs par les fluorophores est spécifique pour le SNAP ou le CLIP, total (100% des récepteurs sont marqués) et restreint aux récepteurs présents à la surface cellulaire (Doumazane, E. et al., FASEB J. 2010 Sep 27). De plus, les intensités de fluorescence du Lumi4 et de la fluorescéine sont proportionnelles au nombre de récepteurs présents à la surface cellulaire (Doumazane, E. et al., FASEB J. 2010 Sep 27). Les cellules sont ensuite lavées 4 fois avec du tampon Tris-Krebs à 37° (Maurel, D. et al., 2008, *Nat Methods* 5:561-567). La fluorescence et le TR-FRET sont mesurés dans 100 µl de tampon Tris-Krebs dans un spectrofluorimètre Infinite F500 (Tecan, Männedorf, Switzerland) avec les paramètres suivants: Lumi4 (excitation à 320 nm, émission à 620 nm, 150 µs de délai et 500 µs de temps d'intégration), fluorescéine (excitation à 485 nm, émission à 520 nm, 0 µs de délai et 1000 µs de temps d'intégration), trFRET (excitation à 320 nm, émission à 520 nm, 150 µs de délai et 500 µs de temps d'intégration). Le signal de FRET est corrigé par soustraction du FRET non spécifique

obtenu après transfection du récepteur SNAP seul, et du FRET non spécifique obtenu avec le seul substrat BG-Lumi4 seul. Les valeurs de fluorescence du Lumi4 et de la fluorescéine sont corrigées par soustraction du signal non spécifique mesuré après transfection d'un plasmide vide.

RESULTATS

I. Effet des agonistes de l'infection sur des lignées HEK293T exprimant les récepteurs CD4 CCR5

Etude de la capacité de S1PR1 à interférer avec l'infection par VIH

Le gène codant pour S1PR1 a été cloné dans un vecteur d'expression sous contrôle du promoteur CMV. Nous avons utilisé une lignée HEK293T exprimant les récepteurs CD4 CCR5 de manière constitutive et à un niveau suffisant pour permettre l'infection.

Les résultats ont montré que lorsqu'on introduit un plasmide permettant l'expression à la membrane du récepteur S1PR1 dans cette lignée, le niveau d'infection est abaissé d'un facteur deux environ par rapport au contrôle (plasmide vide). Comme attendu, l'apport d'un plasmide CCR5 qui augmente le niveau membranaire du co-récepteur du VIH a donné un niveau d'infection supérieur au contrôle. Dans ces expériences, il est contrôlé que l'effet sur l'infection des plasmides S1PR1 et CCR5 ne résulte pas d'un effet global sur le métabolisme cellulaire.

Effet sur l'infection de la stimulation du récepteur S1PR1 par l'agoniste FTY720-P

Une fois la capacité de S1PR1 à interférer avec l'infection par VIH mise en évidence, nous avons testé l'effet d'un agoniste de S1PR1 sur l'infection à VIH, en utilisant la même méthode mais en incluant une étape d'incubation des cellules avec l'agoniste à tester juste avant l'infection.

Les résultats montrent qu'en présence du récepteur S1PR1 non stimulé, l'infection est diminuée de 60% par rapport au contrôle plasmide vide et qu'en présence du récepteur S1PR1 stimulé par l'agoniste FTY720-P pendant 30 min avant l'ajout du virus, l'infection est alors diminuée de 90% par rapport au contrôle plasmide vide. Cette diminution de l'infection avec FTY720-P est du même niveau que celle qui est obtenue dans cette expérience lorsque les cellules sont incubées dans les mêmes conditions avec un anticorps anti-CCR5 ou avec un ligand de CCR5 (MIP1- β), qui sont connus pour inhiber l'infection par le VIH (Wu, L. et al., 1997, *J Exp Med* 186 :1373-1381 ; Cocchi, F. et al., 1995, *Science* 270 (5243) :1811-1815).

Mise en évidence d'une hétérodimérisation de S1PR1 avec CCR5 par la technique de HTRF

Les RCPG peuvent agir en tant qu'homodimères mais aussi par interactions hétérodimériques. Afin de préciser le mécanisme par lequel S1PR1 inhibe l'infection, nous l'avons testé pour sa capacité à hétérodimériser avec CCR5. Pour cela, nous avons utilisé une technologie de TR-FRET (Time Resolved- Fluorescence Resonance Energy Transfer), le HTRF (<http://www.htrf.com/technology/>). Dans cette technologie qui allie les principes du TRF (Time-Resolved Fluorescence) et du FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), chacun des récepteurs CCR5 et S1PR1 est exprimé à la surface membranaire en fusion traductionnelle avec les enzymes SNAP et CLIP, respectivement, qui permettent la liaison spécifique et irréversible de deux fluorophores couplés à des substrats de ces enzymes. Un signal de FRET est détecté lorsque les 2 fluorophores sont à des distances compatibles avec une hétérodimérisation entre les récepteurs.

Les résultats ont montré que le signal de FRET obtenu entre les récepteurs S1PR1 et CCR5 est comparable à celui obtenu pour l'homodimère CCR5, ce qui atteste d'une interaction directe à la membrane entre CCR5 et S1PR1, probablement au sein d'un complexe hétérodimérique.

II. Effet des agonistes de l'infection sur des lignées HOS-CD4

Les inventeurs ont corroboré leurs premiers résultats obtenus sur des lignées HEK293T exprimant les récepteurs CD4 CCR5 à l'aide de cellules HOS-CD4.

L'expression de S1PR1 inhibe l'infection d'une lignée HOS par le VIH

Une lignée HOS (Human Osteo Sarcoma) exprimant le récepteur CD4 a été transduite par un vecteur lentiviral permettant l'expression constitutive du co-récepteur CCR5 à la membrane plasmique afin de la rendre infectable par le virus VIH-1. Cette lignée HOS CCR5 est transduite à nouveau pour obtenir l'expression à la membrane du récepteur S1PR1 (HOS CCR5 S1PR1). En parallèle, une lignée transduite avec le gène lacZ (HOS CCR5 lacZ) est obtenue par la même technique en contrôle d'infectabilité.

Ces deux lignées sont infectées par différentes doses de virus Ad8-luc et leur infectabilité est évaluée 72h après l'infection par mesure de l'activité luciférase (Figure 1).

On constate donc que la simple présence du récepteur S1PR1 inhibe l'infection de la lignée HOS par le VIH. Cet effet est très marqué, si l'on considère qu'il s'agit d'un virus « one-round » et qui donc n'effectue qu'un seul cycle de réplication. Ce résultat vient confirmer les résultats présentés précédemment sur la ligne HEK293 où le virus était utilisé à une dose unique.

FTY720-P accentue l'inhibition de l'infection de la lignée HOS CCR5 S1PR1

Des cellules HOS CCR5 S1PR1 sont exposées pendant une heure au FTY720-P (33 μ M) puis infectées comme précédemment (Figure 2).

Dans cette expérience, la pré-incubation avec FTY720-P des cellules exprimant le récepteur S1PR1 a diminué l'infection de 80% supplémentaire, en plus de l'inhibition constatée en présence du S1PR1 non stimulé.

FTY720-P inhibe l'infection de la lignée HOS CCR5 en absence de S1PR1

Dans cette expérience, les inventeurs ont testé l'effet de différents agonistes des récepteurs S1PR sur l'infection par la souche Ad8-luc de la lignée HOS CCR5 qui n'exprime pas S1PR1.

Pour cela, des cellules HOS CCR5 lacZ ont été préincubées pendant 1 heure, soit avec un agoniste spécifique de S1PR1, le SEW2871 (33 μ M), soit l'agoniste naturel de tous les récepteurs S1PR (S1PR1 à S1PR5), la sphingosine-1-phosphate (S1P, 33 μ M), soit le FTY720-P (33 μ M) qui est agoniste de S1PR1, S1PR3, S1PR4 et S1PR5 (Figure 3).

Il apparaît d'abord que le SEW2871 ne modifie pas significativement l'infection dans cette expérience, résultat attendu étant donné que cette lignée n'exprime pas le S1PR1.

Par contre, le S1P et le FTY720 diminuent l'infection mesurée d'environ 50%, et ceci de manière très significative (test de student, $p < 0,01$). Il s'avère donc qu'outre le fait que la stimulation de S1PR1 diminue l'infection d'une lignée qui exprime ce récepteur à sa surface, que des agonistes des récepteurs S1PR2 à S1PR5 ont également un effet protecteur de l'infection.

III. Inhibition de l'infection de cellules primaires lymphocytaires par le FTY720-P

Des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) isolées à partir d'un donneur sain ont été préincubées en présence de FTY720-P à 1 μ M ou de S1P à 1 μ M, puis infectées par du virus Ad8-luc pendant 72h avant de mesurer l'activité luciférase. Les résultats montrent une inhibition d'environ 60% de l'infection par ces deux agonistes (Figure 4). L'expression du récepteur S1PR1 à la surface des PBMC n'a pas été détectée en cytométrie de flux (malgré la présence d'ARNm dans ces cellules).

Il est donc probable que l'effet de ces agonistes s'explique par la stimulation d'au moins un autre récepteur parmi les S1PR2, S1PR3, S1PR4, S1PR5.

Ce résultat confirme le fait que l'inhibition de l'infection par FTY720-P n'est pas seulement due à son effet sur S1PR1.

Pour confirmer cet effet sur les cellules primaires, des PBMC de donneurs sains ont été préincubées avec du FTY720-P à 1 μ M pendant une heure, puis infectées avec du virus réplicatif Ad8. La quantité de virus produit dans le milieu de culture a été évaluée par mesure de la protéine virale p24 à 4, 7, 9 et 11 jours après l'infection (Figure 5).

On observe une nette inhibition de la production virale par les PBMC, qui atteint 77% en moyenne au 9ème jour.

Ainsi, les inventeurs ont démontré l'effet des agonistes des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate à la fois sur des lignées cellulaires et sur des cellules primaires.

IV. Test de l'efficacité de l'activité anti-VIH de FTY720 *in vivo*

Cette expérience permet de confirmer *in vivo* dans le modèle de souris SCID humanisées (hu-PBL-SCID) et infectées par le VIH-1, l'activité anti-VIH du FTY720 montrée préalablement *in vitro* sur des lignées ou des cellules primaires.

Deux groupes d'animaux sont comparés vis-à-vis de l'infection par le VIH ; un groupe contrôle de 8 animaux non traités et un groupe de 6 animaux traités avec le FTY720. L'expérience a été réalisée comme suit :

- J-21: Réception des souris en animalerie A3 et adaptation d'une semaine à cet environnement.
- J-14: Reconstitution immunitaire des animaux par injection intra-péritonéale de PBMC humaines.
- J-1: Evaluation de la greffe immunitaire et constitution de deux groupes de souris ayant une distribution de souris reconstituées comparable. Début du traitement. Un gavage avec du FTY720 à 0,3mg par kg et par jour ou avec le véhicule, puis gavage journalier pendant 15 jours.
- J0 : Infection des souris par le virus VIH-1 de type R5.
- J6, 9, 12 : Dosage de la charge virale et sacrifice des animaux à J12.

La valeur moyenne des virémies pour chacun des 2 groupes est représentée dans la figure 6 (* : test de student, correction de Welch). On observe une diminution significative ($p = 0,023$) de l'infection des animaux traités. Cette expérience confirme donc l'effet anti-viral du FTY720 sur le VIH *in vivo*, dans le modèle de souris « humanisées ».

REVENDICATIONS

1. Composé qui est un agoniste d'au moins un récepteur choisi parmi les récepteurs S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 et S1PR5 pour une utilisation dans une méthode de traitement d'une infection à VIH chez l'homme ou l'animal.
 2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit agoniste est un agoniste du récepteur S1PR1.
 3. Composé selon l'une quelconque des revendications 1-2, caractérisé en ce que ledit agoniste est en outre un agoniste d'au moins un récepteur choisi parmi S1PR2, S1PR3, S1PR4 et S1PR 5.
 4. Composé selon l'une quelconque des revendications 1-2, ledit composé étant choisi dans le groupe comprenant la sphingosine-1-phosphate, FTY720, FTY720-P, AUY954, CYM- 5442, CYM-5181, SEW2871, VPC01091, DS-SG-44, KRP-203-P, DihydroS1P, Composé 26, Composé 12, la sphingosylphosphorylcholine et AFD-R.
 5. Composé selon l'une quelconque des revendications 1-4, ledit composé étant FTY720 ou FTY720-P.
1. Composition pharmaceutique pour une utilisation dans une méthode de traitement d'une infection à VIH chez l'homme ou l'animal, ladite composition comprenant un composé tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1-5 et un véhicule pharmaceutiquement acceptable.
 2. Composé selon l'une quelconque des revendications 1-5, ou composition selon la revendication 6, ladite infection à VIH étant une infection à VIH-1.
 3. Composé selon l'une quelconque des revendications 1-5, ou composition selon la revendication 4, ladite infection à VIH étant une infection à VIH-2.

Abrégé

L'invention concerne des composés qui sont des agonistes d'au moins un récepteur choisi parmi les récepteurs S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4 et S1PR5 pour une utilisation dans des méthodes de traitement d'infections à VIH chez l'homme ou l'animal.

FIGURES

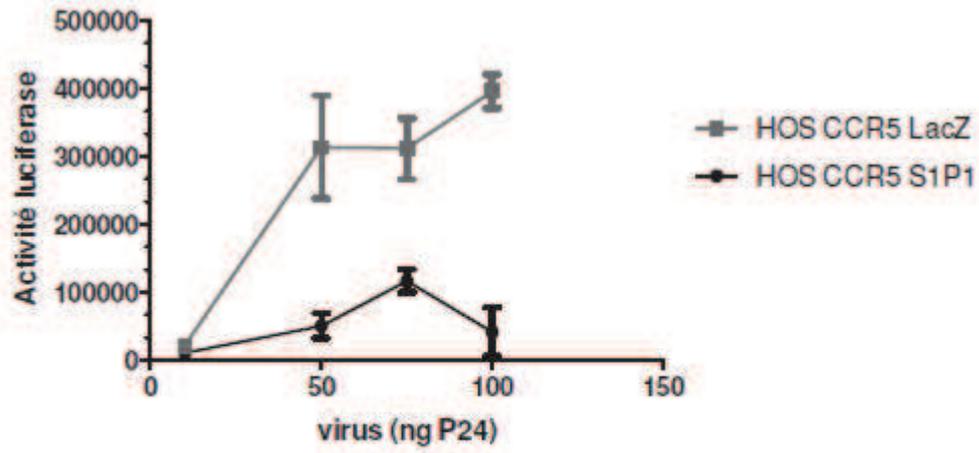


FIGURE 1

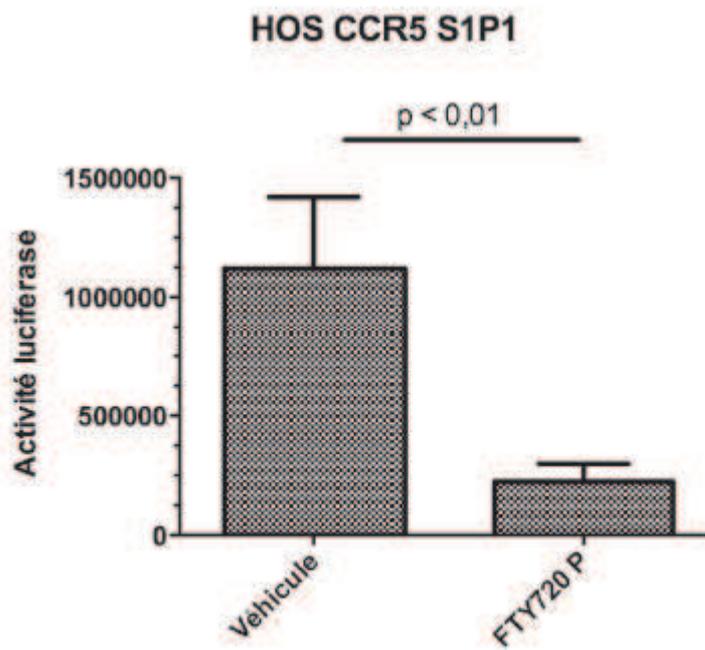


FIGURE 2

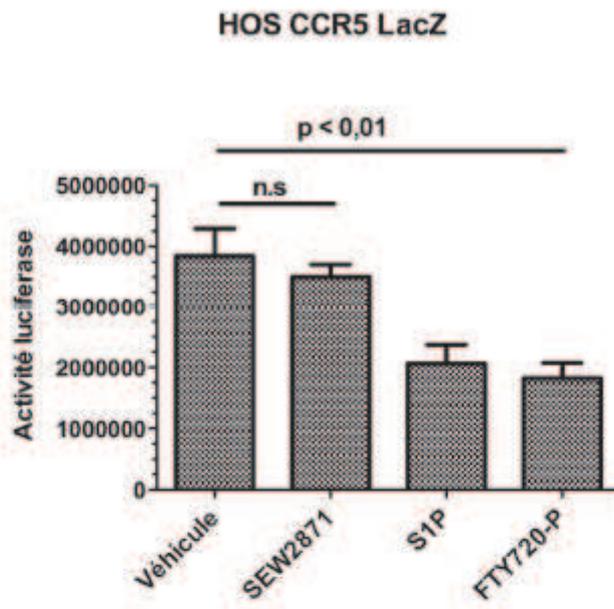


FIGURE 3

PBMC - infection avec un virus non répliatif

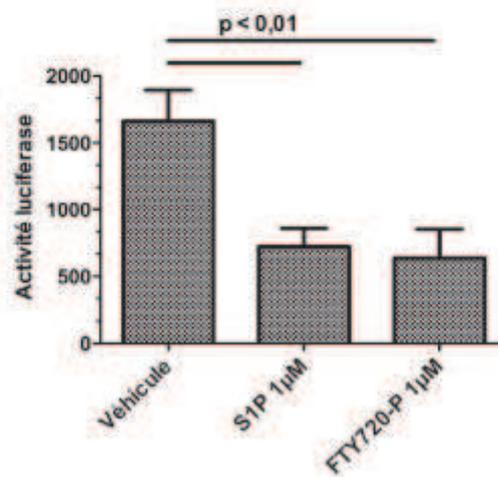


FIGURE 4

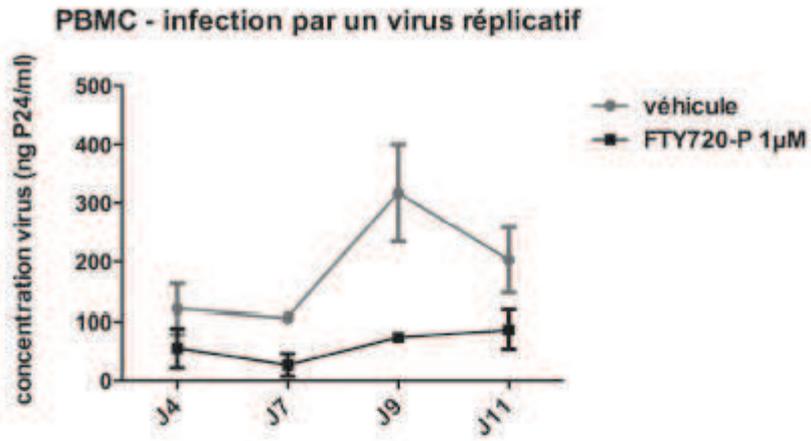


FIGURE 5

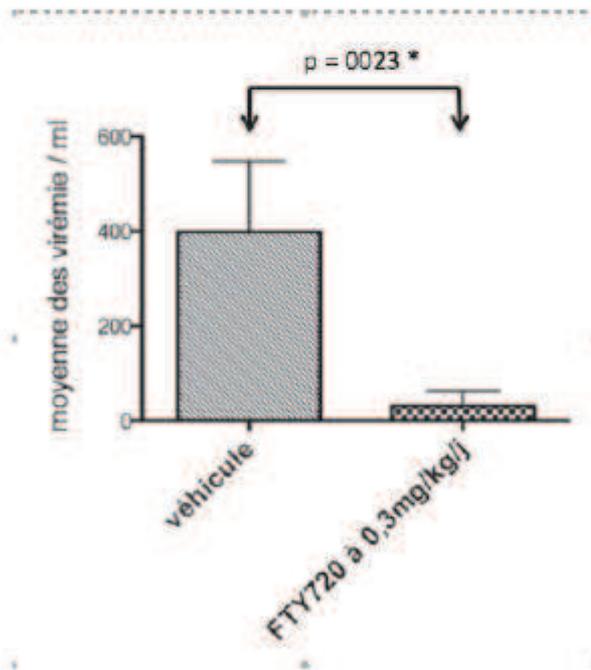


FIGURE 6

Gly Met His Met Pro Thr Ser Pro Thr Phe Leu Glu Gly Asn Thr Val 340
 345 350

Val

<210> 3
 <211> 378
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

Met Ala Thr Ala Leu Pro Pro Arg Leu Gln Pro Val Arg Gly Asn Glu 1
 5 10 15

Thr Leu Arg Glu His Tyr Gln Tyr Val Gly Lys Leu Ala Gly Arg Leu 20
 25 30

Lys Glu Ala Ser Glu Gly Ser Thr Leu Thr Thr Val Leu Phe Leu Val 35
 40 45

Ile Cys Ser Phe Ile Val Leu Glu Asn Leu Met Val Leu Ile Ala Ile 50
 55 60

Trp Lys Asn Asn Lys Phe His Asn Arg Met Tyr Phe Phe Ile Gly Asn 65 70
 75 80

Leu Ala Leu Cys Asp Leu Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Lys Val Asn Ile 85
 90 95

Leu Met Ser Gly Lys Lys Thr Phe Ser Leu Ser Pro Thr Val Trp Phe 100
 105 110

Leu Arg Glu Gly Ser Met Phe Val Ala Leu Gly Ala Ser Thr Cys Ser 115
 120 125

Leu Leu Ala Ile Ala Ile Glu Arg His Leu Thr Met Ile Lys Met Arg 130
 135 140

Pro Tyr Asp Ala Asn Lys Arg His Arg Val Phe Leu Leu Ile Gly Met 145 150
 155 160

Cys Trp Leu Ile Ala Phe Thr Leu Gly Ala Leu Pro Ile Leu Gly Trp 165
 170 175

Asn Cys Leu His Asn Leu Pro Asp Cys Ser Thr Ile Leu Pro Leu Tyr 180
 185 190

Ser Lys Lys Tyr Ile Ala Phe Cys Ile Ser Ile Phe Thr Ala Ile Leu 195
 200 205

Cys Leu Ala Arg Ala Val Glu Ala His Ser Gly Ala Ser Thr Thr Asp 340
345 350

Ser Ser Leu Arg Pro Arg Asp Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Leu Ser 355
360 365

Phe Arg Met Arg Glu Pro Leu Ser Ser Ile Ser Ser Val Arg Ser Ile 370
375 380

<210> 5
<211> 310
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Glu Ser Gly Leu Leu Arg Pro Ala Pro Val Ser Glu Val Ile Val 1
5 10 15

Leu His Tyr Asn Tyr Thr Gly Lys Leu Arg Gly Ala Arg Tyr Gln Pro 20
25 30

Gly Ala Gly Leu Arg Ala Asp Ala Val Val Cys Leu Ala Val Cys Ala 35
40 45

Phe Ile Val Leu Glu Asn Leu Ala Val Leu Leu Val Leu Gly Arg His 50
55 60

Pro Arg Phe His Ala Pro Met Phe Leu Leu Leu Gly Ser Leu Thr Leu 65 70
75 80

Ser Asp Leu Leu Ala Gly Ala Ala Tyr Ala Ala Asn Ile Leu Leu Ser 85
90 95

Gly Pro Leu Thr Leu Lys Leu Ser Pro Ala Leu Trp Phe Ala Arg Glu 100
105 110

Gly Gly Val Phe Val Ala Leu Thr Ala Ser Val Leu Ser Leu Leu Ala 115
120 125

Ile Ala Leu Glu Arg Ser Leu Thr Met Ala Arg Arg Gly Pro Ala Pro 130
135 140

Val Ser Ser Arg Gly Arg Thr Leu Ala Met Ala Ala Ala Ala Trp Gly 145 150
155 160

Val Ser Leu Leu Leu Gly Leu Leu Pro Ala Leu Gly Trp Asn Cys Leu 165
170 175

Gly Arg Leu Asp Ala Cys Ser Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ala Lys Ala 180
185 190

Tyr Val Leu Phe Cys Val Leu Ala Phe Val Gly Ile Leu Ala Ala Ile

Ile Ala Leu Glu Arg Ser Leu Thr Met Ala Arg Arg Gly Pro Ala Pro 130
 135 140

Val Ser Ser Arg Gly Arg Thr Leu Ala Met Ala Ala Ala Ala Trp Gly 145
 150 155
 160

Val Ser Leu Leu Leu Gly Leu Leu Pro Ala Leu Gly Trp Asn Cys Leu 165
 170 175

Gly Arg Leu Asp Ala Cys Ser Thr Val Leu Pro Leu Tyr Ala Lys Ala 180
 185 190

Tyr Val Leu Phe Cys Val Leu Ala Phe Val Gly Ile Leu Ala Ala Ile 195
 200 205

Cys Ala Leu Tyr Ala Arg Ile Tyr Cys Gln Val Arg Ala Asn Ala Arg 210
 215 220

Arg Leu Pro Ala Arg Pro Gly Thr Ala Gly Thr Thr Ser Thr Arg Ala 225
 230 235
 240

Arg Arg Lys Pro Arg Ser Leu Ala Leu Leu Arg Thr Leu Ser Val Val 245
 250 255

Leu Leu Ala Phe Val Ala Cys Trp Gly Pro Leu Phe Leu Leu Leu Leu 260
 265 270

Leu Asp Val Ala Cys Pro Ala Arg Thr Cys Pro Val Leu Leu Gln Ala 275
 280 285

Asp Pro Phe Leu Gly Leu Ala Met Ala Asn Ser Leu Leu Asn Pro Ile 290
 295 300

Ile Tyr Thr Leu Thr Asn Arg Asp Leu Arg His Ala Leu Leu Arg Leu 305
 310 315
 320

Val Cys Cys Gly Arg His Ser Cys Gly Arg Asp Pro Ser Gly Ser Gln 325
 330 335

Gln Ser Ala Ser Ala Ala Glu Ala Ser Gly Gly Leu Arg Arg Cys Leu 340
 345 350

Pro Pro Gly Leu Asp Gly Ser Phe Ser Gly Ser Glu Arg Ser Ser Pro 355
 360 365

Gln Arg Asp Gly Leu Asp Thr Ser Gly Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala 370
 375 380

Pro Thr Ala Ala Arg Thr Leu Val Ser Glu Pro Ala Ala Asp 385
 390 395