



FACULTE DE BIOLOGIE ET DE MEDECINE  
DEPARTEMENT DE MEDECINE

Service d'immunologie et d'allergie  
Chef de service : Professeur Giuseppe Pantaleo

**Analyse de la production thymique et de la prolifération  
périphérique des lymphocytes T CD4 et CD8 durant la  
phase chronique de l'infection à VIH-1**

THESE

présentée à la Faculté de Biologie et de Médecine de  
l'Université de Lausanne pour l'obtention  
du grade de

DOCTEUR EN MEDECINE

par

Milica Spasojevic

WC  
503  
Spa

BITE 3385

Médecin diplômée de la Confédération Suisse  
Originaire de Montreux

Lausanne 2006

# TABLE DES MATIERES

<i>Résumé</i>	1
<i>Remerciements</i>	3
<i>Introduction</i>	4
<b>1 Immunopathologie de l'infection à VIH-1</b>	<b>4</b>
1.1 Données générales	4
1.2 Hypothèses : épuisement des lymphocytes T CD4	6
1.2.1 Prolifération des lymphocytes T	6
1.2.2 Reconstitution immunitaire	8
1.2.3 Cas de l'infection à VIH-1	9
<b>2 Fonction thymique dans le cadre d'une infection à VIH-1</b>	<b>11</b>
2.1 Lymphopoïèse T	11
2.2 Analyse de la fonction thymique à l'aide des cercles d'excision générés lors du réarrangement du récepteur aux cellules T ( <i>TCR rearrangement excision circles</i> ou TRECs)	14
2.3 Thymus et infection à VIH-1: revue des études	17
<b>3 Etude de l'expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire, dans le cadre d'une infection à VIH-1, par la méthode des biopuces d'ADN complémentaire (ADNc)</b>	<b>21</b>
3.1 Prolifération cellulaire dans le cadre d'une infection à VIH-1	21
3.2 Cycle cellulaire	22
3.3 Analyse des motifs d'expression génétique par biopuces d'ADN complémentaire	27
3.4 Possibilités d'utilisation des biopuces d'ADNc	28
3.4.1 Analyse fonctionnelle de l'expression des gènes	28
3.4.2 Applications des biopuces d'ADNc en oncologie	30
3.4.3 Applications des biopuces d'ADNc en immunologie	31
3.4.4 Applications des biopuces d'ADNc en virologie	32
<i>But du projet</i>	33

<b>Méthodes</b>	<b>34</b>
1 Cohorte et échantillonnage	34
2 Isolation par billes immunomagnétiques de lymphocytes T CD4 et CD8	35
2.1 Sélection positive	36
2.2 Sélection négative	36
3 Mesure du contenu en TRECs	36
4 Analyse de la prolifération cellulaire : expression du Ki67	37
5 Stimulation <i>in vitro</i> et marquage au CFSE	38
6 Extraction d'ARN	38
7 Hybridation sur membrane	39
8 Analyse statistique	40
<b>Résultats</b>	<b>42</b>
1 Analyse de la production thymique : contenu en TRECs des lymphocytes T CD4 et CD8 périphériques	42
1.1 Variations du contenu en TRECs en fonction du stade clinique, chez les sujets VIH-1-positifs	42
1.2 Facteurs influençant le contenu en TRECs	45
1.2.1 Prolifération cellulaire : expression du marqueur Ki67	46
1.2.2 Pourcentage de cellules naïves dans les échantillons analysés	47
2 Biopuces d'ADNc : profils d'expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire	50
2.1 Profil d'expression génétique d'une activation <i>in vitro</i> par anticorps anti-CD3 et anti-CD28	52
2.2 Expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire dans le cadre d'une infection à VIH-1	54
<b>Discussion</b>	<b>56</b>
1 Fonction thymique durant l'infection à VIH-1	56
2 Capacité de prolifération des lymphocytes T dans le cadre d'une infection à VIH-1	59
<b>Conclusions</b>	<b>62</b>
<b>Références</b>	<b>63</b>

## FIGURES ET TABLES

<b>Figure 1</b> : Evolution d'une infection à VIH-1 _____	4
<b>Figure 2</b> : Effets directs et indirects de l'infection à VIH-1 _____	9
<b>Figure 3</b> : Changements phénotypiques lors de la maturation des thymocytes _____	12
<b>Figure 4</b> : Loci chromosomiques des sous-unités $\alpha$ et $\beta$ du TCR _____	13
<b>Figure 5</b> : Mécanismes de formation et détection des TRECs _____	16
<b>Figure 6</b> : Cascades enzymatiques principales de régulation du cycle cellulaire _____	26
<b>Figure 7</b> : Biopuces d'ADNc : vue générale de la manipulation _____	29
<b>Figure 8</b> : Contenu moyen en TRECs des sujets VIH-1-positifs, aux différents stades de la maladie _____	43
<b>Figure 9</b> : Analyse de l'expression du marqueur Ki67 chez les sujets VIH-1-négatifs et positifs _____	46
<b>Figure 10</b> : Analyse de l'expression du marqueur CD45RA chez les sujets VIH-1-négatifs et positifs _____	48
<b>Figure 11</b> : Biopuces d'ADNc : présentation des résultats _____	51

## ANNEXES

<b>Annexe 1</b> : Index _____	A-1
<b>Annexe 2</b> : Liste complète des gènes contenus sur la Atlas™ cDNA Expression Cell Cycle Array _____	A-2

## RESUME

Dans le cadre de l'infection à VIH-1, deux mécanismes généraux, a) une destruction périphérique massive ou b) un défaut dans la production périphérique ou centrale de nouvelles cellules, pourraient être à l'origine de l'épuisement des lymphocytes T CD4. La question soulève une importante controverse.

Dans cette étude, la production thymique et la capacité de prolifération de lymphocytes T ont été étudiées conjointement. La production thymique a été évaluée par l'analyse du contenu en cercles d'excision générés lors du réarrangement du récepteur aux cellules T (ou TRECs) des cellules T CD4 et CD8 périphériques, provenant de sujets sains VIH-1 négatifs (n=120) ou infectés par le VIH-1 (n=297), au stade précoce, intermédiaire et tardif de la phase chronique de la maladie. Au stade précoce, nous observons que le contenu en TRECs de la population CD4 est supérieur à celui de la population contrôle. Aucune différence n'est observée lors de la phase intermédiaire, alors que le contenu en TRECs est inférieur lors de la phase tardive, en comparaison avec le groupe contrôle. Pour les lymphocytes T CD8, le contenu en TRECs reste inférieur au groupe contrôle, à tous les stades de la maladie. Ainsi, au stade précoce, la production thymique chercherait à compenser la perte de lymphocytes T CD4 puis, avec l'évolution de la maladie, cette possibilité s'épuiserait.

Les profils d'expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire pour les cellules T CD4 et CD8 périphériques, obtenus par la méthode des biopuces d'ADNc (*microarray*), ont permis l'analyse de la capacité de prolifération périphérique des lymphocytes T. Trois populations cellulaires ont été comparées entre elles : lymphocytes provenant de sujets infectés par le VIH-1, lymphocytes provenant de sujets VIH-1-négatifs et lymphocytes activés *in vitro* provenant de sujets VIH-1-négatifs. Les résultats montrent, pour les cellules T CD8, un état d'activation et un profil d'expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire comparables à ceux des cellules activées *in vitro*. Le profil d'expression génétique des cellules T CD4, par contre, montre une activation sub-optimale, conjointement à une forte expression de p53, ce qui pourrait amener à un bloc en phase G<sub>1</sub> du cycle cellulaire ainsi qu'à une forte apoptose.

En conclusion, cette perturbation de la progression du cycle cellulaire des lymphocytes T CD4 périphériques pourrait contribuer à l'échec de la restauration du nombre de lymphocytes T CD4 et

ceci, malgré une production thymique conservée dans les stades précoces de la maladie, comme démontré par l'analyse du contenu en TRECs.

## **REMERCIEMENTS**

- au Professeur Giuseppe Pantaleo, Chef du Service d'Immunologie et d'Allergie du Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis d'effectuer mon travail de thèse au sein du Laboratoire d'Immunopathologie du SIDA durant ma 4<sup>e</sup> année d'études
- au Dr. Massimo Nobile pour sa patience à l'encontre de l'étudiante en médecine que je suis et pour ses précieux conseils pour réaliser cette thèse
- au Dr. Rafael Correa pour ses explications techniques sur la méthode de détection des TRECs
- à toute l'équipe du Laboratoire d'Immunopathologie du SIDA (LIPS) pour la meilleure ambiance de travail que j'aie connu : inoubliable !

## INTRODUCTION

### 1 IMMUNOPATHOLOGIE DE L'INFECTION A VIH-1

#### 1.1 DONNEES GENERALES

La maladie due à une infection par le virus VIH-1 correspond à une infection chronique active des cellules exprimant le co-recepteur CD4 et plus particulièrement des lymphocytes T CD4 et des organes lymphoïdes, qui se traduit par une destruction systématique des lymphocytes T CD4, et particulièrement ceux spécifiques au VIH-1 (1) et conduit à une sévère immunosuppression (2).

L'infection évolue suivant trois stades cliniques : la primo-infection, la phase chronique et le Syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). La figure 1 montre, suivant ces trois stades cliniques, l'évolution de la virémie et du compte de lymphocytes T CD4.

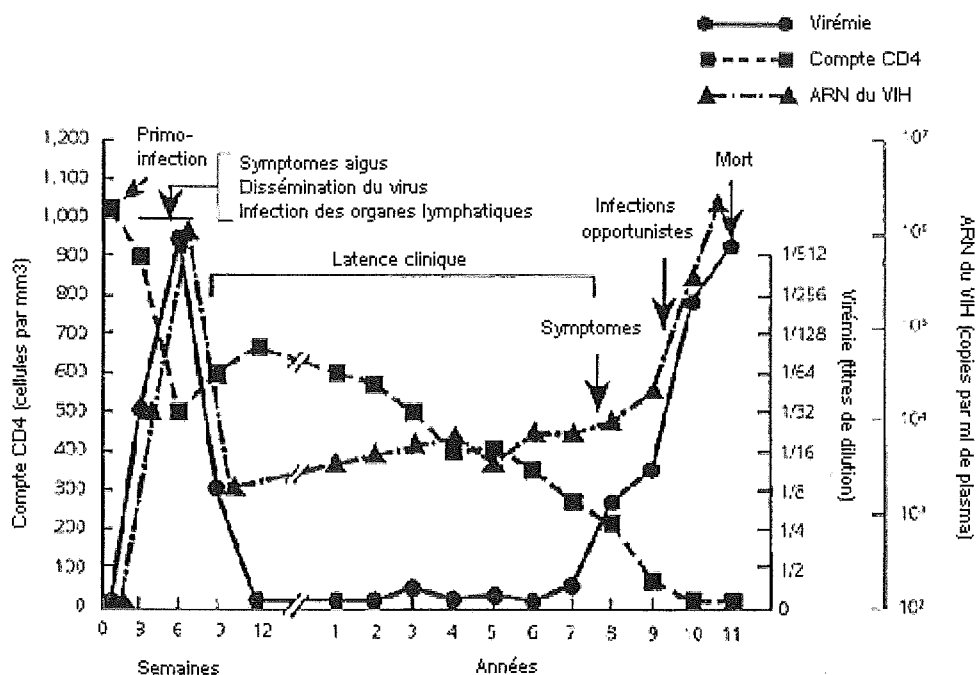


Figure 1. (Adapté de (2)) Evolution de l'infection à VIH-1



La *primo-infection* désigne la période qui s'étend de l'infection de l'organisme à l'apparition d'une réponse immunitaire spécifique. Elle est symptomatique chez plus de la moitié des patients infectés. Les signes cliniques apparaissent au cours des 2 à 6 semaines suivant le contact infectieux, le plus souvent sous la forme d'un syndrome grippal. Ils disparaissent spontanément en quelques jours ou semaines (2).

La charge virale est très élevée et atteint son pic dans les jours qui suivent l'apparition des symptômes. Ce pic de virémie est associé à une diminution transitoire du nombre de lymphocytes T CD4. Il s'agit de la phase de dissémination de l'infection aux organes lymphatiques qui comprend une phase de réplication virale intense avec infection et destruction d'un grand nombre de cellules T CD4 (3). Toutefois, le virus VIH-1 est également capable d'intégrer son génome dans celui de la cellule, et de rester sous cette forme de provirus latent, sans replication. Ce réservoir de cellules infectées de façon latente est formé très tôt et constitue un facteur important d'échappement au système immunitaire (4). La chute de la virémie et l'augmentation du taux de cellules T CD4 coïncident avec l'apparition de la réponse immunitaire cytotoxique (5) (6).

L'*infection chronique* se caractérise par une phase de latence clinique, malgré une infection active et progressive. Elle s'accompagne d'une perte progressive des cellules T CD4, beaucoup plus lente en comparaison avec la primo-infection, (7) et se divise en trois stades, définis selon le compte de cellules T CD4 : stade précoce (plus de 500 cellules par  $\mu\text{l}$  de sang), stade intermédiaire (entre 500 et 200 cellules par  $\mu\text{l}$ ), et stade tardif (moins de 200 cellules par  $\mu\text{l}$ ). A titre comparatif, chez un individu VIH-1-négatif, ce compte est en moyenne de 1000 cellules par microlitre .

Les mécanismes responsables de la disparition des cellules T CD4 durant la phase chronique ne sont pas entièrement élucidés.

Le *syndrome d'immunodéficience acquise de l'adulte (SIDA)* apparaît, en général, pour des comptes de cellules T CD4 inférieurs à 200 cellules par microlitre. Cette phase se traduit par l'apparition d'infections opportunistes et de néoplasies, entraînant la mort de l'individu.

## 1.2 HYPOTHESES : EPUISEMENT DES LYMPHOCYTES T CD4

Chez un individu sain, le nombre de lymphocytes T CD4 périphériques, nécessaire à une immunité efficace, est maintenu par des mécanismes homéostatiques, correspondant à la *prolifération antigène-indépendante* des lymphocytes T. Celle-ci comprend la production périphérique (prolifération périphérique) et centrale (production thymique) de lymphocytes T. Ce sont ces mécanismes qui permettent une reconstitution immunitaire suite à une chimiothérapie anti-cancéreuse, par exemple. L'autre versant de la prolifération des lymphocytes T est constitué par la *prolifération antigène dépendante*, dans le cadre d'une infection qui active les cellules antigène-spécifiques, par exemple.

L'épuisement des lymphocytes T CD4, observé durant l'infection à VIH-1, pourrait provenir d'une perturbation de chacun de ces mécanismes, ce qui explique le nombre d'hypothèses existant à ce sujet (8). En effet, la controverse actuelle concerne d'une part l'état de la prolifération périphérique et d'autre part la production thymique des lymphocytes T CD4, dans le contexte d'une infection à VIH-1 (9, 10).

Aucune hypothèse actuelle ne parvient à complètement expliquer pourquoi le système immunitaire ne parvient pas à régénérer et finit par s'épuiser. Commençons par exposer ici les mécanismes de reconstitution immunitaire physiologiques et les différentes perturbations induites par l'infection à VIH-1. Les controverses actuelles concernant l'état de la production thymique et la prolifération périphérique des lymphocytes T CD4, dans le cadre de l'infection à VIH-1, seront présentées dans les chapitres 2 et 3 de l'introduction.

### 1.2.1 Homéostasie des lymphocytes T

L'homéostasie des lymphocytes T cherche à maintenir la population des lymphocytes T en régulant le niveau de production centrale, de prolifération périphérique et de mort (en particulier l'apoptose) des lymphocytes T. Pour un individu sain, les lymphocytes T prolifèrent principalement dans deux cas de figure : *prolifération homéostatique ou antigène-indépendante* et *prolifération antigène-dépendante*.

La prolifération des lymphocytes T en réponse à un antigène comprend l'activation et la prolifération des cellules suite à l'interaction de l'antigène lié au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) avec le récepteur aux cellules T (TCR ou *T cell receptor*) (11,

12). Pour les lymphocytes T CD4, l'antigène est présenté par le CMH de classe II, à la surface des cellules présentatrices d'antigène (APC ou *antigen presenting cells*), et, pour les CD8, par le CMH de classe I. L'activation et la capacité de prolifération des cellules spécifiques ne dépendent pas uniquement de l'interaction TCR/antigène/CMH, mais nécessitent entre autres des signaux de costimulation supplémentaires, délivrés principalement par les molécules de costimulation à la surface des APC et des lymphocytes T activés.

En dehors d'une prolifération antigène-dépendante, l'homéostasie des lymphocytes T est régulée à plusieurs niveaux : a) au niveau de la *prolifération périphérique*, b) au niveau du taux d'*apoptose*, et enfin, c) au niveau de la *production centrale* de nouvelles cellules, aussi bien au niveau de la production de cellules souches par la *moelle osseuse*, qu'au niveau du *thymus*.

L'homéostasie permet de réguler la quantité de lymphocytes T, ainsi que la qualité du répertoire TCR (13). Cette dernière caractéristique dépend principalement de la production thymique, car la prolifération périphérique des lymphocytes T augmente le nombre de lymphocytes périphériques mais ne fait pas varier leur spécificité.

Il est important de signaler que l'homéostasie des sous-populations de lymphocytes T naïves et mémoires utilisent des mécanismes de signalisation différents.

En effet, la taille du réservoir de cellules naïves dépend du taux de production thymique, de la capacité de survie et du taux de prolifération périphérique (14). Le mécanisme de régulation de la production thymique n'est pas connu. Celle-ci ne varie pas avec le nombre de cellules naïves périphériques, notamment (15). La survie des cellules naïves semble dépendre de signaux délivrés par des cytokines et les liaisons de faible affinité aux CMH portant les antigènes du soi (16). Dans ce dernier cas de figure, il s'agit d'un mécanisme de signalisation dont la portée augmente dans une population périphérique restreinte, car dans une population normale la présence d'autres cellules inhibe la prolifération induite par l'interaction avec les CMH portant les antigènes du soi (17). Il s'agit d'une interaction de faible affinité qui induit une prolifération d'autant plus efficace que le nombre de cellules naïves est bas. Pour ce qui est des cytokines, Il-7 semble jouer un rôle prépondérant, tout particulièrement pour la population des cellules T CD4 (18).

Les cellules mémoires, quant à elles, prolifèrent suivant un mécanisme CMH-indépendant et ont un taux de prolifération basal supérieur à celui des cellules naïves (19). Une autre

cytokine, l'Il-15, semble jouer un rôle décisif, surtout en ce qui concerne l'homéostasie des cellules T CD8 (20).

Il en ressort que les sous-populations de lymphocytes T CD4 et CD8 sont également régulées par des mécanismes en partie distincts : nous avons mentionné le rôle d'Il-7 pour les lymphocytes T CD4 et celui d'Il-15 pour les lymphocytes T CD8.

En plus de ces distinctions, la contribution respective de la production périphérique et centrale de nouvelles cellules varierait avec l'âge. En effet, l'action du thymus est tout particulièrement importante chez les enfants (21), alors que, chez les adultes, la reconstitution immunitaire se ferait en premier lieu par une augmentation de la prolifération périphérique des lymphocytes restants (22).

### **1.2.2 Reconstitution immunitaire**

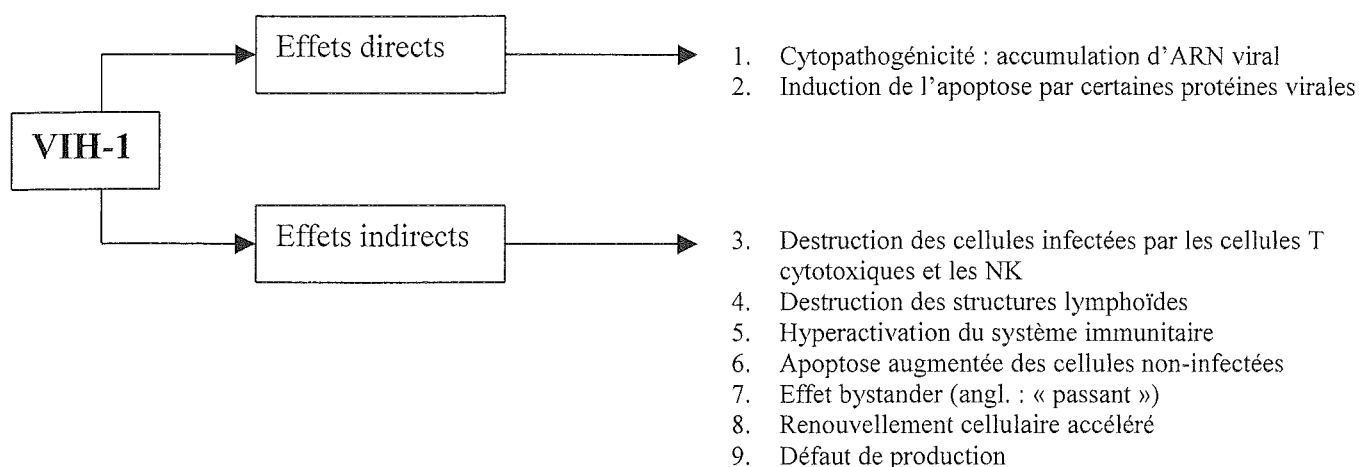
Dans le cadre d'une lymphopénie induite par une chimiothérapie myélo-ablative lors d'une leucémie par exemple, la transfusion de cellules souches est suivie par une récupération rapide du nombre de lymphocytes T CD8 par expansion périphérique, alors que la reconstitution du réservoir de cellules T CD4 prend beaucoup plus de temps en particulier chez les patients adultes (23).

Il semble donc que les deux mécanismes de reconstitution immunitaire, thymo-dépendants et thymo-indépendants, n'aient pas la même importance pour les cellules T CD4 et CD8 (24). Les mécanismes thymo-indépendants représentent la prolifération homéostatique et la prolifération antigène-dépendante (25). Nous avons vu que la prolifération homéostatique était régulée par les cytokines Il-7 et Il-15 pour les populations de lymphocytes T CD4 et CD8 respectivement (26).

Toutefois, une reconstitution immunitaire complète passe obligatoirement par la récupération du répertoire TCR et doit donc se faire par l'activation de la production thymique (27). Cette dernière est beaucoup plus efficace chez les enfants, qui récupèrent rapidement une immunité normale. Chez les adultes, la reconstitution du répertoire TCR et du nombre de cellules T CD4 périphériques, qui semble se faire principalement par la voie du thymus, prend plus de temps (28).

### 1.2.3 Cas de l'infection à VIH-1

Nous avons présenté les différents mécanismes responsables du maintien du nombre de lymphocytes T périphériques. Il s'agit maintenant d'exposer les différentes hypothèses expliquant l'inefficacité de ces mécanismes dans le cadre de l'infection à VIH-1 et l'épuisement des lymphocytes T CD4 durant la phase chronique de la maladie. La figure 2 illustre les possibles effets de l'infection à VIH-1.



**Figure 2. Effets directs et indirects de l'infection à VIH-1**

Ces mécanismes directs et indirects participent à la mise en place des trois principales hypothèses de travail, pouvant provoquer l'épuisement des lymphocytes T CD4 durant la phase chronique de l'infection à VIH-1 : a) destruction des cellules CD4 matures, b) hyperactivation du système immunitaire et c) défaut de production de nouvelles cellules. Ces trois mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs et peuvent coexister.

#### **Destruction des cellules CD4 matures**

Les études de Ho et Shaw soutiennent que l'épuisement des lymphocytes T CD4 provient d'une destruction continue et importante de cellules matures, étant donné que, chaque jour, 1 à 2 millions sont infectées et tuées par effet direct (effet cytopathique du virus, par exemple) ou indirect (destruction des cellules infectées par les lymphocytes T CD8, par exemple) de l'infection. Ce phénomène dépasserait à la longue la capacité de renouvellement du système

immunitaire (9). Les mêmes chercheurs soutiennent l'hypothèse d'une accélération de la prolifération des lymphocytes T CD4 durant la phase chronique de l'infection, qui compense, dans le stade précoce de l'infection chronique, la chute du nombre de cellules T CD4.

D'autres travaux affirment que la destruction de cellules matures et ses conséquences, par exemple l'épuisement des réserves du système immunitaire suite au renouvellement accéléré et prolongé des cellules T CD4, ne suffisent pas pour expliquer la perte des lymphocytes T CD4, et que des mécanismes additionnels, comme une perturbation de la production thymique ou de la capacité de prolifération périphérique des cellules T CD4 sont à envisager (10, 29, 30). De plus, plusieurs autres publications ne soutiennent pas l'hypothèse du renouvellement accéléré des lymphocytes T CD4 durant la phase chronique de l'infection.

### **Hyper-activation du système immunitaire**

Il s'agit là de l'une des dysfonctions principales de l'infection à VIH-1. L'hyper-activation du système immunitaire proviendrait aussi bien des mécanismes antigène-dépendants qu'antigène-indépendants. En effet, l'hyper-activation aboutit à la mise en place d'un environnement cytokinique anormal qui perturbe la fonction et la capacité de prolifération des lymphocytes non-infectés. Ce phénomène est appelé également : effet bystander (angl. : « passant ») (8). Cette hyper-activation entraîne une perte accélérée des cellules non-infectées par plusieurs mécanismes : par leur activation et passage dans les factions effectrices dont la survie est diminuée, par la perturbation des mécanismes de prolifération homéostatique et par une augmentation du niveau d'apoptose de ces cellules (31-34).

### **Défaut de production de nouvelles cellules**

Un défaut de production de nouvelles cellules par les mécanismes homéostatiques, empêchant la régénération efficace du réservoir de cellules T CD4, peut provenir de deux mécanismes : a) d'une perturbation de la capacité de prolifération périphérique des lymphocytes T (29, 30) ou b) d'un défaut de la production centrale au niveau de la moelle osseuse ou du thymus (10). Ces deux hypothèses font objet de controverses qui furent la principale raison de la mise en place de notre étude et qui seront exposées plus en détail dans les chapitres 2 et 3 de l'introduction.

## 2 FONCTION THYMIQUE DANS LE CADRE D'UNE INFECTION A VIH-1

### 2.1 LYMPHOPOÏESE T

#### **Structure du thymus (35,36)**

Les précurseurs des cellules T sont formés dans la moelle osseuse, mais le développement et la sélection des cellules T matures prend place principalement dans le thymus. Le thymus est chargé de la mise en place du répertoire des TCR d'un individu. A la fin de l'adolescence, le thymus subit une involution physiologique et son activité commence à diminuer.

Il s'agit d'une glande encapsulée, composée de lobules séparés par des septas fibreux. Ils contiennent les vaisseaux sanguins qui irradient la glande. Chaque lobule est constitué d'un réseau complexe de cellules épithéliales, cellules présentatrices d'antigènes et autres cellules, qui régulent le développement et la maturation des cellules T.

Les lobules du thymus se divisent en deux régions : le *cortex* externe, constitué de cellules épithéliales corticales entourées de thymocytes immatures et de quelques macrophages et la *médulla* interne, constituée de cellules épithéliales médullaires et de cellules dendritiques, entourées de thymocytes matures et de la majorité des macrophages.

Il est possible de suivre le développement des lymphocytes T en suivant l'expression des différents marqueurs de surface, spécifiques à chaque étape de leur maturation. Les marqueurs principaux, spécifiques des lymphocytes T, sont les molécules CD4 et CD8, co-récepteurs pour les molécules du CMH de classe II et I, respectivement, déterminant le rôle auxiliaire ou cytotoxique du lymphocyte, et le complexe CD3, présent sur tous les lymphocytes T. Les autres molécules d'intérêt, dont la présence permet de déterminer le niveau de maturation des thymocytes, sont les sous-unités du TCR, les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ , dans la majorité des cas, ou, sinon,  $\gamma$  et  $\delta$ .

Les cellules souches, provenant de la moelle, entrent dans le thymus par les vaisseaux des septas et démarrent leur processus de maturation en migrant dans le cortex. Ces lymphocytes sont désignés « doubles négatifs », car ils ne portent aucune des deux molécules CD4 ou CD8. Elles interagissent avec les cellules stromales, ce qui induit une phase de prolifération intense,

suivie de la phase de réarrangement génétique et d'expression des gènes des sous-unités du TCR. Si le récepteur obtenu par réarrangement est fonctionnel, débute alors l'expression des molécules CD4 et CD8 (Figure 3).

Ces thymocytes immatures, appelés « doubles positifs » car ils expriment conjointement CD4 et CD8, migrent dans la médulla et deviennent « simples positifs », CD4 ou CD8, ceci durant la sélection finale du répertoire des TCR, dans la médulla. Il s'agit d'une double sélection : il faut sélectionner les récepteurs, qui, en plus d'être fonctionnels dans la reconnaissance d'antigènes étrangers présentés par les molécules du CMH (sélection positive), ne sont pas réactifs aux auto-antigènes (sélection négative). Ainsi, 95% des thymocytes vont subir l'apoptose durant ce processus. Au final, en périphérie, on rencontre deux populations de lymphocytes T : les cellules CD4<sup>+</sup> (cellules T auxiliaires) ou CD8<sup>+</sup> (cellules T cytotoxiques).

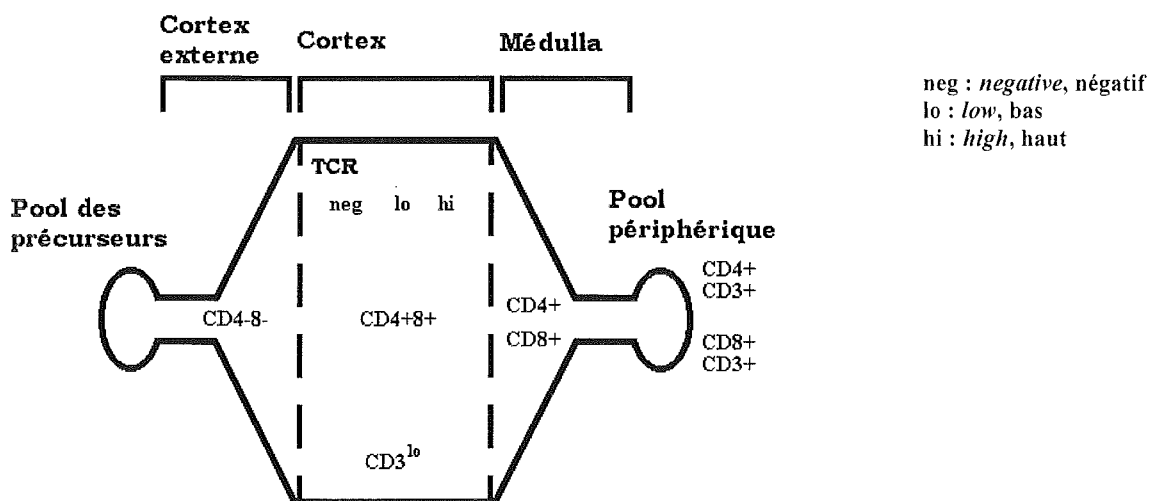


Figure 3. Changements phénotypiques lors de la maturation des thymocytes

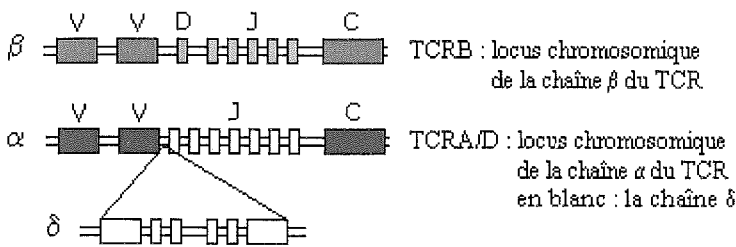
### Réarrangement des gènes du TCR

La spécificité de chaque cellule T n'est pas déterminée directement dans la lignée germinale; en fait, les gènes du TCR définitif sont le résultat de recombinaisons de différents segments de gènes communs à tous les récepteurs au début de la différenciation.

Le TCR est constitué de deux sous-unités de reconnaissance de l'antigène,  $\alpha$  et  $\beta$  ou  $\gamma$  et  $\delta$ , associées au complexe protéinique CD3, impliqué dans la transduction du signal. La plupart



des lymphocytes T ont un récepteur TCR $\alpha\beta$ . Chaque sous-unité du récepteur comprend une partie variable V et une partie constante C. La partie variable, qui sert à la reconnaissance de l'antigène, est formée par la recombinaison des gènes des domaines V (*variabilité*), D (*diversité*) et J (*joining*) pour les chaînes  $\beta$  et  $\delta$ , et uniquement des gènes des domaines V et J pour les chaînes  $\alpha$  et  $\gamma$ . Dans la lignée germinale, chaque domaine est constitué de plusieurs gènes ou *segments* (Figure 4). Les chaînes  $\alpha$  et  $\gamma$  partageant le locus chromosomique TCRA/D sur le chromosome 14, où les domaines D, J et C de la chaîne  $\delta$  se trouvent entre les domaines V et J de la chaîne  $\alpha$ . Les deux autres loci, TCRB pour la chaîne  $\beta$  et TCRG pour la chaîne  $\gamma$ , se trouvent sur le chromosome 7.



**Figure 4. Loci chromosomiques des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR**

Les réarrangements s'effectuent dans un ordre précis. Pour la chaîne  $\beta$ , par exemple, le réarrangement D/J a lieu avant le réarrangement V/DJ. Le nombre de différents segments V, D et J présents détermine la diversité potentielle des combinaisons ; chaque segment V peut être recombiné avec tous les segments D et J. Par exemple, le locus de la chaîne  $\beta$  contient environ 50 domaines V, 2 domaines D et 14 domaines J, ce qui permet 1400 combinaisons. Le locus de la chaîne  $\alpha$  contient environ 50 domaines V et 50 domaines J, c'est-à-dire 2500 combinaisons. Le nombre de combinaisons  $\alpha\beta$  s'élève donc en théorie à 3500000. D'autres mécanismes moléculaires permettent d'élever ce nombre à  $10^8$  au minimum !

La cellule, au stade CD4-CD8-, commence par réarranger le gène TCR $\beta$  qui sera exprimé à la surface cellulaire, lié à une protéine pré-TCR $\alpha$  et au CD3, si le réarrangement est fonctionnel. Ce «pré-TCR» va pouvoir transmettre les signaux pour la survie, la prolifération, l'expression des molécules CD4 et CD8 et l'initiation du réarrangement des gènes du TCR $\alpha$ . Sans pré-TCR fonctionnel, la cellule meurt.

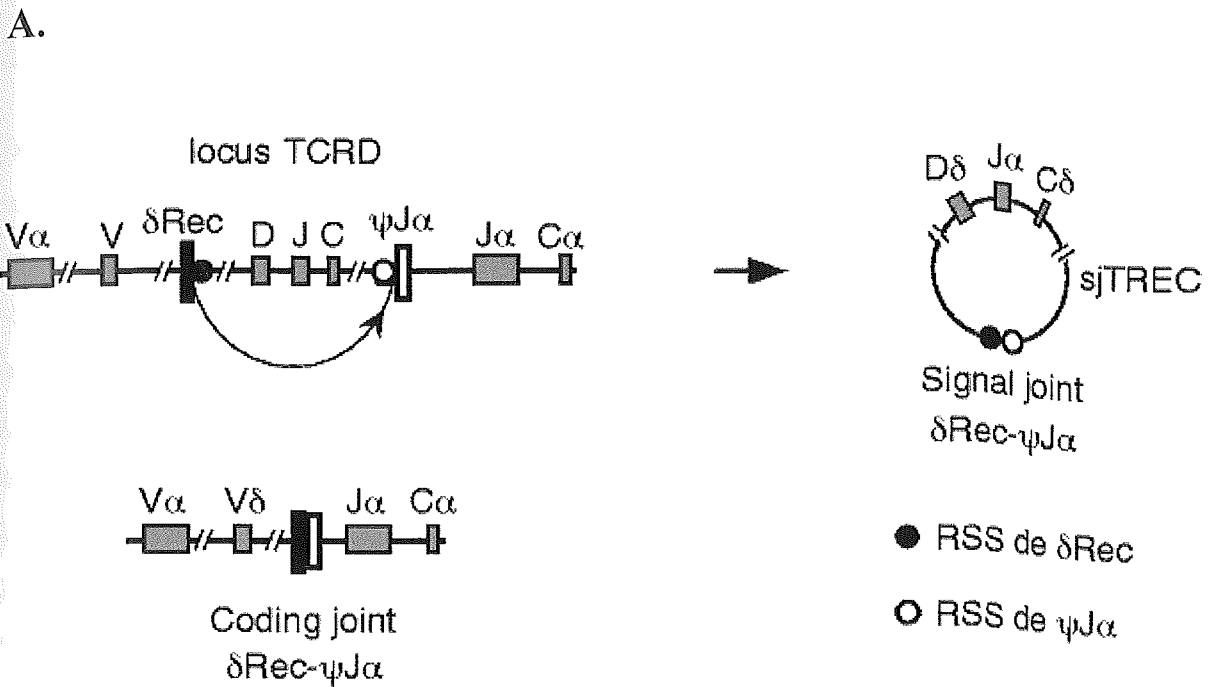
## 2.2 ANALYSE DE LA FONCTION THYMIQUE A L'AIDE DES CERCLES D'EXCISION GENERES LORS DU REARRANGEMENT DU RECEPTEUR AUX CELLULES T (TCR REARRANGMENT EXCISION CIRCLES OU TRECS)

L'analyse de la fonction thymique est rendue difficile par l'absence de marqueur spécifique des cellules récemment produites par le thymus (RTE ou *Recent thymic emigrants*). En effet, celles-ci ne se distinguent pas des autres cellules T naïves (n'ayant encore jamais rencontré d'antigène) périphériques. Par le passé, les RTE étaient assimilées aux cellules T naïves, car il était supposé que ces dernières ne se divisaient pas en périphérie. Or ceci s'est révélé faux (37). Le taux de cellules naïves, c'est-à-dire portant les marqueurs de surface CD45RA et CD62L, a été utilisé comme marqueur de la production thymique (38). Cependant, les cellules naïves étant capables de se diviser sans perdre leur phénotype de cellules naïves (39), il est impossible de distinguer la population de cellules naïves produite par le thymus de celles provenant d'une division périphérique.

La quantité de tissu thymique visible à un examen tomодensitométrique (CT-Scan) a aussi été utilisée comme mesure de l'activité thymique. Mais, les résultats obtenus variaient suivant les médecins qui examinaient les clichés, et n'étaient pas corrélés de façon statistiquement significative avec les données cliniques (40). Il est, en effet, impossible d'estimer la fonction effective d'un tissu thymique visible au CT-Scan, uniquement d'après sa taille.

Pour dépasser ces difficultés, des études récentes ont entrepris de mesurer, dans les lymphocytes T, la concentration de produits formés uniquement durant leur maturation dans le thymus. En effet, lors du réarrangement des gènes du TCR, est formé un produit d'excision appelé cercle d'excision généré lors du réarrangement du récepteur aux cellules T ou TREC (*TCR Rearrangement Excision Circle*). Il s'agit du fragment d'ADN excisé entre les segments V, D ou J. Ce sont des fragments d'ADN circulaires donc d'une grande stabilité. Ils ne contiennent pas d'origine de réplication et ne sont donc pas amplifiés durant la mitose. De ce fait, pour pouvoir quantifier les RTE dans un échantillon, il suffirait de déterminer le contenu en TRECs de cet échantillon, par la méthode de la réaction de polymérase en chaîne (*polymerase chain reaction* ou PCR). (Figure 5). Cependant, la maturation des cellules T dans le thymus est dépendante de plusieurs cycles de réarrangement des gènes du TCR, ceux-ci étant entrecoupés par des cycles de divisions cellulaires. De ce fait, tous les TRECs générés lors de la maturation des cellules T ne sont pas utilisables pour mesurer l'activité thymique.

Un seul événement de réarrangement est commun à toutes les cellules T  $\alpha\beta$  sortant du thymus et après lequel peu ou moins de division cellulaire est observé : c'est la délétion du locus  $\delta$ , qui génère un TREC mesurable et dont le niveau peut être indicatif de la fonction thymique. La mesure du contenu en TRECs représente donc une méthode plus précise et fiable permettant d'analyser l'état de la fonction thymique.



B.

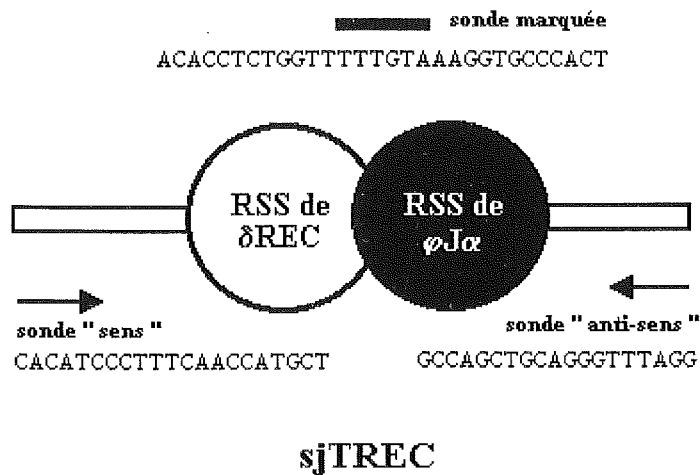
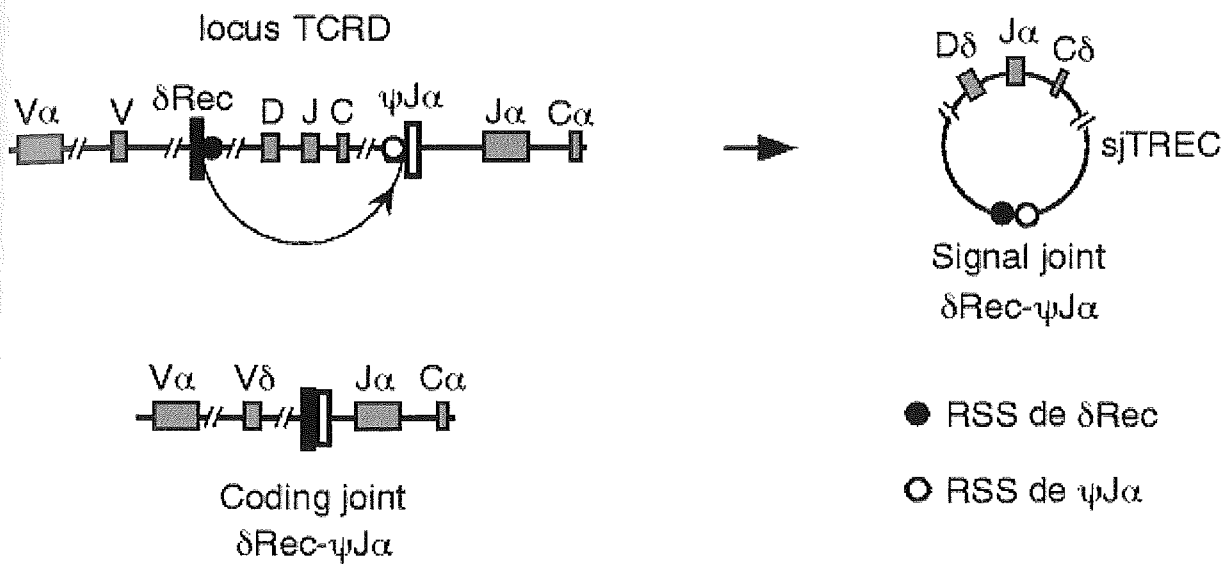


Figure 5. Adapté de (10)

- Mécanisme de recombinaison des gènes du TCR et formation des TRECs. Chacun des exons V, D, J ou C est entouré de deux séquences de signal de recombinaison ou RSS (*recombination signal sequences*). La boucle formée suite à la liaison de deux RSS sera clivée par l'action d'enzymes. La liaison des brins d'ADN de part et d'autre de la boucle excisée formera le *coding joint*, source supplémentaire de variabilité pour les TCR, alors que le brin circulaire constituera un TREC contenant les deux régions RSS ou *signal joint* (41).
- Détection des TRECs par réaction de polymérase en chaîne. Les séquences représentent les sondes utilisées dans notre manipulation.

A.



B.

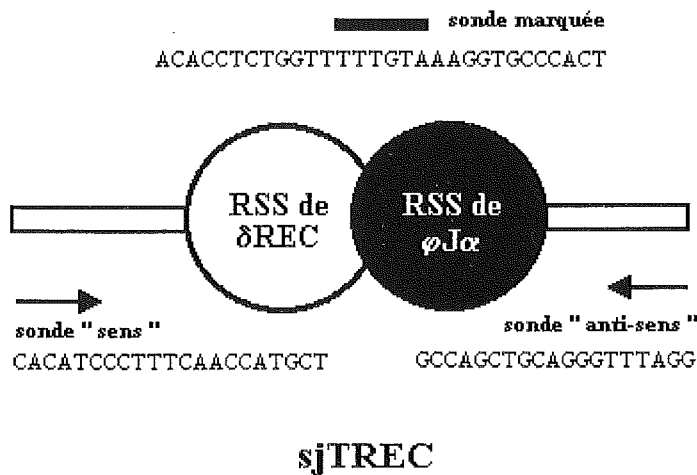


Figure 5. Adapté de (10)

- Mécanisme de recombinaison des gènes du TCR et formation des TRECs. Chacun des exons V, D, J ou C est entouré de deux séquences de signal de recombinaison ou RSS (*recombination signal sequences*). La boucle formée suite à la liaison de deux RSS sera clivée par l'action d'enzymes. La liaison des brins d'ADN de part et d'autre de la boucle excisée formera le *coding joint*, source supplémentaire de variabilité pour les TCR, alors que le brin circulaire constituera un TREC contenant les deux régions RSS ou *signal joint* (41).
- Détection des TRECs par réaction de polymérase en chaîne. Les séquences représentent les sondes utilisées dans notre manipulation.

### 2.3 THYMUS ET VIH-1 : REVUE DES ETUDES

Des autopsies thymiques, aux différents stades de la phase chronique de l'infection à VIH-1, montrent, au stade précoce, une inflammation du thymus évoluant, dans les stades plus tardifs, en une atrophie du tissu épithélial thymique, similaire à l'atrophie physiologique due au vieillissement, mais fortement exagérée par rapport à l'âge du sujet (42). Ces altérations anatomiques pourraient être responsables d'une dysfonction de la production thymique.

La mesure du contenu en TRECs semble offrir une mesure plus adéquate de la fonction thymique. Toutefois, le contenu en TRECs ne constitue pas une mesure directe de celle-ci : les TRECs sont présents dans les cellules produites par le thymus, donc une augmentation de la production thymique augmenterait le contenu en TRECs des lymphocytes périphériques.

Cependant, le contenu en TRECs est influencé par les paramètres suivants, indépendants de la fonction thymique :

- *Taux de division cellulaire périphérique* (les cellules naïves peuvent se diviser sans perdre leur phénotype de cellule naïve, donc, même pour une population purifiée de cellules naïves, une baisse du contenu en TRECs peut refléter une augmentation de la division cellulaire)
- *Taux de mort cellulaire* (par exemple, si les cellules qui meurent ont un plus faible contenu en TRECs car elle ont subi plus de divisions, une mort cellulaire accélérée augmenterait le contenu en TRECs des prélèvements)
- *Durée de vie des cellules naïves* (des TRECs restent détectables des années suivant une thymectomie)

En 1998, Douek et al. publièrent une étude (43) analysant la variation du contenu en TRECs chez des individus HIV-1-positifs et négatifs et arrivèrent aux conclusions suivantes :

- le contenu en TRECs décline avec l'âge, ce qui reflète l'involution physiologique du thymus. Toutefois, une activité de production thymique résiduelle persiste même à un âge avancé ;
- suite à une thymectomie, le contenu en TRECs demeure inférieur à celui des sujets non-thymectomisés, pour tous les âges ;

- lors d'une infection à VIH-1, il y a diminution du contenu en TRECs, par rapport aux sujets contrôles, dans les lymphocytes T CD4 et CD8, dans le sang périphérique et les ganglions lymphatiques. Ce phénomène serait dû à une diminution de la production thymique ;
- suite à une thérapie anti-rétrovirale efficace, le contenu en TRECs augmente, ce qui reflète une reprise de la production thymique.

En 2001 (10), en plus de mesurer le contenu en TRECs, les mêmes chercheurs démontrèrent qu'il n'y pas d'augmentation significative de la prolifération périphérique des lymphocytes naïfs chez les sujets VIH-1-positifs. Ceci leur permit d'affirmer que la diminution du contenu en TRECs observée n'était pas due à une dilution suite à une division augmentée des cellules naïves. Pour cela, ils analysèrent la présence du marqueur Ki67 dans les populations de cellules naïves et mémoires, chez les sujets VIH-1-positifs et VIH-1-négatifs. Pour les cellules naïves, la quantité du marqueur reste inchangée. La forte augmentation de l'expression du Ki67 dans les cellules mémoires serait sans conséquence. A noter que le passage des cellules naïves à l'état mémoire n'avait pas été investigué et que le nombre de sujets VIH-1-positifs étudiés est bas ( $n = 22$ ).

Un autre phénomène observé par les mêmes chercheurs fut l'augmentation du contenu en TRECs à la suite d'un traitement anti-rétroviral. On assiste à une normalisation du contenu en TRECs (43, 44), qui indiquerait la reprise de la production thymique. Ce phénomène est encore plus spectaculaire chez les enfants : l'infection diminue fortement leur production thymique, mais, suite à une thérapie efficace, celle-ci récupère entièrement (45, 46). En effet, leur thymus étant fonctionnel, il peut limiter la déplétion des cellules T CD4, plus efficacement que chez les adultes.

Ces études posent les bases de l'analyse de la fonction thymique par la mesure du contenu en TRECs et exposent également les différents biais d'interprétation. Toutefois, le nombre de sujets pris en compte est bas et aucune mesure parallèle de l'état d'activation et du taux de division cellulaire, chez les sujets VIH-1-positifs, n'avait été effectuée. En effet, le taux de division des cellules naïves n'est pas nécessairement insignifiant, comme supposé par les auteurs, il peut être augmenté, notamment chez les patients VIH-1-positifs lymphopéniques, sous l'effet des stimuli de prolifération homéostatique par exemple (37). L'augmentation de la

prolifération des cellules naïves pourrait être tenue pour responsable de la diminution du nombre de TRECs observée. Ceci a été soulevé notamment par les publications de Hatzenberg et al. (41, 47), exposées plus loin.

Par la suite, d'autres travaux mesurèrent le contenu en TRECs dans la population de cellules mononuclées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells* ou PBMC (cellules T, cellules B, macrophages, NK)), pourtant, l'importante augmentation du taux de division des cellules T CD8, durant l'infection à VIH-1, peut provoquer une diminution du contenu en TRECs n'ayant pas de rapport avec une variation de la fonction thymique. Une de ces études (48) assimile la diminution du contenu en TRECs observée à un rôle des RTE dans la pathogenèse de l'infection à VIH-1. L'autre (49) conclut que la perturbation de la production thymique ne peut, à elle seule, expliquer la perte des lymphocytes CD4, considérant le nombre élevé de patients ayant un contenu en TRECs normal.

L'étude de Steffens et al. de 2001 (50) part sur une hypothèse de recherche différente : étant donné que les TRECs sont dilués par effet de l'hyper-activation cellulaire lors d'une infection à VIH-1 non-contrôlée, il y a obligation de mesurer les TRECs sous traitement anti-rétroviral, dans un contexte de suppression virale maximale ! Ils arrivèrent à conclusion que la production thymique n'était pas affectée chez les patients VIH-1-positifs, leur contenu en TRECs ne variant pas, par rapport aux sujets VIH-1-négatifs. Il ne faudrait toutefois pas oublier que la présence d'une HAART ne se contente pas d'annuler les effets d'une hyper-activation sur la dilution des TRECs, mais elle annule également l'effet d'une perturbation potentielle de la fonction thymique par la répllication virale.

Les résultats de Douek et al. furent également contestés par les études de Hatzenberg et al. (41, 47), qui conçurent un modèle mathématique démontrant que le thymus ne pouvait pas être l'unique responsable de la différence du contenu en TRECs observé suite à une HAART (41) et qu'une diminution de la prolifération périphérique, due à une régularisation de l'hyper-activation immune jouait un rôle important. Une preuve supplémentaire de l'importance de l'hyper-activation était donnée par le fait que le contenu en TRECs des sujets éthiopiens VIH-1-négatifs, dont le système immunitaire était constamment stimulé, était encore plus bas que celui des sujets danois VIH-1-positifs (41).



Les auteurs de ces études font une synthèse des différents biais dans l'interprétation des résultats d'une analyse du contenu en TRECS : en effet, considérant la durée de vie des cellules naïves, les TRECs détectables chez les personnes âgées pourraient provenir des cellules naïves produites des années plus tôt. Il a été démontré que la durée de vie des cellules naïves pouvait atteindre 10000 jours (47) et que, suite à une thymectomie, les TRECs restaient détectables dans le sang périphérique entre 3 à 39 ans (41). En effet, lorsque la production thymique est accélérée, le renouvellement des cellules T naïves en périphérie est élevé, afin de maintenir l'homéostasie. Avec la diminution de la production thymique avec l'âge, la durée de vie des cellules périphériques augmente, pour conserver une réserve de cellules naïves. Ceci expliquerait la présence de taux détectables de TRECs dans les cellules périphériques des années suivant une thymectomie (41).

Les taux de TRECs supérieurs à la norme observés suite à une transplantation de cellules souches ont été attribués à l'arrivée de cellules nouvellement produites par le thymus dans un pool pratiquement vide de cellules naïves. Lorsque les cellules commencent à se diviser, les TRECs sont dilués et leur taux retombe. En effet, le nombre de cellules naïves était, dans ce cas, inversement proportionnel au contenu en TRECs (47). Quant à l'augmentation des TRECs suite à une HAART, elle peut provenir de la diminution de l'hyper-activation et de la prolifération des cellules T, suite au contrôle de l'infection, qui régulariserait le nombre de cellules naïves, plutôt que d'une augmentation de la production thymique.

En conclusion, la production thymique de cellules T, dans le contexte d'une infection à VIH-1, a été largement investiguée sans pour autant donner une idée claire quant à l'état de la fonction thymique dans cette situation pathologique. En effet, le nombre de sujets analysés est bas, les populations cellulaires CD4 et CD8 ne sont pas toujours analysées séparément et le stade clinique de l'infection n'a jamais été pris en compte. Donc, il n'existe pas, à ce jour, d'étude statistiquement adaptée à l'étude de la fonction thymique par la mesure du contenu en TRECs.

### 3 ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES REGULATEURS DU CYCLE CELLULAIRE, DANS LE CADRE D'UNE INFECTION A VIH-1, PAR LA METHODE DES BIOPUCES D'ADN COMPLEMENTAIRE (ADNC)

#### 3.1 PROLIFERATION CELLULAIRE DANS LE CADRE D'UNE INFECTION A VIH-1

La capacité de prolifération des cellules T, lors de l'infection à VIH-1, demeure controversée. Certaines études défendent l'hypothèse que l'hyper-activation présente entraînerait un haut niveau de renouvellement cellulaire (9), et d'autres soutiennent qu'au contraire, elle perturberait la capacité de division des lymphocytes T (29, 30).

Selon la première hypothèse, la réplication virale dans les ganglions induirait un renouvellement rapide des cellules T CD4 (9, 51). Cette hypothèse a été corroborée par des mesures du niveau d'incorporation des nucléotides marqués (analogue de la thymidine : BrdU, par exemple), lors de la phase S du cycle cellulaire ou par la détection, par cytométrie de flux (Fluorescence activated cell sorter ou FACS), du marqueur Ki67, un antigène nucléaire, spécifique des cellules ayant entamé un cycle de division, (52, 53).

La théorie adverse soutient, au contraire, que l'infection à VIH-1 perturberait la progression du cycle cellulaire et donc la capacité de prolifération des lymphocytes T CD4 (29, 30). L'une de ces études observe que, dans le cadre d'une infection à VIH-1, les cellules mémoires positives pour le marqueur Ki67 se trouvent pour la grande majorité en phase G<sub>1</sub>, la phase précoce du cycle cellulaire, et semblent bloquées à ce stade (29). Une autre étude met en évidence un défaut de production des protéines associées au cycle cellulaire (cyclines D et A, par exemple), dans les lymphocytes T, dans le cadre de l'infection à VIH-1, et ceci, alors que l'expression des marqueurs d'activation précoces, comme CD69 et CD25, est conservée (30).

Les résultats contradictoires obtenus lors de la mesure de la capacité de prolifération des lymphocytes T périphérique semblent provenir en premier lieu de la diversité de méthodes employées qui mesurent des paramètres de division distincts (54). En effet, la mesure du marqueur Ki67 offre une vision statique de la capacité de division d'un échantillon de cellules

et ne tient donc pas compte du fait que la rapidité de division cellulaire varie suivant le stimulus (la stimulation homéostatique résultant en une division lente alors que la stimulation antigénique induit des cycles rapides de division). Le taux de division d'un échantillon dont les cellules se divisent de façon lente sera donc surestimé. De plus les cellules positives pour le marqueur Ki67 peuvent être bloquées dans l'une des phases du cycle et ne pas proliférer efficacement. Les mesures dynamiques de la capacité de division cellulaire comme l'incorporation de BrdU ou de glucose marqué sont plus précises, mais sont très difficiles à interpréter.

En conclusion, de nombreuses théories ont été avancées au sujet de la prolifération périphérique des lymphocytes T dans le cadre d'une infection VIH-1, pourtant, aucune d'entre elles n'offre une explication satisfaisante des perturbations observées.

### 3.2 CYCLE CELLULAIRE <sup>(55-57)</sup>

Le cycle cellulaire désigne les différentes étapes nécessaires à la réalisation d'une division cellulaire. La régulation du cycle cellulaire est essentielle pour la fonction du système immunitaire, car les cellules doivent être capables de proliférer suite à l'activation par l'antigène (prolifération antigène-spécifique) ou par différents signaux de prolifération homéostatiques et de retourner à l'état quiescent à la disparition de ces stimuli.

On distingue quatre phases principales du cycle cellulaire : a) la phase  $G_1$  de préparation à la synthèse d'ADN, b) la phase  $S$  de synthèse d'ADN, c) la phase  $G_2$  de préparation à la division, d) la phase  $M$  de mitose. Par extension, lorsque les cellules sont en phase quiescente, elles sont dites en phase  $G_0$ .

Les points critiques de la régulation de la division cellulaire sont l'initiation d'un nouveau cycle, c'est-à-dire la sortie de la phase  $G_0$ , et la transition  $G_1/S$ , appelée également point de restriction. En effet, une fois ce point passé, la division se poursuit en principe jusqu'à la fin. Il existe, tout au long des différentes étapes du cycle cellulaire, plusieurs points de contrôle appelés *checkpoints*, permettant de s'assurer de la bonne poursuite des processus moléculaires. En cas de problème, un arrêt du cycle ou la mort cellulaire sont déclenchés.

Au niveau moléculaire, plusieurs facteurs sont impliqués :

- *Les facteurs de croissance* : ils peuvent agir par voie endocrine, paracrine ou autocrine. Ils initient le cycle de division grâce à une cascade de signalisation aboutissant à la formation de facteurs de transcription qui vont favoriser l'expression des proto-oncogènes.
- *Inhibiteurs de la croissance* : les cascades enzymatiques déclenchées auront pour but de ralentir ou stopper la croissance.
- *Les cyclines* : protéines régulatrices du cycle cellulaire, dont la concentration cytoplasmique varie suivant les phases du cycle dans la majorité des cas, et qui forment des complexes avec des kinases qu'elles activent (*kinases dépendantes des cyclines* ou (cdk)). Différentes combinaisons de cyclines et cdk sont associées avec chaque transition importante du cycle cellulaire. Elles phosphorylent des protéines directement impliquées dans les réactions biochimiques du cycle, ce qui va les inhiber ou les activer suivant le cas. Les cdk ont également des sous-unités inhibitrices, les *CDKI* (p16 (pour cdk4) et p21 (pour cdk1 et 2) par exemple).
- *Les proto-oncogènes* : ont un rôle pro-mitotique. Il s'agit souvent de facteurs de transcription d'éléments nécessaires à l'accomplissement de la division, c'est le cas pour E2F, par exemple.
- *Les gènes suppresseurs de tumeurs* : font partie des mécanismes de surveillance qui vérifient que toutes les transitions du cycle se passent dans le bon ordre et que les fonctions majeures soient effectuées sans erreur. En cas de dommage à l'ADN, par exemple, ces gènes vont chercher à stopper le cycle cellulaire (en augmentant l'expression des *CDKI* par exemple), pour permettre la réparation, ou en initiant l'apoptose si les défauts sont trop importants (gène p53 entre autres).

Le cycle cellulaire est donc un complexe réseau de partenaires moléculaires qui stimulent ou inhibent la prolifération suivant les signaux reçus.

En bref, (Figure 6) on peut assimiler le couple cycline D/cdk4 au système de régulation principal du cycle cellulaire. En effet, dans les cellules quiescentes, le taux de la protéine cycline D est bas, puis, en réponse à la stimulation par des facteurs de croissance, ce taux augmente et cdk4 est activée. C'est la sortie de  $G_0$ . Le taux de cycline D reste élevé tant que le signal d'activation persiste. Le couple cycline D / cdk4 pourra phosphoryler la protéine du rétinoblastome (RB), ce qui va l'inactiver et l'empêcher d'inhiber E2F, famille de facteurs de

transcription des protéines nécessaires à la phase S. La cellule, ayant ainsi intégré le signal externe d'activation, doit déterminer si elle prête à se diviser. Le taux de cycline E augmente progressivement le long de la phase G<sub>1</sub>. Lorsque le taux de cycline E atteint son seuil, cdk2 est activée. Sa cible est également la protéine RB. Le point de restriction en G<sub>1</sub> est passé, la transition G<sub>1</sub>/S est achevée et le taux de cycline E diminue. Elle est remplacée par les cyclines A et B qui vont activer les CDK des phases plus tardives du cycle.

Un autre acteur clé de la régulation du cycle cellulaire est p53, un gène suppresseur de tumeurs qui bloque la progression du cycle. p53 est exprimé en cas d'erreurs dans la réplication de l'ADN ou de stress cellulaire, sous la forme d'un manque d'oxygène par exemple, et induit un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. L'activité de p53 est régulée par un de ses gènes cibles : mdm2. Lorsqu'il est activé, p53 est phosphorylé au niveau de son domaine de transactivation, ce qui empêche mdm2 de s'y fixer. Ce dernier va s'accumuler, car son expression est régulé par p53. p53 est déphosphorylé lorsque le signal qui l'a activé diminue et mdm2 peut s'y fixer et inhiber son activité de facteur de transcription. De plus, mdm2 va précipiter la dégradation de p53. Il existe donc un équilibre constant entre les quantités de ces deux protéines.

Une autre cascade de régulation importante du cycle cellulaire ainsi que de la différenciation et survie cellulaire est constituée d'une famille de kinases sérine/thréonine, appelées protéine-kinases activées par les mitogènes (MAPK ou *mitogen-activated protein kinases*) (58). Elle comprend le sous-groupe des kinases extracellulaires relatives à la transmission du signal (ERK ou *extracellular signal-related kinases*), la MAPK p38 et la kinase N-terminale de c-jun (un facteur de transcription) (JNK ou *c-jun N-terminal kinase*).

ERK est associée à la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose. Son activation par MEKK1 (MAPKKinase1) induit l'entrée en phase S, la diminution de l'expression de p27 (une CDKI) et l'augmentation de l'expression de la cycline D1. ERK induit également b-raf, avec pour effet l'inhibition des caspases, enzymes impliquées dans l'apoptose. D'autre part, la phosphorylation, par ERK, de Bad, un facteur proapoptotique, résulte en sa séquestration dans le cytosol, loin de son lieu d'activation, la mitochondrie (59).

La protéine kinase B est également impliquée dans la survie cellulaire. Elle agit également en phosphorylant Bad, mais aussi par l'intermédiaire d'autres facteurs, comme raf-1 (59).

La MAPK p38, par contre, provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G<sub>1</sub>/S, en diminuant l'expression de la cycline D1, par l'intermédiaire du facteur de transcription GADD153. Ses activateurs principaux sont MEKK3 et MEKK6 (60).

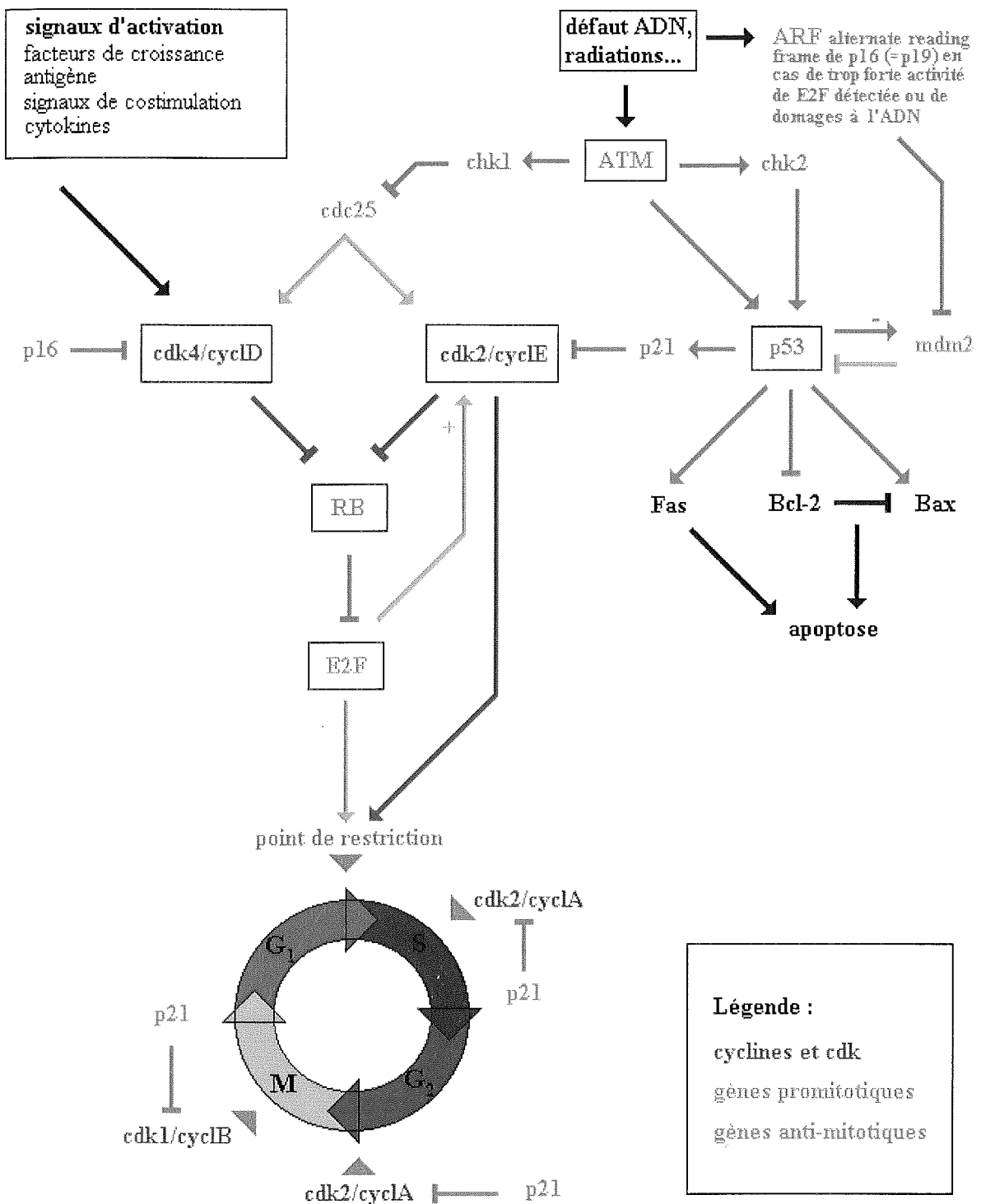


Figure 6. Cascades enzymatiques principales de régulation du cycle cellulaire.

### 3.3 ANALYSE DES MOTIFS D'EXPRESSION GENETIQUE PAR BIOPUCES D'ADN COMPLEMENTAIRE

Il existe actuellement plusieurs méthodes pour quantifier l'expression des gènes au niveau de l'ARN messager (ARNm) : le *Northern blot* (61), la protection de nucléase de phase S1 (62), le *differential display* (63) et l'analyse en série de l'expression des gènes (*Serial analysis of gene expression* ou SAGE) (64). Toutefois, à l'exception du *differential display* et du SAGE, ces techniques se limitent à l'étude du profil d'expression d'un faible nombre de gènes à la fois. D'autre part, le *differential display* et le SAGE ne se prêtent pas, pour des raisons pratiques, à une étude de l'expression à large échelle.

La vaste entreprise de séquençage du génome humain a donné accès à sa séquence complète. Il a donc été possible de développer des techniques nouvelles, permettant l'étude de l'expression génétique à plus large échelle. Le but a été atteint grâce aux biopuces d'ADNc qui permettent l'analyse de l'expression de plusieurs milliers de gènes en parallèle à partir d'ARNm ou d'ARN total (65-67).

Ils se composent de fragments d'ADN simple brin correspondant aux gènes à analyser, placés sur un support solide suivant une disposition connue. Suivant la technique de détection (fluorescence, radioactivité ou enzymatique), le support solide peut être une lame de microscope, un support plastique ou une membrane en nylon. L'ARN extrait de l'échantillon est soumis à une réaction de transcription inverse en présence de nucléotides marqués (par la fluorescence, radioactivement ou biotynilés). On obtient ainsi des sondes d'ADNc marquées qui pourront s'hybrider de manière spécifique avec les séquences présentes sur la membrane. L'intensité de signal pour chaque coordonnée de la membrane est mesurée. Elle est proportionnelle au niveau d'expression du gène correspondant.

Pour pouvoir comparer les valeurs des différents échantillons, une normalisation mathématique des données est effectuée pour chaque échantillon. En effet, les différentes variables expérimentales (quantité d'ARN pour chaque échantillon, rendement de la transcription inverse et de l'hybridation, bruit de fond, etc), font qu'un même échantillon peut générer, pour un même gène, des intensités de signaux différentes d'une hybridation à l'autre. Une constante, considérée invariante au cours des expériences, est choisie comme référence et



toutes les autres mesures sont ajustées par rapport à elle. Il existe plusieurs méthodes de normalisation, la référence prise en compte pouvant être la valeur moyenne, la somme ou le percentile 50 des mesures d'une membrane. Une autre technique consiste à corriger les mesures de chaque membrane par rapport aux signaux obtenus pour des gènes considérés invariants dans leur expression, comme celui de la  $\beta$ -actine ou de la phospholipase A2.

Une fois les valeurs normalisées, on détermine le facteur d'amplification ou d'inhibition de l'expression des gènes dans les situations analysées, les unes par rapport aux autres. Il s'agira, par exemple, de la comparaison entre le profil d'expression au repos et celui lors d'une stimulation ou infection (Figure 7). Un code de couleur est attribué pour les différents niveaux d'amplification ou d'inhibition de l'expression des gènes.

L'étude des motifs d'expression à large échelle permet de mieux comprendre les interactions des gènes entre eux et donc la régulation de l'expression génétique (68-72). Il est par exemple possible d'analyser en détail différentes cascades de signalisation cellulaire (73) ou les processus de division cellulaire et différenciation (72-76).

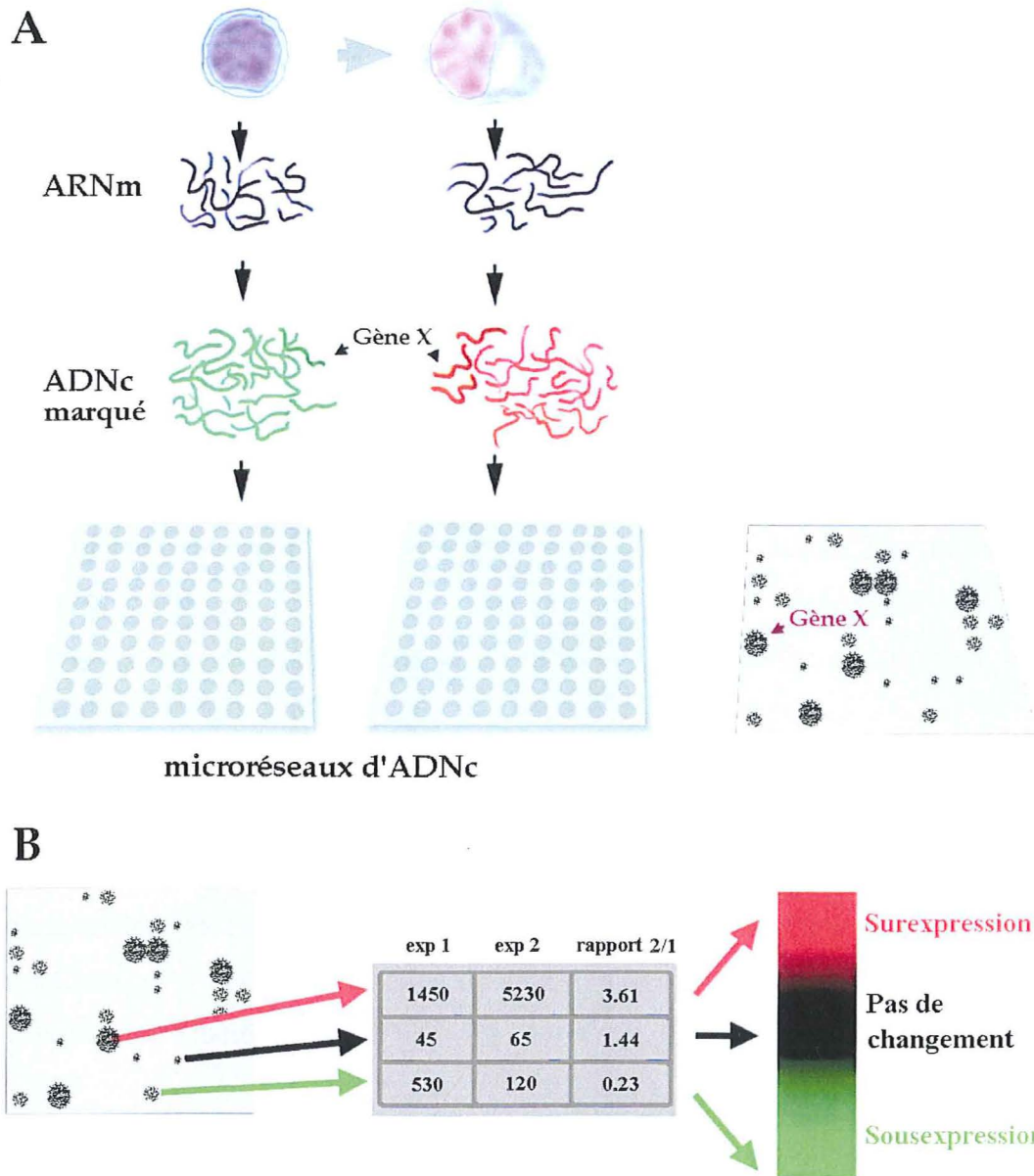
Les biopuces d'ADNc permettent également de mieux caractériser différents processus pathologiques, notamment les processus néoplasiques, les maladies auto-immunes, et certaines maladies héréditaires à transmission peu connue, surtout dans le cas de pathologies à locus multiple (65). Enfin, la comparaison des niveaux d'expression génétique peut servir à évaluer les effets des médicaments en clinique, à découvrir des cibles potentielles pour de nouveaux traitements (77, 78) et à comprendre les mécanismes d'action et les effets secondaires des substances (79).

### **3.4 POSSIBILITES D'UTILISATION DES BIOPUCES D'ADNc**

#### **3.4.1 Analyse fonctionnelle de l'expression des gènes**

Pendant longtemps, la détermination de la fonction des gènes passait par l'étude de la séquence en acides aminés des protéines connues. Il s'agissait ensuite de retrouver les gènes codant pour ces protéines à l'aide de sondes radioactives synthétiques.

A présent, les techniques de séquençage des gènes permettent d'estimer la fonction d'un gène sans passer par la protéine, par exemple, en recherchant des séquences particulières présentes sur des gènes connus et codant pour des régions spécifiques, comme les domaines de



**Figure 7. A.** (Adapté de 92) Vue générale de la manipulation, montrant l'hybridation sur membrane d'un échantillon au repos (à gauche) et d'un échantillon représentant un état activé (à droite) ainsi qu'une image possible obtenue après analyse de la membrane par le Phosphorimager (dans le cas du marquage par la radioactivité). Le gène X est donné comme exemple.

**B.** Analyse des résultats : pour chaque membrane, représentant une condition expérimentale particulière, l'intensité de radiation en coups par minute (CPM) est mesurée pour chaque coordonnée. Après normalisation, un rapport est calculé entre les mesures obtenues pour l'échantillon à l'état activé (exp 2) et au repos (exp 1), et un code de couleur est attribué au résultat obtenu.

transactivation des facteurs de transcription ou les parties trans-membranaires des récepteurs. En plus de cette possibilité, grâce aux biopuces, nous disposons d'une approche rapide et systématique pour déterminer la fonction de gènes inconnus uniquement à l'aide de leur motif d'expression. En effet, il existe une correspondance logique entre la fonction d'une protéine et le moment de sa production (transcription puis traduction). L'explication est surtout intuitive. Un ARNm ne sera pas produit dans un contexte où il ne servirait à rien. Le mécanisme de sélection naturelle cherche à optimiser l'efficacité des processus biologiques et à augmenter les capacités d'adaptation de l'organisme à différentes conditions. Il faut permettre aux protéines d'exercer leur fonction de façon optimale, en limitant les pertes et en régulant le lieu, la quantité et le moment de transcription avec précision. De ce fait, les gènes exerçant une fonction au cours du même processus biologique auront des profils d'expression semblables. Il est possible, par exemple, de retrouver des gènes liés aux maladies inflammatoires, en fonction de la modification des profils d'expression lors d'un état inflammatoire (80).

En conclusion, l'étude de l'expression génétique à large échelle permet d'estimer la fonction d'un gène en l'associant à celle des gènes de motif d'expression semblable (81). C'est la méthode du « coupable par association ». L'une des options consisterait à établir un profil d'expression global pour chaque gène, une sorte d'empreinte digitale dans différentes situations, et d'estimer la fonction de gènes inconnus en se servant de banques de données d'expression génétique (82, 83).

### 3.4.2 Applications des biopuces d'ADNc en oncologie

Plusieurs études cherchent à mettre en place un système de classification des tumeurs basé sur leur profil d'expression. La recherche dans le contexte du cancer du sein a permis de mettre en évidence trois nouvelles sous-classes de lésions, liées à certains pronostics cliniques (84). La classification habituelle différenciait quatre groupes, parmi lesquels : a) le *basal-epithelial like group (BEL)*, b) le *ERBB2-overexpressing group (ERB)*, c) le *normal breast-like group (NBL)* et d) le *luminal epithelial / estrogen receptor-positive group (LE/ER)*. L'analyse des profils d'expression a permis de diviser le groupe LE/ER en trois sous-groupes A, B et C, chacun caractérisé par un profil d'expression particulier. Le sous-groupe A montre

une forte expression de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur à l'œstrogène, de la *GATA binding protein*, de la *X-box binding protein* et des autres gènes des cellules luminales. Les sous-groupes B et C avaient une expression faible à modéré des gènes spécifiques des cellules luminales, y compris le groupe du récepteur à l'œstrogène. Enfin, le sous-groupe C présentait une expression forte d'un groupe de gènes de fonction inconnue, présents également dans les groupes BEL et ERB mais pas dans les sous-groupes A et B. La séparation en sous-groupes A, B, C est corrélée avec le pronostic clinique des patientes, B et C ayant un pronostic pessimiste au niveau de la fréquence des récurrences, alors que le sous-groupe C est associé au moins bon pronostic vital, ce qui corrèle très bien avec les similitudes rencontrées avec les groupes BEL et ERB, qui ont le moins bon pronostic de toutes les tumeurs mammaires.

On peut envisager l'utilisation de cette technique pour établir des pronostics d'après les profils des tumeurs répertoriées cliniquement (85), diagnostiquer précocement des cancers cliniquement asymptomatiques (85, 86), évaluer l'efficacité des traitements (86) et étudier la pathogenèse des lésions néoplasiques (87-89).

### **3.4.3 Applications des biopuces d'ADNc en immunologie**

Plusieurs études ont cherché à comprendre les processus biologiques (90-92) ou les mécanismes de différenciation cellulaire, dans le cas des plasmocytes par exemple (93, 94), qui sont nécessaires à une réponse immunitaire efficace. La pathogenèse des maladies auto-immunes et lymphoprolifératives prend également une place importante (87-89).

Le rôle du calcium dans la signalisation cellulaire lors d'une stimulation antigénique a ainsi pu être étudié, en comparant les profils d'expression, après stimulation, de cellules contrôles et de cellules provenant de patients atteints d'une déficience immunitaire grave combinée, due à un défaut de l'influx transmembranaire du calcium (95). Il en ressort que le calcium exerce une action au niveau de l'expression génétique lors de la réponse immunitaire et semble agir surtout par l'intermédiaire de la calcineurine (une phosphatase). Les gènes étudiés ont pu être classés d'après l'importance du rôle des signaux calciques dans leur activation.

#### 3.4.4 Applications des biopuces d'ADNc en virologie

Pour l'instant, peu de publications sur les biopuces d'ADNc traitent des perturbations de l'expression génétique dues aux infections virales (96, 97). Toutefois, cette technique pourrait être employée à l'analyse de l'expression des gènes viraux, de leur effet sur les cellules infectées ou des phénotypes viraux induits par différentes mutations pour mettre en évidence la fonction des protéines virales.

Pour le VIH-1, (98) les gènes différentiellement régulés, à deux ou trois jours post-infection, comprennent des gènes impliqués dans la signalisation cellulaire, le transport subcellulaire et la régulation de la transcription ainsi que des gènes de fonction encore inconnue. Une autre étude (99) utilisa les biopuces pour monitorer 6800 gènes simultanément, à deux et trois jours post-infection. Les observations montrèrent que la production globale d'ARNm cellulaire diminue en faveur de la transcription des gènes viraux, provoquant un stress génotoxique (suppression de l'expression de certains gènes mitochondriaux et de gènes de réparation de l'ADN) et une surexpression du gène proapoptotique Bax, avec activation des caspases 2, 3 et 9, activant l'apoptose. Il s'agit soit d'un mécanisme physiopathologique du VIH-1, soit d'un mécanisme de défense permettant l'élimination des cellules infectées.

**REMARQUE :** Il faut rester prudent dans l'utilisation des biopuces à des fins diagnostiques pour des maladies aiguës, car la variabilité naturelle du profil d'expression génétique en fonction de l'âge, du sexe, de l'activité sportive, du stress et de l'heure de la journée, n'est pas encore connue. Une étude globale sur un large nombre de donneurs serait nécessaire, ce qui est envisageable à long terme uniquement.

## **BUT DU PROJET**

Le but de cette étude est d'analyser, dans le cadre d'une infection à VIH-1, la capacité de production centrale et périphérique des lymphocytes T. Pour cela, la production centrale thymique de nouvelles cellules et la prolifération périphérique des lymphocytes T ont été mesurées conjointement.

La fonction thymique, dans le contexte d'une infection à VIH-1, a été étudiée par la mesure du contenu en TRECs des lymphocytes T CD4 et CD8 périphériques, pour un total de 298 sujets VIH-1 positifs, aux stades précoce, intermédiaire et tardif de la phase chronique de l'infection à VIH-1. En parallèle, une mesure de la prolifération cellulaire, représentée par l'expression du marqueur Ki67 a été effectuée.

Une analyse à plus large échelle de la capacité de prolifération cellulaire, dans le cadre d'une l'infection à VIH-1, a été obtenue grâce à la technique des biopuces d'ADNc, mesurant les perturbations induites par l'infection au niveau de l'expression de 111 gènes régulateurs du cycle cellulaire. Cette expérience permet d'investiguer une autre piste possiblement responsable de la déplétion des cellules T CD4, en plus d'un défaut éventuel de la production centrale : une perturbation de la capacité proliférative en périphérie.

En conclusion, les hypothèses de travail sont les suivantes :

- la déplétion des lymphocytes T CD4, dans le cadre de l'infection VIH-1, résulterait, entre autres, d'une perturbation de la production centrale thymique et de la prolifération périphérique de ces cellules.
- la production centrale et périphérique des lymphocytes T CD4 est régulée par des mécanismes homéostatiques, qui seraient maintenus en partie durant la phase aiguë de l'infection.

## METHODES

### 1 COHORTES ET ECHANTILLONNAGE

Les sujets infectés par le VIH-1, utilisés pour la mesure du contenu en TRECs des lymphocytes T périphériques CD4 et CD8, (n=298), sont âgés de 20 à 60 ans (moyenne: 36,8 ± 13,6) et font partie de la *Swiss HIV Cohort*. Au moment de la prise de sang, les patients étaient en phase chronique de l'infection et n'avaient reçu aucune thérapie anti-rétrovirale. Ils ont été sélectionnés selon le stade de la maladie, déterminé par leur compte CD4:

- *stade précoce* : compte CD4 supérieur à 500 cellules/ $\mu$ l : 118 sujets
- *stade intermédiaire* : compte CD4 entre 500 et 200 cellules/ $\mu$ l : 123 sujets
- *stade tardif* : compte CD4 inférieur à 200 cellules/ $\mu$ l : 57 sujets

Pour les patients de la *Swiss HIV Cohort*, nous disposons d'échantillons de cellules mononuclées du sang périphérique (*peripheral blood mononuclear cells* ou PBMC) congelées.

Les PBMC des sujets contrôles VIH-1-négatifs, âgés entre 20 et 59 ans (moyenne: 37,9 ± 11,4) : 120 sujets (60 hommes, 60 femmes), proviennent de filtres du Centre vaudois de transfusion sanguine.

Pour les biopuces, les sujets infectés par le VIH-1 (n=18) proviennent tous du département de Médecine 2 du CHUV. Ils sont tous dans la phase chronique de l'infection, dans un des trois stades, précoce, intermédiaire ou tardif, et n'avaient reçu aucun traitement anti-rétroviral au moment de la prise de sang.

Pour les sujets contrôles VIH-1-négatifs, (n=18), les PBMC proviennent de filtres du Centre vaudois de transfusion sanguine.

Le sang complet est dilué dans un volume de solution saline de phosphate (PBS ou *phosphate buffer salin*). Les filtres sont lavés par 100ml de PBS. Les PBMC sont séparées par une centrifugation de 20 minutes sans frein à une vitesse de 800g sur un disque de FicollPlaque. Elles sont récupérées dans 50ml de milieu RPMI 10% FBS (*fetal bovine serum*), lavées deux fois avec 20ml de RPMI par deux centrifugations de 10 minutes à 500g avec frein et resuspendues dans du PBS-2%FBS, à une concentration de  $5 \times 10^6$  cellules/ml, en vue de l'isolation des cellules CD4 et CD8.

## 2 ISOLATION PAR BILLES IMMUNOMAGNETIQUES DE LYMPHOCYTES T CD4 ET CD8

Pour les échantillons destinés à l'analyse du contenu en TRECs, les lymphocytes T CD4 et CD8 ont été purifiés à partir des PBMC totaux par *sélection positive* immunomagnétique, grâce à des billes couplées à des anti-corps spécifiques anti-CD4 ou anti-CD8. La pureté de la population cellulaire a été contrôlée par cytométrie de flux et s'élevait à au moins 90%. Pour les échantillons utilisés pour les biopuces, les lymphocytes T CD4 et CD8 sont également purifiés à partir des PBMC totaux, mais par *sélection négative*, après déplétion des cellules B, des monocytes, des macrophages, des cellules NK et des lymphocytes CD4 ou CD8, grâce à des billes magnétiques couplées à des anticorps spécifiques. Les échantillons retenus pour cette étude étaient constitués à au moins 85% de cellules de la population souhaitée. La quantité de billes nécessaire aux sélections positives et négatives suit la règle de quatre billes par cellule « positive ». Soit, par exemple, quatre fois plus de billes anti-CD4, qu'il n'y a de lymphocytes CD4, seront utilisées.

La pureté des sélections négatives et positives CD4 et CD8 est déterminée par cytométrie de flux, par un marquage de surface TriTEST (BD-Pharmingen) (anti-CD4 (FITC), anti-CD8 (PE) et anti-CD3 (PerCP) ). Pour cela, les cellules sont incubées avec les anticorps 30 minutes à 4°C, lavées avec 1ml de PBS-2%FBS et fixées avec du CellFix (BD Pharmingen). Les échantillons sont analysés par FACSCalibur et CellQuest (BD-Pharmingen).



## 2.1 SELECTION POSITIVE

Le kit d'isolation positive des cellules CD4 et CD8 de DYNAL (Compiègne, France) a été utilisé selon la notice du fabricant. Brièvement, les billes anti-CD4 ou anti-CD8 sont lavées trois fois dans du PBS-2%FBS, ajoutées aux cellules et le tout est incubé en rotation 30 minutes à 4°C. Après incubation, les billes sont lavées cinq fois dans du PBS-2%FBS sur le support aimanté DYNAL et resuspendues dans 100µl de RPMI-1%FBS. 10µl de Detachbeads sont ajoutés et le tout est incubé 45 minutes à température ambiante et secoué constamment. Les cellules sont récupérées dans le surnageant à l'aide du support aimanté DYNAL.

## 2.2 SELECTION NEGATIVE

Les billes anti-CD14, anti-CD19 et anti-CD4 ou anti-CD8 (DYNAL, France) sont lavées trois fois dans du PBS-2%FBS et ajoutées aux cellules. Le tout est incubé en rotation 45 minutes à 4°C. Les tubes sont placés sur le support aimanté DYNAL et le surnageant est récupéré par trois lavages avec 1ml de PBS-2%FBS. Les cellules sont lavées dans 10ml de PBS-2%FBS et incubées 30 minutes à 4°C avec 1µg d'anti-CD16 de souris anti-humain. Les cellules sont lavées dans 10ml de PBS-2%FBS. Les billes d'anticorps de chèvre anti-IgG de souris, précédemment lavées trois fois dans du PBS-2%FBS, sont ajoutées à une concentration de quatre billes au moins par cellule positive. Le tout est incubé 45 minutes en rotation à 4°C et le surnageant est récupéré comme décrit plus haut.

Les cellules sont comptées et séparées par groupes de  $0,25 \times 10^6$  cellules, centrifugées 10 minutes à 500g puis resuspendues dans 1ml de PBS pur. Le tout est centrifugé 10 minutes à 500g, le surnageant est aspiré et le culot congelé.

## 3 MESURE DU CONTENU EN TRECS

Le contenu en TRECs est déterminé par une réaction de polymérase en chaîne (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) dans un thermocycleur ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). Pour permettre l'extraction de l'ADN, les cellules décongelées sont incubés en présence de la

protéinase K (Roche), à une concentration de 100µg/ml, pour une heure à 56°C, puis à 95°C pendant 15 minutes.

La réaction de polymérase en chaîne, pour un volume total de 25 µl, contient 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200µM dNTPs (nucléotides), 0,5µM de la sonde sens (CACATCCCTTTCAACCATGCT), 0,5µM de la sonde anti-sens (GCCAGCTGCAGGGTTTAGG), 0,2 mM de la sonde spécifique marquée à la fluorescéine (ACACCTCTGGTTTTTGTAAAGGTGCCCACT), 0,625 U de la Platinum Taq ADN polymérase (Invitrogen) et 5µl de lysat cellulaire (correspond à 50000 cellules). La réaction comprend une incubation de 5 minutes à 95°C, suivie de 40 cycles d'amplification (30 secondes à 95°C, une minute à 60°C). L'intensité de fluorescence obtenue est analysée grâce à une courbe de référence, constituée de résultats obtenus pour des dilutions successives d'un plasmide contenant un fragment de 375 pb de la séquence du sjTREC.

#### 4 ANALYSE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE : EXPRESSION DU KI67

Les cellules sont marquées par les anti-corps de surface anti-CD4 (PE), anti-CD45RA (CyChr) et anti-CD8 (APC) (BD-Pharmingen) : elles sont incubées avec les anticorps 30 minutes à 4°C, avec 1ml de PBS-2%FBS et fixées avec du Cell-Fix (BD Pharmingen), par une incubation de 15 minutes à l'abri de la lumière. Après lavage, les cellules fixées sont perméabilisées avec une solution de saponine à 0.1% et 1% BSA et incubées avec l'anticorps anti-Ki67 (FITC) (Dako) 15 minutes à l'abris de la lumière. Les échantillons sont analysés par FACSCalibur et CellQuest (BD-Pharmingen).

## 5 STIMULATION *IN VITRO* ET MARQUAGE AU CFSE

La stimulation est effectuée dans une plaque de 24 puits remplis par 1ml de PBS avec 1µg/ml d'anti-CD3, 6 à 12 heures avant la stimulation. Les cellules sont lavées deux fois dans 10ml de PBS pur et resuspendues à une concentration de  $20 \times 10^6$  cellules/ml. Le marqueur 5,6-carboxyfluorescéine succidimyle ester (CFSE) est ajouté aux cellules, à une concentration de 2µM, suivi de 8 minutes d'incubation en rotation à l'abri de la lumière. Un volume de FBS est ajouté à cette solution, le tout est incubé 5 minutes à 37°C, et complété jusqu'à 15ml avec du RPMI-10%FBS. Les cellules sont resuspendues dans du RPMI-10%FBS additionné d'anti-CD28 à 1µg/ml à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/ml.

Les plaques de stimulation sont lavées avec 1ml de PBS. 1ml de la solution de cellules est placé dans chaque puits et incubé 60 heures à 37°C. Au bout de 60 heures, les cellules sont récupérées dans du PBS-2%FBS et soumises à la sélection négative des lymphocytes T CD4 et CD8.

Les pics de CFSE obtenus à la cytométrie de flux permettent d'estimer le nombre de divisions cellulaires.

## 6 EXTRACTION D'ARN

L'ARN est extrait à l'aide du kit d'extraction d'acides nucléiques *Nucleospin RNA II* de Clontech Laboratories, Inc. selon les directives du fabricant.

Pour chaque échantillon, les cellules congelées sont lysées par 400µl de tampon de lyse (RA1) avec 4µl de β-mercaptoéthanol. Le tout est homogénéisé par une centrifugation de 1 minute à 11000g à travers un tube de filtration. 250µl d'éthanol 95% sont ajoutés et le tout est mélangé et transféré dans une colonne d'extraction, qui est centrifugée 1 minute à 7500g puis 1 minute à 11000g. L'échantillon RNA est digéré à la DNase I. Le tout est incubé 15 minutes à température ambiante. La solution est lavée trois fois dans des colonnes d'extraction.

Premier lavage par 500µl de tampon de lavage I (RA2) et une centrifugation de 45 secondes à 7500g, puis avec 600µl de tampon de lavage II (RA3) et une centrifugation de 45 secondes à 7500g, et, enfin, avec 250µl de RA3 et une centrifugation de 2 minutes à 11000g. L'ARN est élué dans 100µl d'eau sans nucléases (*Nuclease free water*), par deux éluations successives de 50µl, par centrifugation à 11000g durant 1 minute.

La qualité et la quantité d'ARN sont évaluées par spectrophotométrie et électrophorèse sur gel.

## 7 HYBRIDATION SUR MEMBRANE

Nous avons utilisé les *Atlas™ cDNA Expression Arrays* de Clontech Laboratories, Inc., selon les directives du fabricant. La liste des gènes analysés se trouve en annexe (page A-1).

Les membranes qui seraient déjà utilisées sont nettoyées à l'aide d'une solution de stripping de 500ml contenant 5ml de Tris-HCl pH8, 1ml d'EDTA 0,5M et 50ml de SDS 10%. Elles sont plongées dans la solution de stripping bouillante pendant 10 minutes, ensuite le tout est laissé à température ambiante pour 10 minutes supplémentaires, puis les membranes sont transférées dans de l'eau déionisée.

La sonde d'ADNc marquée est synthétisée par une réaction de transcription inverse en présence de nucléotides marqués radioactivement. 2 à 5 µg d'ARN sont resuspendus à une concentration de 0,5µg/µl puis complétés à 10µl par de la NFW. 4µl de *gene-specific CDS Primer Mix* sont ajoutés et le tout est incubé 10 minutes à température ambiante. Le Master Mix est préparé avec 6µl de tampon de réaction 5x (*5x Reaction Buffer*), 2µl de DTT 0,1M, 2µl de 10x dNTP Mix et 5µl de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dATP (3,000Ci/mmol, 10µCi/µl). L'ARN est ajouté et le tout est incubé 2 minutes à 42°C. 1µl d'enzyme Superscript II sont ajoutés et le mélange incubé 50 minutes à 42°C.

La sonde est ensuite purifiée par chromatographie sur colonne à l'aide de l' *Atlas NucleoSpin® Extraction Kit* de Clontech Laboratories, Inc. : l'ADNc marqué est resuspendu jusqu'à 200µl avec du tampon NT2 et centrifugé 1 minute à 11000g, puis lavé trois fois dans 400µl de tampon NT3 par des centrifugations de 1 minute à 11000g. La sonde est éluée dans

150µl de tampon NE : incubation de 2 minutes puis centrifugation d'une minute à 11000g. L'incorporation de la radioactivité est contrôlée par un compteur à scintillation.

La membrane est placée dans une bouteille et préhybridée 30 minutes en rotation à 68°C avec une solution contenant 5 ml de solution d'hybridation *ExpressHyb™* et 0,5mg de sstDNA (*Sheard salmon testes DNA* 10 mg/ml) préalablement dénaturé à 98-100°C pendant 5 minutes. Pendant ce temps, la sonde est dénaturée 20 minutes à 68°C avec 16,7µl de solution de dénaturation 10x (1M NaOH, 10mM EDTA), puis 10 minutes à 68°C avec 5µl de C<sub>0</sub>t-1 DNA (1mg/ml) et 171,7µl de solution de neutralisation 2x (1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0). Elle est ajoutée à la solution de préhybridation, dans la bouteille contenant la membrane et hybridée en rotation continue toute la nuit à 68°C.

La membrane est lavée en rotation à 68°C : 30 minutes dans la solution de lavage 1 (2x SSC 1% SDS) et 30 minutes dans la solution de lavage 2 (0,1x SSC, 0,5% SDS), puis rincée avec 200ml de 2x SSC. Elle est mise sous plastique et exposée au scanner *Instant Imager* (HP) durant 6 heures.

## 8 ANALYSE STATISTIQUE

Tous les tests statistiques ont été interprétés d'après la valeur du coefficient de probabilité p, ( $p < 0.05$ ). Une *analyse de régression linéaire* a été effectuée pour déterminer le degré de dépendance des différentes variables de l'âge des patients. Pour pouvoir comparer les sujets VIH-1-négatifs et positifs, le *test de Levene* a été utilisé pour déterminer l'homogénéité des variances et le cas échéant, lorsque les variances des variables comparées étaient homogènes, un *test d'étude-T des échantillons indépendants* a été effectué. Le *test de Welch* a été utilisé lorsque ces variances n'étaient pas homogènes (Figure 8, 9a, 10a). Une *analyse ANOVA* a été utilisée pour comparer les variables entre les trois groupes de sujets VIH-1-positifs séparés par comptes CD4. Le *test de corrélation de Pearson* a été utilisé pour déterminer la corrélation entre les différentes variables. Pour exclure la possibilité que les corrélations entre les variables soient dues à l'âge, un *test de corrélation partielle contrôlé par l'âge* a été

effectué (Figure 9b, 10b). Une *analyse de régression multivariée* a été utilisée pour étudier les effets et la capacité prédictive de l'âge, du compte CD4 et de la charge virale sur le contenu en TRECs.

## RESULTATS

### 1 ANALYSE DE LA PRODUCTION THYMIQUE : CONTENU EN TRECS DES LYMPHOCYTES T CD4 ET CD8 PERIPHERIQUES

#### 1.1 VARIATIONS DU CONTENU EN TRECS EN FONCTION DU STADE CLINIQUE, CHEZ LES SUJETS VIH-1-POSITIFS

298 sujets VIH-1-positifs en phase chronique de la maladie, faisant partie de la *Swiss HIV Cohort* et n'ayant reçu aucune thérapie anti-rétrovirale, au moment du prélèvement, ont été séparés en trois groupes, suivant leur compte de lymphocytes CD4 : stade précoce (compte CD4 supérieur à 500 cellules/ $\mu$ l) 118 sujets, stade intermédiaire (compte CD4 entre 500 et 200 cellules/ $\mu$ l) 123 sujets, stade tardif (compte CD4 inférieur à 200 cellules/ $\mu$ l) 57 sujets. 120 sujets VIH-1-négatifs ont été utilisés comme groupe contrôle. Ils proviennent du Centre Vaudois de Transfusion Sanguine.

Les deux groupes concordent pour le sexe (176 hommes et 122 femmes dans le groupe VIH-1-positif, 60 hommes et 60 femmes dans le groupe VIH-1-négatif) et l'âge (en moyenne  $36,8 \pm 13,6$  ans pour le groupe VIH-1-positif et  $37,9 \pm 11,4$  ans pour le groupe VIH-1-négatif).

Dans chaque groupe, les lymphocytes T CD4 et CD8 ont été isolés à partir de PBMC, par sélection immunomagnétique, puis le contenu en TRECs des échantillons a été mesuré, comme décrit dans la méthode.

La figure 8 donne le contenu en TRECs des sujets VIH-1-positifs et du groupe contrôle, pour les lymphocytes T périphériques, CD4 et CD8.

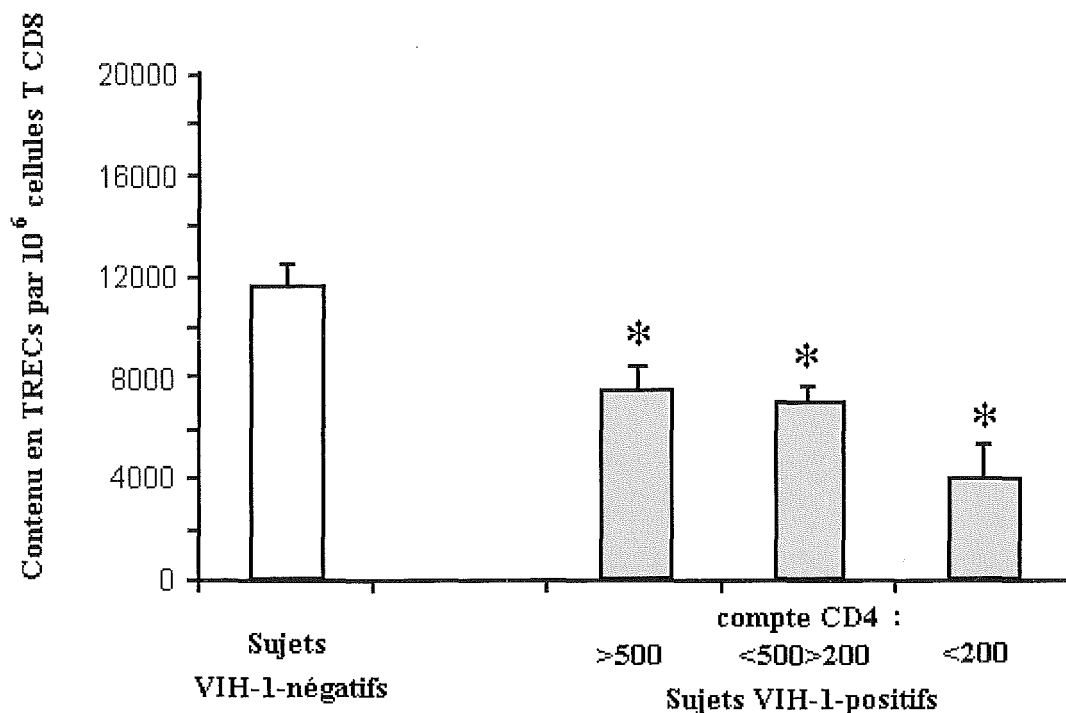
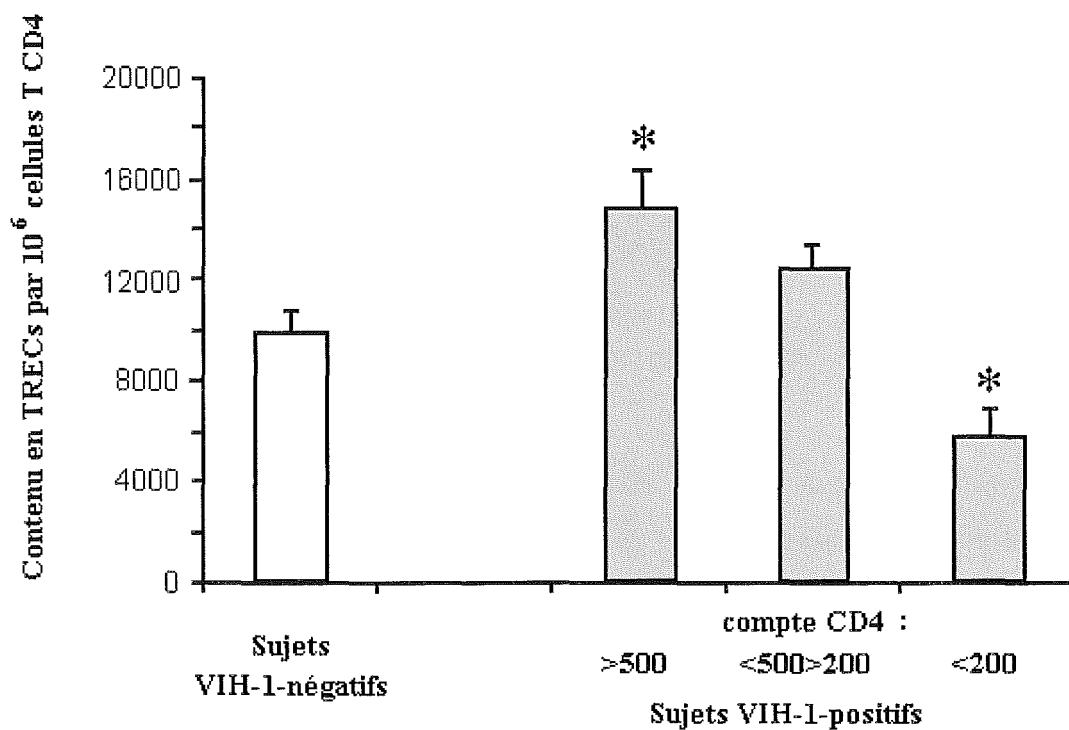


Figure 8. Contenu moyen en TRECs des cellules T CD4 et CD8 des sujets VIH-1-positifs, aux différents stades de la maladie ( les écarts statistiquement significatifs sont désignés d'une étoile )



Table 1. CONTENU MOYEN EN TRECS PAR 10<sup>6</sup> CELLULES :

	CD4	CD8
SUJETS VIH-1-NEGATIFS	9952±813	11658±856
SUJETS VIH-1-POSITIFS (CD4>500)	14859±1476	7597±924
SUJETS VIH-1-POSITIFS (500>CD4<200)	11442±1105	7074±893
SUJETS VIH-1-POSITIFS (CD4<200)	5807±1074	4067±1373

Si on s'en réfère à la figure 8, *au stade précoce* (pour un compte CD4 supérieur à 500 cellules/ $\mu$ l) pour les cellules T CD4, le contenu en TRECs est *supérieur* chez les sujets VIH-1-positifs par rapport aux sujets contrôles. *Au stade intermédiaire*, pour des comptes CD4 compris entre 500 et 200 cellules/ $\mu$ l, le contenu en TRECs des cellules CD4 reste légèrement plus élevé chez les sujets VIH-1-positifs que chez les sujets contrôles VIH-1-négatifs, toutefois la différence n'est plus statistiquement significative. *Au stade tardif*, pour des comptes CD4 inférieurs à 200 cellules/ $\mu$ l, le contenu en TRECs des cellules CD4 des sujets VIH-1-positifs devient significativement inférieur à celui des sujets contrôles.

Le contenu en TRECs des lymphocytes T CD8 reste significativement inférieur chez les sujets VIH-1-positifs par rapport aux sujets contrôles VIH-1-négatifs pour les trois stades de la phase chronique de l'infection, situation la plus marquée au stade tardif.

Le contenu en TRECs ne varierait donc pas de façon parallèle dans les deux sous-groupes de lymphocytes T, CD4 et CD8. Ceci explique pourquoi il serait hasardeux de tirer des conclusions d'analyses du contenu en TRECs d'échantillons de PBMC totaux (48, 49).

A noter, que le contenu en TRECs des cellules T CD4 des sujets VIH-1-positifs reste supérieur à celui des sujets contrôles en cas de mesures séparées pour différents comptes de cellules T CD4 du stade intermédiaire de la maladie, c'est-à-dire, pour des comptes compris entre 500 et 200 cellules/ $\mu$ l, 400 et 200 cellules/ $\mu$ l et 300 et 200 cellules/ $\mu$ l (résultats non-illustrés).

## 1.2 FACTEURS INFLUENÇANT LE CONTENU EN TRECS

Nous avons vu que le contenu en TRECs d'un échantillon peut être influencé par différentes variables : l'âge du sujet (10), le taux de division cellulaire en périphérie (41) et l'importance de la fraction de cellules naïves (41). Il faudrait donc de s'assurer que le contenu en TRECs plus élevé des lymphocytes T CD4 observé chez les sujets-VIH-1-positifs en stade précoce de la phase chronique de la maladie n'est pas dû à un âge globalement plus jeune, une division cellulaire diminuée ou une fraction plus importante de cellules naïves.

Pour cela, d'une part, nous nous sommes assurés que les différentes tranches d'âge étaient représentées de façon proportionnelle dans les deux groupes :

- Sujets VIH-1-positifs : 70-75 sujets pour les tranches d'âge 20-29, 30-39 et 40-49. A peu près la moitié (n=33) pour la tranche d'âge 50-59
- Sujets VIH-1-négatifs : 30-35 sujets pour les tranches d'âge 20-29, 30-39 et 40-49. A peu près la moitié (n=15) pour la tranche d'âge 50-59
- Moyenne d'âge : sujets VIH-1-négatifs : 37.9 ; sujets VIH-1-positifs : compte CD4>500 : 37.76, compte CD4 entre 500 et 200 : 36.72, compte CD4<200 : 35.93

D'autre part, le taux de prolifération cellulaire a été analysé par la mesure de l'expression du marqueur Ki67 (voir plus bas, chapitre 1.2.1) et une analyse des pourcentages des différentes sous-populations cellulaires des lymphocytes T CD4 et CD8 a été effectuée, pour les sujets VIH-1-positifs et négatifs (voir plus bas, chapitre 1.2.2).

### 1.2.1 Prolifération cellulaire : expression du marqueur Ki67

L'expression du marqueur nucléaire Ki67 a été mesurée, par cytométrie de flux, comme décrit dans la méthode, dans plusieurs échantillons sélectionnés aux hasard (21 pour les sujets VIH-1-négatifs, 42 pour les sujets VIH-1-positifs au stade précoce et au stade intermédiaire de la maladie). La figure 9 illustre les niveaux d'expression moyens du marqueur Ki67 des lymphocytes T périphériques, CD4 et CD8, pour les sujets VIH-1-négatifs et positifs.

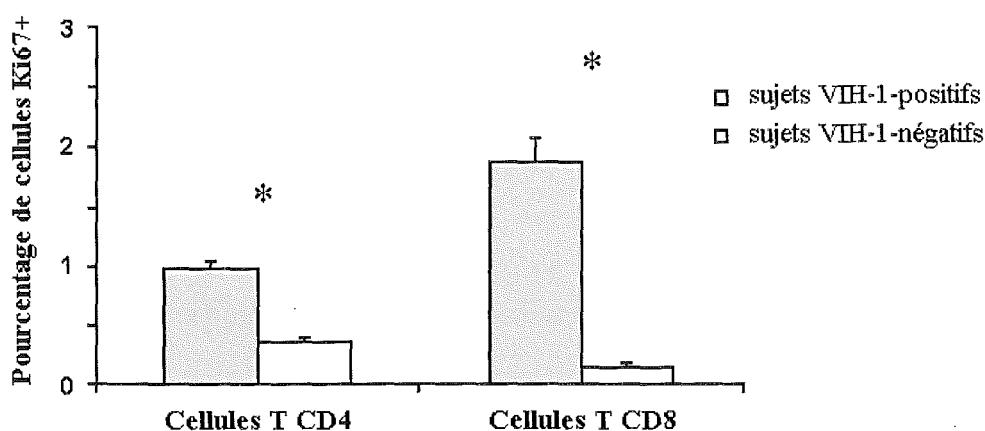


Figure 9. Analyse de l'expression du marqueur Ki67 dans les cellules T CD4 et CD8 des sujets VIH-1-négatifs et positifs ( les écarts statistiquement significatifs sont désignés d'une étoile )

Nous constatons qu'il y a une augmentation statistiquement significative du pourcentage de cellules exprimant le marqueur Ki67, chez les sujets VIH-1-positifs, pour les lymphocytes T, CD4 et CD8. Ceci n'est pas surprenant, connaissant l'hyper-activation du système immunitaire induite par l'infection à VIH-1 (8). De plus, les observations quant à l'augmentation de l'expression du marqueur Ki67 lors d'une infection à VIH-1 sont largement documentées dans la littérature. De plus, l'écart dans l'expression du marqueur Ki67 entre les

sujets VIH-1-négatifs et positifs est beaucoup plus important pour les lymphocytes T CD8 (environ treize fois plus pour les sujets VIH-1-positifs).

Une division cellulaire augmentée pourrait expliquer une diminution du contenu en TRECs, par dilution. Or, le contenu en TRECs des lymphocytes T CD4, dans le stade précoce de la maladie est supérieur chez les sujets VIH-1-positifs par rapport aux sujets VIH-1-négatifs, malgré une expression légèrement plus élevée du marqueur Ki67. L'augmentation du contenu en TRECs observée n'est donc pas due à une diminution du taux de division périphérique des cellules T CD4 (Figure 9). Il existe donc un phénomène additionnel qui limite la chute du contenu en TRECs malgré la légère augmentation de la division périphérique.

Pour ce qui est des lymphocytes T CD8, l'importante augmentation de l'expression du marqueur Ki67 pourrait expliquer la chute observée du contenu en TRECs chez les sujets VIH-1-positifs. Il existe en effet une corrélation inversement proportionnelle entre le pourcentage de cellules exprimant le marqueur Ki67 et le contenu en TRECs, pour les lymphocytes T CD8.

### **1.2.2 Pourcentage de cellules naïves dans les échantillons analysés**

Les populations cellulaires analysées ne sont pas des populations purifiées de cellules naïves, mais des populations hétérogènes des cellules naïves et mémoires. Ayant effectué de multiples cycles de division, elles contiennent peu ou pas de TRECs, et donc contribuent à leur dilution en périphérie. La destruction sélective des cellules mémoires par le VIH-1 aurait pour effet l'augmentation du contenu en TRECs chez les sujets positifs, par un mécanisme de concentration des cellules naïves. Afin d'exclure ce phénomène, et pour que la comparaison des valeurs obtenues pour les sujets VIH-1-positifs et VIH-1-négatifs soit valable, il faut s'assurer que la population de lymphocytes analysée contienne la même proportion de cellules naïves et mémoires dans les deux groupes.

La fraction de cellules naïves dans plusieurs échantillons sélectionnées aux hasard (21 pour les sujets VIH-1-négatifs, 42 pour les sujets VIH-1-positifs au stade précoce et au stade intermédiaire de la phase chronique) a été déterminée par la mesure de l'expression du marqueur des cellules naïves CD45RA par cytométrie de flux.

La figure 10 donne les pourcentages des cellules CD45RA-positives pour les lymphocytes T CD4 et CD8 des sujets VIH-1-négatifs et positifs

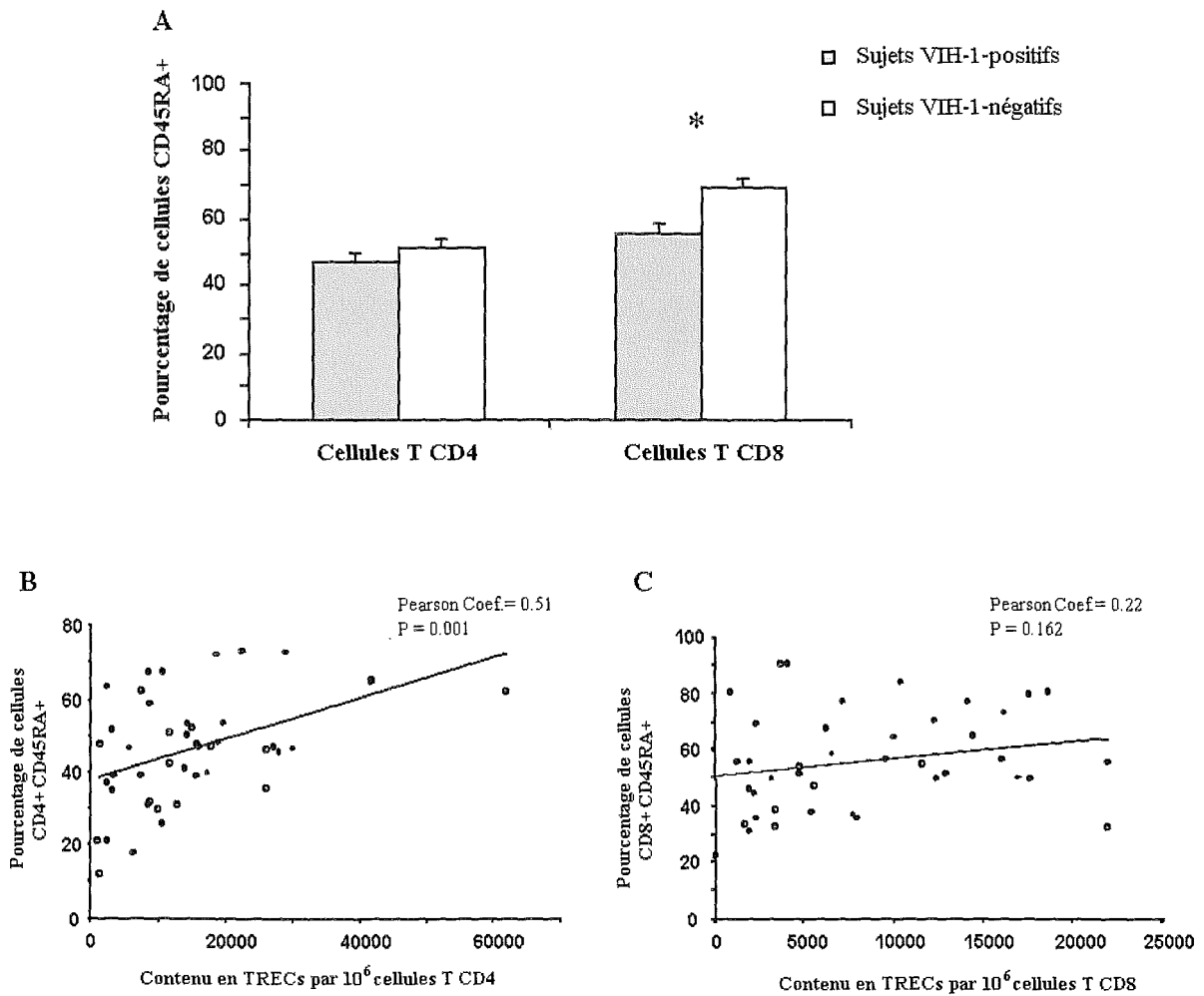


Figure 10. A. Analyse de l'expression du marqueur CD45RA dans les cellules T CD4 et CD8, les écarts statistiquement significatifs sont désignés d'une étoile  
 B. Corrélation entre le pourcentage de cellules CD45RA+CD4+ et le contenu en TRECs de la population CD4+  
 C. Corrélation entre le pourcentage de cellules CD45RA+CD8+ et le contenu en TRECs de la population CD8+

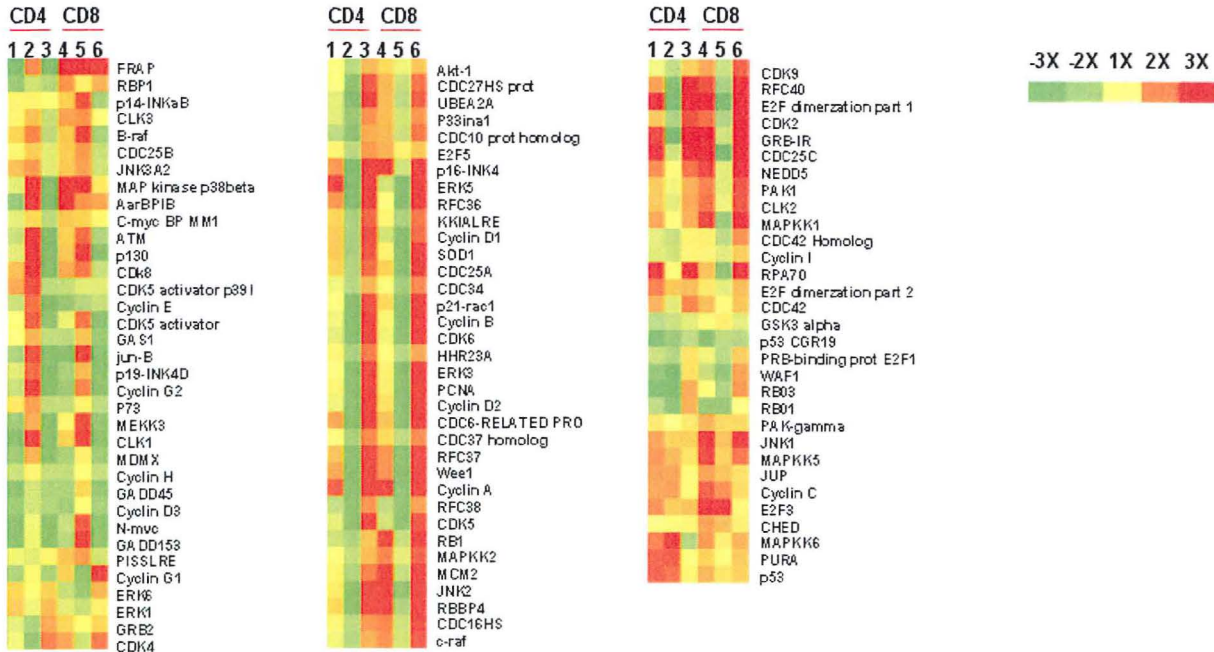
Pour les lymphocytes T CD4, le pourcentage de cellules naïves reste stable dans les stades précoce et intermédiaire de la phase chronique de l'infection à VIH-1. Pour les lymphocytes T CD8, cette fraction est moins importante chez les patients infectés que les sujets contrôles. Donc la diminution du contenu en TRECs des lymphocytes T CD8 des sujets infectés est imputable en partie à une diminution du nombre de cellules naïves.

## 2 BIOPUCES D'ADNC : PROFILS D'EXPRESSION DES GENES REGULATEURS DU CYCLE CELLULAIRE

L'expression des gènes relatifs au cycle cellulaire, dans le contexte d'une infection à VIH-1, a été analysée par la méthode des biopuces d'ADNc, comme décrit dans la méthode. Six types d'échantillons ont été utilisés : des cellules T CD4 et CD8 ont été isolées à partir de PBMC de sujets VIH-1-négatifs (n=14), de PBMC de sujets VIH-1-positifs (n=18) (en phase chronique de la maladie, n'ayant reçu aucune thérapie anti-rétrovirale) et de PBMC de sujets VIH-1-négatifs ayant subi une activation *in vitro* de 72 heures par anti-corps anti-CD3 et anti-CD28 (n=6). L'ARN extrait de chaque type d'échantillon a été soumis à une réaction d'hybridation sur une membrane portant 111 gènes relatifs au cycle cellulaire, comme décrit dans la méthode. La liste de gènes analysés se trouve en annexe (page A-2).

Les résultats sont présentés sous forme de rapports d'expression relative, pour les lymphocytes T CD4 et CD8, dans trois situations différentes (Figure 11) : rapports des niveaux d'expression des gènes entre les sujets VIH-1-positifs et les sujets VIH-1-négatifs, rapports des niveaux d'expression des gènes entre les sujets VIH-1-positifs et les sujets VIH-1-négatifs ayant subi une activation *in vitro* et rapports des niveaux d'expression des gènes entre les sujets VIH-1-négatifs ayant subi une activation *in vitro* et les sujets VIH-1-négatifs. Cette dernière situation donne donc une image de la variation de l'expression génétique lors d'une activation et prolifération cellulaire (avec la réserve qu'il s'agisse ici d'une activation *in vitro*).

1 et 4 : Sujets VIH-1-positifs / Sujets VIH-1-négatifs  
 2 et 5 : Sujets VIH-1-positifs / Sujets VIH-1-négatifs activés in vitro  
 3 et 6 : Sujets VIH-1-négatifs / Sujets VIH-1-négatifs activés in vitro



CD4 :  
 Sujets VIH-1-négatifs n=7  
 Sujets VIH-1-positifs n=8  
 Sujets VIH-1-négatifs activés in vitro n=3

CD8 :  
 Sujets VIH-1-négatifs n=7  
 Sujets VIH-1-positifs n=10  
 Sujets VIH-1-négatifs activés in vitro n=3

Figure 11. Biopuces d'ADNc : présentation des résultats

Pour les cellules T CD4 et CD8 respectivement : les colonnes 1 et 4 représentent les rapports des niveaux d'expression des gènes entre les sujets VIH-1-positifs et les sujets VIH-1-négatifs, les colonnes 2 et 5 représentent les rapports des niveaux d'expression des gènes entre les sujets VIH-1-positifs et les sujets VIH-1-négatifs ayant subi une activation *in vitro*, les colonnes 3 et 6 représentent les rapports des niveaux d'expression des gènes entre les sujets VIH-1-négatifs ayant subi une activation *in vitro* et les sujets VIH-1-négatifs.

Le code couleur utilisé, pour chaque gène, est le suivant :

- rouge : le rapport des niveaux d'expression entre la population étudiée (numérateur) et à la population de référence (dénominateur) est supérieur ou égal à 3 (gène exprimé au moins trois fois plus dans la population étudiée)
- jaune : le rapport des niveaux d'expression entre la population étudiée et la population de référence est proche de 1 (expression conservée)
- vert : le rapport des niveaux d'expression entre la population étudiée et à la population de référence est inférieur ou égal à 0.3 (gène exprimé au moins trois fois moins dans la population étudiée)
- orange : situation intermédiaire : rapport des niveaux d'expression compris entre 1 et 3
- vert clair : rapport des niveaux d'expression compris entre 1 et 0.3



## 2.1 PROFIL D'EXPRESSION GENETIQUE D'UNE ACTIVATION *IN VITRO* PAR ANTI-CD3 ET ANTI-CD28

Pour les lymphocytes T CD4 et CD8 respectivement, les colonnes 3 et 6 montrent les effets d'une activation *in vitro* sur le niveau d'expression des différents gènes en relation avec la régulation du cycle cellulaire. Nous pouvons retrouver, dans le profil d'expression génétique d'une activation *in vitro*, plusieurs phénomènes présentés dans l'introduction théorique (se référer à la figure 6 pour le schéma des cascades de régulation du cycle cellulaire) :

- *Passage G<sub>1</sub>/S* : dans les deux populations, les cyclines de la phase G<sub>1</sub> (cycline D3 et E) sont sous-exprimée dans les cellules activées. Les CDK correspondantes, respectivement, CDK2 et CDK4 sont fortement sur-exprimées. Les gènes de la famille E2F et Rb sont légèrement sur-exprimés. Il semble donc que le marqueur le plus approprié du passage à la phase S du cycle soit une augmentation importante des CDK 2 et 4.
- *Passage G<sub>2</sub>/M* : Les cyclines des phases plus tardives du cycle sont sur-exprimées (cycline A et B), ainsi que les CDK correspondantes (CDK 5, 6 et 7). Ceci montre une prolifération cellulaire efficace, les cellules se trouvant dans diverses phases du cycle.
- *Inhibiteurs du cycle* : p16 est fortement sur-exprimé dans les deux populations. En effet, son expression est fortement activée par une boucle de rétrocontrôle négatif de la cascade Rb/E2F durant la phase G<sub>1</sub>. P21 est aussi sur-exprimé, selon un mécanisme similaire. La protéine 130 associée au Rb (p130) induisant un arrêt du cycle est fortement sous-exprimée, ainsi que p19. La plupart des inhibiteurs du cycle sont sur-exprimés, les mécanismes de rétro-contrôle internes sont donc efficaces, empêchant une division anarchique.
- *Activateurs du cycle* : les activateurs des CDK sont en général sur-exprimés (cdc25, cdc2a, cdc34).
- *Réparation de l'ADN* : les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN (HHR32, PCNA) sont sur-exprimés, évitant des erreurs dans la transcription d'ADN qui pourraient être responsables d'un arrêt du cycle ou d'une prolifération incontrôlée d'une cellule endommagée.

- *Equilibre p53/mdm2* : l'expression de p53 est conservée, mais, son inhibiteur principal, mdm2 est sur-exprimé, ce qui implique un équilibre p53/mdm2 en faveur de la division cellulaire.
- Famille des MAPK : les MAPK et leurs gènes cibles favorables à la division sont sur-exprimés dans les deux populations (MAPKK1, MAPKK 2, MAPKK5, ERK3, ERK5, ERK6, JNK1, JNK2, Grb-ir). Par contre, les MAPK et leurs cibles induisant un arrêt du cycle sont sous-exprimées : MAPKK3, MAPK p38b, JNK3A2, GADD45, GADD153, JunB.

Ces résultats représentent l'image globale des profils d'expression génétiques d'un ensemble de cellules en division. Il ne s'agit pas de s'arrêter à l'observation d'un ou deux gènes. Le cycle cellulaire est régulé de façon complexe et les cascades de régulation sont souvent redondantes. En effet, nous pouvons observer que les gènes favorisant la division ne sont pas nécessairement sur-exprimés et que l'expression de certains inhibiteurs du cycle est parfois augmentée pour assurer une voie de régulation.

Avant de tirer des conclusions à partir de nos résultats, il ne faudrait en aucun cas oublier que les taux d'expression génétiques mesurés à l'aide des microréseaux d'ADNc représentent l'expression *moyenne* de chaque gène dans un échantillon donc, les gènes ayant le niveau d'expression le plus élevé, dans une population donnée, sont ceux exprimés dans le plus grand nombre de cellules au moment du prélèvement. Par exemple, un gène exprimé à un certain niveau par le tiers des cellules d'une population aurait le même niveau d'expression dans une autre population où toutes les cellules expriment ce gène à un niveau trois fois plus bas. De plus, l'interprétation des résultats est influencée par la nature même du cycle cellulaire : les niveau d'expression des gènes varient avec les phases du cycle et les gènes exprimés durant une phase très longue (phase G<sub>1</sub>) auront plus de chance d'être détectés avec ce genre de manipulation. Or, pour certains gènes cruciaux à la régulation du cycle cellulaire, des variations même minimales du niveau d'expression peuvent avoir un effet majeur.

## 2.2 EXPRESSION DES GENES REGULATEURS DU CYCLE CELLULAIRE DANS LE CADRE D'UNE INFECTION A VIH-1

Il s'agit à présent de comparer ces données avec les profils d'expression des mêmes gènes pour les colonnes 1 et 4, qui comparent leurs niveaux d'expression chez les sujets VIH-1-positifs par rapport aux sujets VIH-1-négatifs.

Pour les lymphocytes T CD8, les profils d'expression des gènes régulant la transition G<sub>1</sub>/S ressemblent fortement à l'activation *in vitro* :

- *Passage G<sub>1</sub>/S* : sous-expression des cyclines D3 et E et sur-expression des CDK2 et 4. Les gènes de la famille E2F et Rb sont légèrement sur-exprimés.
- *Passage G<sub>2</sub>/M* : il n'y pas de sur-expression des cyclines A et B et des CDK5, 6 ou 7
- *Inhibiteurs du cycle* : p16 est sur-exprimé, mais il n'y pas d'inhibition de la p130
- *Activateurs du cycle* : les activateurs du cycle sont sur-exprimés.
- *Réparation de l'ADN* : les gènes de réparation de l'ADN ne sont pas sur-exprimés.
- *Equilibre p53/mdm2* : p53 et son inhibiteur mdm2 ont des profils d'expression semblables à ceux observés chez les lymphocytes de sujets VIH-1-négatifs activés *in vitro*. Il s'agit du phénomène qui a la plus grande incidence sur la capacité de prolifération des lymphocytes T CD8 observée ici.
- *Famille des MAPK* : les profils d'expression des MAPK sont également semblables à ceux de l'activation *in vitro*.

En conclusion, à peu de choses près, les lymphocytes T semblent se rapprocher du profil d'expression génétique des cellules activées *in vitro*.

Les lymphocytes T CD4, par contre, présentent des écarts plus considérables avec la situation de l'activation *in vitro*.

- *Passage G<sub>1</sub>/S* : pas de sur-expression de la CDK2 et de la CDK 4. Les gènes de la famille des E2F et Rb ne sont pas sur-exprimés
- *Passage G<sub>2</sub>/M* : pas de sur-expression des CDK 5, 6, 7 et des cyclines A et B
- *Inhibiteurs du cycle* : p16 n'est que légèrement sur-exprimé et l'inhibiteur p19 et la protéine p130 ne sont pas sous-exprimés
- *Activateurs du cycle* : pas d'augmentation de l'expression des activateurs du cycle
- *Réparation de l'ADN* : les gènes réparateurs de l'ADN ne sont pas sur-exprimés
- *Equilibre p53/mdm2* : p53 est sur-exprimé, alors que le niveau d'expression de mdm2 reste constant
- *Famille des MAPK* : sont légèrement sur-exprimées.

Il n'y a donc pas de sur-expression de la CDK2 et de la CDK4, kinases-clés de la transition G<sub>1</sub>/S, ni des cyclines et CDK des phases plus tardives du cycle. De façon plus conséquente : p53 est sur-exprimé, sans augmentation de l'expression de mdm2, alors qu'il s'agit de l'inhibiteur le plus important du cycle cellulaire. Les cellules T CD4 ont donc un profil d'expression concordant avec un arrêt du cycle et l'apoptose. De façon conjointe, les MAPK, sont légèrement sur-exprimées ce qui indiquerait une dissociation entre l'état d'activation et la capacité de prolifération des lymphocytes T CD4.

## DISCUSSION

### 1 FONCTION THYMIQUE DURANT L'INFECTION A VIH-1

Le but de cette étude consistait à déterminer l'effet d'une infection à VIH-1 sur la fonction thymique. La controverse existant à ce sujet provient, d'une part, de la difficulté à différencier les effets périphériques d'une éventuelle variation de la production thymique des autres perturbations dues à l'infection à VIH-1, et, d'autre part, d'une conception souvent insuffisamment rigoureuse des expériences.

Dans l'idéal, il faudrait :

- disposer d'une cohorte de sujets infectés de taille suffisante, pour chacun des stades de la maladie, pour pouvoir évaluer les mécanismes de progression de l'infection, ainsi que d'un groupe de sujets contrôles d'âge correspondant ;
- effectuer les analyses sur des populations cellulaires les plus spécifiques possibles ;
- dans ces populations cellulaires, mesurer simultanément le plus grand nombre de paramètres possibles (activation, prolifération, apoptose, production thymique) afin d'exclure ou d'affirmer la participation de ces différents mécanismes dans les perturbations observées.

Pour ce qui est de l'analyse du contenu en TRECs, les études précédentes possédaient souvent un nombre de sujets réduit (10, 41, 48, 50), et n'étaient pas statistiquement adaptées à l'analyse de la fonction thymique. De plus, parfois, les mesures étaient effectués sur des prélèvements de PBMC (48, 49) et la diminution du contenu en TRECs observée, serait, dans ce cas, due principalement à la population de cellules T CD8, qui se divisent de façon accélérée, donc contiennent peu de TRECs.

En outre, il n'y a pas, à ce jour, d'étude analysant la variation du contenu en TRECs suivant les stades cliniques de la maladie. Notre étude a tenté de palier à cela en utilisant des cohortes importantes, en isolant les cellules T CD4 et CD8 et, surtout, en séparant les sujets VIH-1-

positifs dans trois groupes, d'après le compte CD4, suivant le stade de la phase chronique de la maladie (stade précoce, intermédiaire, tardif).

Dans notre étude, l'augmentation du contenu en TRECs des lymphocytes T CD4, par rapport au groupe contrôle, durant le stade précoce de la phase chronique de l'infection, pourrait indiquer une production thymique augmentée cherchant à palier à la destruction massive des lymphocytes CD4 en périphérie, effet compensatoire qui serait perdu avec l'évolution de la maladie.

Au stade intermédiaire, le contenu en TRECs des lymphocytes T CD4 diminue, mais reste plus élevé que dans le groupe contrôle. Ceci pourrait être dû à l'infection du thymus ou celle des progéniteurs thymiques, ce qui diminuerait progressivement la production thymique des cellules T CD4. Au stade tardif de l'infection, une chute importante du contenu en TRECs des lymphocytes T CD4 est observé. A ce stade, le thymus serait dépassé par l'infection. En effet, la destruction ganglionnaire est devenue très importante et la virémie a fortement augmenté (2). Beaucoup de nouvelles cellules sont infectées, leur destruction est augmentée, et la production thymique n'arriverait plus à suivre, surtout si le thymus était lui-même infecté (100).

L'analyse de l'expression du marqueur de prolifération Ki67 (pour les cellules T CD4, environ deux fois plus élevé chez les sujets VIH-1-positifs), nous permet d'exclure, à ce stade, la présence d'une division diminuée des lymphocytes T CD4 qui pourrait provoquer une concentration des TRECs par rapport aux sujets contrôles. La fraction de cellules T CD4 naïves ne variant pas de façon significative dans les groupes VIH-1-positifs et négatifs nous permet également d'exclure une destruction sélective des cellules mémoires qui résulterait en une concentration des cellules naïves dans les échantillons et une augmentation du contenu en TRECs. Nos observations sont donc bien le reflet de la production thymique.

Pour les lymphocytes T CD8 des sujets VIH-1-positifs, il est intéressant de remarquer que leur contenu en TRECs reste inférieur à celui des sujets VIH-1-négatifs à tous les stades de la maladie. Toutefois, comme l'expression du marqueur Ki67 est fortement augmentée dans les cellules T CD8, par rapport aux sujets VIH-1-positifs, il semblerait que l'augmentation importante du niveau de division périphérique des lymphocytes T CD8, dans le cadre de l'infection à VIH-1, soit le principal responsable du bas contenu en TRECs de ces cellules.

Cette hypothèse est soutenue par les études démontrant la présence d'une hyper-activation du système immunitaire et d'une forte expansion des cellules CD8 spécifiques dans le cadre de l'infection à VIH-1 (4, 5). De plus, l'hypothèse que cette diminution du contenu en TRECs proviendrait d'une diminution de la production centrale de lymphocytes T CD8 est affaiblie par le fait qu'une diminution sélective de la production thymique des lymphocytes T CD8 au stade précoce paraît peu probable.

D'autre part, il est vrai que le marqueur de prolifération cellulaire Ki67, utilisé dans notre étude, souffre d'imprécision. Il s'agit d'un marqueur des cellules se trouvant dans l'une des phases du cycle cellulaire, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> ou M, qu'elles effectuent une division efficace ou qu'elles soient bloquées dans l'une de ces phases. Le taux de division cellulaire peut, de ce fait, être sur-estimé mais pas sous-estimé. Donc, même si le niveau d'expression du marqueur Ki67 ne donne pas une image parfaite du niveau de division cellulaire, il est parfaitement adapté aux besoins de notre analyse.

Ces précautions nous permettent d'affirmer que, au vu de nos résultats, il existe une production thymique compensatrice de lymphocytes T CD4, dans la population de patients adultes en phase chronique de l'infection à VIH-1, du moins dans les stades précoces. Cette production s'amenuise au stade intermédiaire, pour disparaître entièrement au stade tardif de la phase chronique de la maladie.

L'homéostasie des lymphocytes T CD4 chez les individus adultes devrait être maintenue principalement par des mécanismes de division périphérique, toutefois dans les situations de lymphopénie la production thymique peut être mobilisée. Ceci est démontré par l'augmentation du taux de TRECs suite à une greffe thymique ou une transfusion de cellules souches (10, 22).

A noter que la conservation du nombre de cellules T CD8, dans ce contexte, s'expliquerait par la division accélérée de ces cellules, en opposition avec la perte de la capacité de division des cellules CD4 (effet direct et indirect de l'infection, corroboré par les résultats des biopuces d'ADNc). De plus, une infection et une destruction sélective des thymocytes CD4<sup>+</sup> (100) pourrait expliquer une capacité de production prolongée de lymphocytes CD8 par le thymus.

En conclusion, le grand nombre d'échantillons analysés et les précautions prises en mesurant, conjointement au contenu en TRECs, le taux de division périphérique et la fraction de cellules naïves de nos échantillons, nous permettent d'affirmer que le thymus des sujets infectés par le virus VIH-1 reste actif durant les stades précoce et intermédiaire de la phase chronique de la maladie et pourrait freiner la chute du compte CD4.

## 2 CAPACITE DE PROLIFERATION DES LYMPHOCYTES T DANS LE CADRE D'UNE INFECTION A VIH-1

Nous avons observé des différences importantes dans l'expression des gènes relatifs au cycle cellulaire, dans le contexte d'une infection à VIH-1 et au cours d'une activation *in vitro*. Toutefois, comme cette dernière représente une stimulation non-physiologique et extrêmement forte, il s'agit de l'utiliser plutôt comme un indicateur des principales variations de l'expression des gènes au cours d'une division cellulaire, que comme un outil de comparaison strict et précis. Il s'agit de s'assurer que les voies principales de progression du cycle cellulaire se déroulent sans entrave et que l'image des profils d'expression des gènes concernés, dans son ensemble, soit cohérente.

Nous avons vu que l'activation *in vitro* induit, au niveau de l'expression des gènes, les effets principaux suivants : augmentation de l'expression des CDK2 et CDK4, diminution de l'expression des cyclines D et E, augmentation de l'expression de p16, déplacement de l'équilibre p53/mdm2 en faveur de mdm2 et enfin augmentation de l'expression des gènes de la famille des MAPK favorisant l'activation et la prolifération cellulaires et inhibant l'apoptose.

Pour les lymphocytes T CD8 des individus VIH-1-positifs, les profils d'expression des gènes régulant la transition G<sub>1</sub>/S ressemblent fortement à l'activation *in vitro* : sous-expression des cyclines D et E et sur-expression des CDK2 et 4. Par contre les gènes de la transition G<sub>2</sub>/M ne sont pas sur-exprimés. A peu d'exceptions près, les activateurs et les inhibiteurs du cycle suivent les profils d'expression de l'activation *in vitro*. Somme toute, à quelques détails près, les CD8 semblent proliférer de façon efficace.



Les différences présentes par rapport au profil d'expression des cellules activées *in vitro* seraient dues au fait que l'intensité d'activation cellulaire au cours de l'infection à VIH-1 est moindre que celle de l'activation *in vitro* de notre manipulation. Toutes les cellules n'étant pas activées au même niveau, la population de cellules qui ne se divise pas pourrait atténuer les variations du profil génétique des cellules qui cyclent.

En revanche, les lymphocytes T CD4 présentent des écarts plus considérables avec le profil génétique des cellules activées *in vitro*. En effet, nous constatons une absence de sur-expression de la CDK2 et de la CDK 4, kinases-clés de la transition G<sub>1</sub>/S. Il n'y a pas d'augmentation de l'expression des activateurs du cycle. De façon plus conséquente : mdm2 n'est pas sur-exprimé et p53 est sur-exprimé. Il y a déséquilibre du couple d'antagonistes p53/mdm2 qui représente l'un des mécanismes majeurs de contrôle de la progression du cycle cellulaire. Ces cellules pourraient donc être bloquées dans la phase précoce du cycle (29, 30). La balance tend vers l'arrêt du cycle et favorise l'apoptose. Conjointement à cela, les MAPK sont légèrement sur-exprimées, témoignant la présence d'une activation cellulaire sous-jacente (32, 33). En conclusion, les lymphocytes T CD4 ne se divisent pas de façon efficace. Plusieurs mécanismes de régulation de la progression du cycle cellulaire sont perturbés par rapport à l'activation *in vitro*.

Les causes possibles de cette perturbation de la capacité de prolifération des cellules T CD4 sont multiples et, actuellement, très bien documentées dans la littérature (8-10, 29-34). Les cellules T CD4 ne seraient pas capables de cycliser efficacement à cause des effets directs (bloc de la progression du cycle cellulaire par certaines protéines virales) ou indirects (hyperactivation immunitaire, perturbation de l'environnement cytokinique et des structures des organes lymphoïdes, résultant en une activation suboptimale et inadéquate des cellules T CD4), de l'infection (8). Une apoptose augmentée serait imputable aux mêmes mécanismes (32-34).

De façon intéressante, on peut rappeler que le niveau du marqueur Ki67 est conservé dans les cellules T CD4 des sujets VIH-1-positifs à tous les stades de la phase chronique de la maladie. Ceci n'est pas en contradiction avec une capacité de division diminuée de ces cellules, car le signal Ki67 est présent dans toutes les phases du cycle cellulaire et les cellules bloquées en phase G<sub>1</sub> seront positives pour le signal Ki67. Autrement dit, les cellules T CD4 naïves activées ne se divisent pas avec la même fréquence chez les sujets VIH-1-négatifs que chez les sujets infectés par le virus VIH-1. Au contraire, chez ces derniers elles seraient activées et tenteraient des divisions mais leur activation suboptimale ne leur permettrait pas de les achever.

Quant aux cellules T CD8, même si nous ne pouvons pas évaluer leur niveau de production centrale, la présence d'une activation massive et d'un taux de division augmenté est soutenue par les deux manipulations. La cause en seraient également les effets de l'infection, toutefois, un mécanisme homéostatique cherchant à compenser la perte des cellules T CD4 pourrait jouer un rôle.

## CONCLUSION

### **Fonction thymique dans le cadre d'une infection à VIH-1 chez l'adulte :**

- Le contenu en TRECs des lymphocytes T CD4 des sujets VIH-1-positifs est supérieur à celui des sujets VIH-1-négatifs, dans les stades précoces de la maladie, et témoignerait d'une production thymique active de lymphocytes T CD4 ;
- Le contenu en TRECs des lymphocytes T CD8 des sujets VIH-1-positifs est inférieur à celui des sujets VIH-1-négatifs, pour tous les stades de la phase chronique de la maladie. Ceci reflèterait le taux de prolifération massif de ces cellules.

### **Expression des gènes relatifs au cycle cellulaire, dans le cadre d'une infection à VIH-1 :**

- Au cours de l'infection à VIH-1, les cellules T CD4 subissent une activation suboptimale et ne semblent pas capables d'effectuer des divisions cellulaires. Leur profil d'expression génétique indiquerait un bloc de la progression du cycle cellulaire en phase précoce et une tendance à l'apoptose.
- Les cellules T CD8, en revanche, ont un profil d'expression génétique compatible avec une division cellulaire efficace.

## REFERENCES

- (1) Harari A, Rizzardi GP, Ellefsen K, Ciuffreda D, Champagne P, Bart PA, Kaufmann D, Telenti A, Sahli R, Tambussi G, Kaiser L, Lazzarin A, Perrin L, Pantaleo G. Analysis of HIV-1- and CMV-specific memory CD4 T-cell responses during primary and chronic infection. *Blood*. 2002 Aug 15;100(4):1381-7.
- (2) Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol*. 1996;50:825-54
- (3) Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*. 1995 Jan 12;373(6510):117-22
- (4) Chun TW, Fauci AS. Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Sep 28;96(20):10958-61
- (5) Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*. 1994 Sep;68(9):6103-10.
- (6) Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW, Borrow P, Saag MS, Shaw GM, Sekaly RP, et al. Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature*. 1994 Aug 11;370(6489):463-7
- (7) Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, Orenstein JM, Kotler DP, Fauci AS. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature*. 1993 Mar 25;362(6418):355-8
- (8) McCune J. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature*. 2001 Apr 19;410: 974-979
- (9) Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995 Jan 12;373(6510):123-6
- (10) Douek DC, Betts MR, Hill BJ, Little SJ, Lempicki R, Metcalf JA, Casazza J, Yoder C, Adelsberger JW, Stevens RA, Baseler MW, Keiser P, Richman DD, Davey RT, Koup RA. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J Immunol*. 2001 Dec 1;167(11):6663-8
- (11) Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000 Jul 6;343(1):37-49
- (12) Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med*. 2000 Jul 13;343(2):108-17
- (13) Goldrath AW, and Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*. 1999;402(6759): 255-262.
- (14) Jameson SC. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(8): 547-556.
- (15) Berzins SP, Boyd RL and Miller JFAP. The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool. *J Exp Med*. 1998;187: 1839-1848.

- (16) Goldrath AW, and Bevan MJ. Low affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity*. 1999;11: 183-190.
- (17) Viret C, Wong FS, Janeway CA. Designing and maintaining the mature TCR repertoire : the continuum of self-peptide:self-MHC complex recognition. *Immunity*. 1999. 10:559
- (18) Botolin E, Annett G, Parkman R, and Weinberg K. Serum levels of Il-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Bone Marrow Transplant*. 1999; 23 (8): 783-788
- (19) Murali-Krishna K, Lau LL, Sambhara S, Lemonnier F, Altman J, and Ahmed R. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science*. 1999;286(5443): 1377-13781.
- (20) Rutella S, Pierelli L, Bonanno G, Mariotti A, Sica S, Sora F, Chiusolo P, Scambia G, Rumi C, and Leone G. Immune reconstitution after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: effect of interleukin-15 on T-cell survival and effector functions. *Exp Hematol*. 2001; 29 (12): 1503-1516
- (21) Klein AK, Patel DD, Gooding ME, Sempowski GD, Chen BJ, Liu C, Kurtzberg J, Haynes BF, and Chao NJ. T-Cell recovery in adults and children following umbilical cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2001;7(8): 454-466.
- (22) Douek DC, Vescio RA, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Zhang L, Berenson JR, Collins RH, Koup RA. Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem cell transplantation and prediction of T cell reconstitution. *Lancet*. 2000. 355: 1875-1881
- (23) Mackall CL, Stein D, Fleisher TA, Brown MR, Hakim FT, Bare CV, Leitman SF, Read EJ, Carter CS, Wexler LH, and Gress RE. Prolonged CD4 depletion after sequential autologous peripheral blood progenitor cell infusions in children and young adults. *Blood*. 2000;96(2): 754-762.
- (24) Hakim FT, and Gress RE. Reconstitution of thymic function after stem cell transplantation in humans. *Curr Opin Hematol*. 2002;9(6): 490-496.
- (25) Hazenberg MD, Otto SA, de Pauw ES, Roelofs H, Fibbe WE, Hamann D, and Miedema F. T-cell receptor excision circle and T-cell dynamics after allogeneic stem cell transplantation are related to clinical events. *Blood*. 2002. 99(9):3449-53.
- (26) Kumaki S, Minegishi M, Fujie H, Sasahara Y, Ohashi Y, Tsuchiya S, and Konno T. Prolonged secretion of IL-15 in patients with severe forms of acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in children. *Int J Hematol*. 1998;67(3): 307-312.
- (27) Dumont-Girard F, Roux E, van Lier RA, Hale G, Helg C, Chapuis B, Starobinski M, and Roosnek E. Reconstitution of the T-cell compartment after bone marrow transplantation: restoration of the repertoire by thymic emigrants. *Blood*. 1998;92(11): 4464-4471.
- (28) Hochberg EP, Chillemi AC, Wu CJ, Neuberg D, Canning C, Hartman K, Alyea EP, Soiffer RJ, Kalams SA, and Ritz J. Quantitation of T-cell neogenesis in vivo after allogeneic bone marrow transplantation in adults. *Blood*. 2001;98(4): 1116-1121.
- (29) Combadière B, Blanc C, Li T, Carcelain G, Delaugerre C, Calvez V, Tubiana R, Debré P, Katlama C, Autran B. CD4<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup> lymphocytes in HIV-infected patients are effector T cells accumulated in the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. *Eur. J. Immunol*. 2000; 30 : 3598-3603
- (30) Sieg S, Harding C, Lederman M. HIV-1 infection impairs cell cycle progression of CD4<sup>+</sup> T cells without affecting early activation responses. *J. Clin. Invest*. 2001; 108(5) : 757-764
- (31) Hazenberg MD, Hamann D, Schuitemaker H, and Miedema F. T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4<sup>+</sup> T cells go out of stock. *Nat Immunol*. 2000;1(4): 285-289.

- (32) Meyaard L, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV infection: result of immune activation? *Curr Top Microbiol Immunol.* 1995;200:213-21
- (33) Muro-Cacho CA, Pantaleo G, Fauci AS. Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV infected persons: intensity of apoptosis correlates with general state of activation of the lymphoid tissue and not state of disease or viral burden. *J Immunol.* 1995; 154: 5555-66
- (34) Pantaleo G, Fauci AS. Apoptosis in HIV infection. *Nat Med.* 1995 Feb;1(2):118-20
- (35) von Boehmer H, The developmental biology of T lymphocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 1988, 6 : 309-326
- (36) Anderson G, Moore NC, Owen JJT, Jenkinson EJ, Cellular interaction in thymocyte development. *Ann. Rev. Immunol.* 1996, 14 : 73-99
- (37) Geginat J, Sallusto F, and Lanzavecchia A. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med.* 2001; 194 (12): 1711-1719.
- (38) Mackall CL, Granger L, Sheard Ma, Cepeda R and Gress RE. T cell regeneration after bone marrow transplantation : differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic depleted progeny. *Blood.* 1993; 82: 2585-2594
- (39) Hazenberg M, Verschuren M, Hamann D, Miedema F, van Dongen J. T cell receptor excision circle as markers for recent thymic emigrants : basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med.* 2001. 79 : 631-640
- (40) Kolte L, Strandberg C, Dreves AM, Ersboll AK, Jeppesen DL, Ryder LP, Nielsen SD. Thymic involvement in immune recovery during antiretroviral treatment of HIV infection in adults; comparison of CT and sonographic findings. *Scand J Infect Dis.* 2002;34(9):668-72.
- (41) Hazenberg MD, Otto SA, Cohen Stuart JWT, de Boer RJ, Miedema F. Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection. *Nat Med.* 2000 Sept;6(8):1036-42
- (42) Sempowski G, Haynes B. Immune Reconstitution in Patients with HIV-1 Infection. *Annu. Rev. Med.* 2002.53 : 269-84
- (43) Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Hayes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker JL, Koup RA. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature.* 1998. 396: 690-695
- (44) Markert ML, Alvarez-McLeod AP, Sempowski GD, Hale LP, Horvatinovich JM, Weinhold KJ, Bartlett JA, D'Amico TA, Haynes BF. Thymopoiesis in HIV-infected adults after highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001 Nov 20;17(17):1635-43
- (45) Douek DC, Koup RA, McFarland RD, Sullivan JL, Luzuriaga K. Effect of HIV on Thymic Function before and after Antiretroviral Therapy in Children. *J Infect Dis.* 2000 181:1479-82
- (46) Correa R, Munoz-Fernandez A. Effects of highly active antiretroviral therapy on thymical reconstitution of CD4 T lymphocytes in vertically HIV-infected children. *AIDS.* 2002 May 24;16(8):1181-3
- (47) Hazenberg M, Borghans J, de Boer R, Miedema F. Thymic output : a bad TREC record. *Nat. Immunol.* 2003. 4 (2) : 97-99
- (48) Hatzakis A, Touloumi G, Karanicolas R, Karafoulidou A, Mandalaki T, Anastassopoulou C, Zhang L, Goedert JJ, Ho DD, Kostrikis LG. Effect of recent thymic emigrants on progression of HIV-1 disease. *Lancet.* 2000 Feb 19;355(9204):599-604.

- (49) Zhang L, Lewin SR, Markowitz M, Lin HH, Skulsky E, Karanickolas R, He Y, Jin X, Tuttleton S, Vesanen M, Spiegel H, Kost R, van Lunzen J, Stellbrink HJ, Wolinsky S, Borkowsky W, Palumbo P, Kostrikis LG, Ho DD. Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. *J Exp Med*. 1999 Sep 6;190(5):725-32.
- (50) Steffens C, Smith K, Landay A, Shott S, Truckenbrod A, Russert M, Al-harhi L. T cell receptor excision circle (TREC) content following maximum HIV suppression is equivalent in HIV-infected and HIV-uninfected individuals. *AIDS*. 2001, 15: 1757-1764
- (51) Wolthers KC, Schuitemaker H, Miedema F. Rapid CD4+ T-cell turnover in HIV-1 infection: a paradigm revisited. *Immunol Today*. 1998 Jan;19(1):44-8
- (52) Lempicki R, Kovacs J, Baseler M, Adelsberger J, Dewar R, Natarajan V, Bosche M, Metcalf J, Stevens R, Lambert L, Alvord G, Polis M, Davey R, Dimitrov D, Lane C. Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5; 97(25): 13778-83
- (53) Fleury S, Rizzardi G, Chapuis A, Tambussi G, Knabenhans C, Simeoni E, Meuwly J-Y, Corpataux J-M, Lazzarin A, Miedema F, Pantaleo G. Long-term kinetics of T cell production in HIV-infected subjects treated with highly active antiretroviral therapy. *PNAS*. 2000 May 9; 97(10): 5393-5398
- (54) Hellerstein MK. Measurement of T-cell kinetics : recent methodologic advances. *Immunol Tod*. 1999;20(10): 438-441.
- (55) Sherr CJ, The Pezcoller Lecture : Cancer Cell Cycles Revisited. *Cancer Res*. 2000; 60 : 3689-3695
- (56) Nurse P, A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*. 2000; 100 : 71-78
- (57) Coqueret O, Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*. 2002; 299 : 35-55
- (58) Su B, and Karin M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of the gene expression. *Curr. Opinion Immunol*. 1996; 8: 402-411
- (59) Gross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM. Serine/Threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell Res*. 2000; 256 : 34-41
- (60) Terada Y, Nakashima O, Inoshita S, Kuwahara M, Sasahi S, Marumo F. Mitogen-activated protein kinase cascade and transcription factors: the opposite role of MKK3/6-p38 and MKK1-MAPK. *Nephrol. Dial. Transplant*. 1999; 14: 45-47
- (61) Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5350-4
- (62) Berk AJ, Sharp PA. Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell* 1977 Nov;12(3):721-32
- (63) Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*. 1992 Aug 14;257(5072):967-71
- (64) Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):484-7
- (65) Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet*. 1999 Jan;21(1 Suppl):33-7
- (66) Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*. 1999 Jan;21(1 Suppl):10-4

- (67) Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 8;95(25):14863-8
- (68) Tavazoie S, Hughes JD, Campbell MJ, Cho RJ, Church GM. Systematic determination of genetic network architecture. *Nat Genet*. 1999 Jul;22(3):281-5
- (69) DeRisi, J.L., Iyer, V.R. & Brown, P.O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*. 1997. 278: 680-686
- (70) Holstege FC, Jennings EG, Wyrick JJ, Lee TI, Hengartner CJ, Green MR, Golub TR, Lander ES, Young RA. Dissecting the regulatory circuitry of a eukaryotic genome. *Cell*. 1998 ; 95: 717-728
- (71) Roberts, C.J., Nelson, B., Marton, M.J., Stoughton, R.S., Meyer, M.R., Bennett, H.A., He, Y.D., Dai, H., Walker, W.L., Hughes, T.R., Tyers, M., Boone, C., and Friend, S.H. Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science*. 2000;287: 873-880
- (72) Cho RJ, Campbell MJ, Winzeler EA, Steinmetz L, Conway A, Wodicka L, Wolfsberg TG, Gabrielian AE, Landsman D, Lockhart DJ, Davis RW. A genome wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. *Mol. Cell*. 1998; 2: 65-73
- (73) Spellman, P.T. et al. Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol. Biol. Cell*. 1998; 9: 3273-3297
- (74) Chu S, DeRisi J, Eisen M, Mulholland J, Botstein D, Brown PO, Herskowitz I. The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 1998.282:699-705
- (75) Wen, X. et al. Large-scale temporal gene expression mapping of central nervous system development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998; 95: 334-339
- (76) Tamayo, P. et al. Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999; 96: 2907-2912
- (77) Debouck C, Goodfellow PN. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet*. 1999 Jan;21(1 Suppl):48-50
- (78) Natanson C, Hoffman WD, Suffredini AF, Eichacker PQ, Danner RL. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann. Intern. Med*. 1994. 120:771-83
- (79) Marton, M.J., DeRisi, J.L., Bennett, H.A., Iyer, V.R., Meyer, M.R., Roberts, C.J., Stoughton, R., Burchard, J., Slade, D., and Dai, H. et al. Drug target validation and identification of secondary drug target effects using DNA microarrays. *Nat. Med*. 1998; 4:1293-1301
- (80) Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997. 94:2150-55
- (81) Kumar A, Harrison PM, Cheung KH, Lan N, Echols N, Bertone P, Miller P, Gerstein MB, Snyder M. An integrated approach for finding overlooked genes in yeast. *Nat Biotechnol*. 2002 Jan 1;20(1):58-63
- (82) Hughes TR, Marton MJ, Jones AR, Roberts CJ, Stoughton R, Armour CD, Bennett HA, Coffey E, Dai H, He YD, Kidd MJ, King AM, Meyer MR, Slade D, Lum PY, Stepaniants SB, Shoemaker DD, Gachotte D, Chakraburttty K, Simon J, Bard M, Friend SH. Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell*. 2000 Jul 7;102(1):109-26
- (83) Brown MP, Grundy WN, Lin D, Cristianini N, Sugnet CW, Furey TS, Ares M Jr, Haussler D. Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jan 4;97(1):262-7



- (84) Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74
- (85) West M, Blanchette C, Dressman H, Huang E, Ishida S, Spang R, Zuzan H, Olson JA Jr, Marks JR, Nevins JR. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 25;98(20):11462-7
- (86) DeRisi J, Penland L, Brown PO, Bittner ML, Meltzer PS, Ray M, Chen Y, Su YA, Trent JM. Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat. Genet.* 1996;14:457-60
- (87) Neiman PE, Ruddell A, Jasoni C, Loring G, Thomas SJ, Brandvold KA, Lee Rm, Burnside J, Delrow J. Analysis of gene expression during myc oncogene-induced lymphomagenesis in the bursa of Fabricius. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 May 22;98(11):6378-83
- (88) Li S, Ross DT, Kadin ME, Brown PO, Wasik MA. Comparative genome-scale analysis of gene expression profiles in T cell lymphoma cells during malignant progression using a complementary DNA microarray. *Am J Pathol.* 2001 Apr;158(4):1231-7
- (89) Alizadeh A, Eisen M, Davis RE, Ma C, Sabet H, Tran T, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore DT, Hudson JR Jr, Chan WC, Greiner T, Weisenburger D, Armitage JO, Lossos I, Levy R, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. The lymphochip: a specialized cDNA microarray for the genomic-scale analysis of gene expression in normal and malignant lymphocytes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1999;64:71-8
- (90) Staudt L et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell.* 2003 Feb;3: 185-197
- (91) Shaffer AL, Rosenwald A, Hurt EM, Giltneane JM, Lam LT, Pickeral OK, Staudt LM. Signatures of the immune response. *Immunity.* 2001 Sep;15(3):375-85
- (92) Staudt LM, Brown PO. Genomic views of the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:829-59
- (93) Shaffer AL, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity.* 2000 Aug;13(2):199-212
- (94) Calame KL. Plasma cells: finding new light at the end of B cell development. *Nat Immunol.* 2001 Dec;2(12):1103-8
- (95) Feske S, Giltneane J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A. Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2001 Apr;2(4):316-24.
- (96) Arendt CW, Littman DR. HIV: master of the host cell. *Genome Biol.* 2001;2(11):reviews1030.1-1030.4
- (97) Simmen KA, Singh J, Luukkonen BG, Lopper M, Bittner A, Miller NE, Jackson MR, Compton T, Fruh K. Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7140-5
- (98) Geiss GK, Bumgarner RE, An MC, Agy MB, van 't Wout AB, Hammersmark E, Carter VS, Upchurch D, Mullins JJ, Katze MG. Large-scale monitoring of host cell gene expression during HIV-1 infection using cDNA microarrays. *Virology.* 2000 Jan 5;266(1):8-16
- (99) Corbeil J, Sheeter D, Genini D, Rought S, Leoni L, Du P, Ferguson M, Masys DR, Welsh JB, Fink JL, Sasik R, Huang D, Drenkow J, Richman DD, Gingeras T. Temporal gene regulation during HIV-1 infection of human CD4+ T cells. *Genome Res.* 2001 Jul;11(7):1198-204

(100) Su L, Kaneshima H, Bonyhadi M, Salimi S, Kraft D, Rabin L, McCune JM. HIV-1-induced thymocyte depletion is associated with indirect cytopathogenicity and infection of progenitor cells in vivo. *Immunity*. 1995 Jan;2(1):25-36

## INDEX

<b>ADNc</b>	(complémentaire) Obtenu après transcription inverse d'un ARNm. Ne contient que des séquences codantes	<b>Complexe du TCR</b>	Récepteur des cellules T, se compose d'un hétérodimère de reconnaissance de l'antigène lié au CMH : $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ et d'un complexe de polypeptides : CD3, impliqué dans la transduction du signal
<b>Anergie</b>	Forme potentiellement réversible de tolérance immunologique, où les lymphocytes ne répondent plus à la stimulation antigénique, par exemple lors de reconnaissance d'un antigène sans présence de signaux de costimulation	<b>CTL</b>	( <i>cytotoxic T lymphocyte</i> ) Porte en général le CD8 et tue les cellules cibles après reconnaissance de peptides liés au CMH de classe I sur leur membrane cellulaire
<b>Antigène CD</b>	Protéines de surface, classées selon leur groupe de différenciation ( <i>cluster of differentiation, CD</i> ). Un numéro CD leur est assigné sur la base de leur réactivité à différents anti-corps monoclonaux	<b>Cytokine</b>	Protéines solubles de bas poids moléculaires régulant l'activité cellulaire au sein du système immunitaire.
<b>APC</b>	( <i>antigen presenting cell</i> ) Cellule portant le CMH de classe II et pouvant apprêter et présenter des antigènes internalisés aux cellules du système immunitaire, en principe aux cellules auxiliaires	<b>FDC</b>	( <i>follicular dendritic cell</i> ) (cellule dendritique folliculaire) Lie les complexes immuns (anti-corps et antigène) et les présente aux lymphocytes dans les ganglions lymphatiques
<b>Apoptose</b>	Forme de mort cellulaire comprenant une dégradation enzymatique de l'ADN et, contrairement à la nécrose, sans signes inflammatoires	<b>Signal de costimulation</b>	Signal pour l'activation d'un lymphocyte en supplément à celui transmis par le récepteur à antigène. Souvent présents à la surface des APC (lymphocytes B, macrophages, cellules dendritiques)
<b>ARNm</b>	( <i>messenger</i> ) Obtenu après transcription de l'ADN génomique et élimination des séquences non-codantes. Il sera traduit en protéines par le ribosome	<b>Répertoire</b>	Désigne les antigènes pouvant être reconnus par l'ensemble des récepteurs des lymphocytes d'un individu, cette diversité est obtenue par réarrangement des gènes des récepteurs durant la maturation des lymphocytes
<b>Cellule effectrice</b>	Lymphocyte activé par la reconnaissance d'un antigène, ce qui induit une prolifération clonale des cellules antigène-spécifiques et la production d'effecteurs (immunoglobulines, cytokines, enzymes...). Suite à la destruction de l'antigène, elle peut acquérir un phénotype mémoire, retourner à l'état naïf ou subir l'apoptose	<b>Tc</b>	( <i>cytotoxic</i> ) (lymphocyte T CD8) Lymphocyte T reconnaissant les antigènes liés au CMH de classe I. Il s'agit d'antigènes provenant de l'intérieur de la cellule lors d'infection par un agent pathogène. Ceci induit le relargage de perforine et de granzyme, responsables de la lyse des cellules infectées et de chimiokines inhibant la réplication virale.
<b>Cellule mémoire</b>	Lymphocyte T ou B ayant mémorisé un antigène et pouvant monter une réponse secondaire plus puissante lors d'une nouvelle rencontre avec cet antigène	<b>Th</b>	( <i>helper</i> ) (lymphocyte T CD4) Lymphocyte T reconnaissant les antigènes liés au CMH de classe II, ayant un rôle auxiliaire et régulateur. Produit des cytokines qui influencent l'immunité cellulaire (activation et prolifération des macrophages, NK et lymphocytes Tc) et humorale (maturation et prolifération des lymphocytes B).
<b>Cellule naïve</b>	Désigne l'état d'une cellule du système immunitaire avant la rencontre de l'antigène	<b>TREC</b>	( <i>T cell receptor excision circle</i> ) fragment obtenu lors du réarrangement des gènes du récepteur des cellules T dans le thymus
<b>CMH</b>	(complexe majeur d'histocompatibilité) Complexe protéinique à la surface de toutes les cellules nucléées (classe I) ou des cellules du système immunitaire (classe II), spécifique à chaque individu, reconnu par les complexes TCR des cellules T	<b>Thymocytes</b>	Lymphocytes thymiques, durant leur maturation dans le thymus, par interaction avec les APC, ils vont former le répertoire T tout en permettant l'élimination des cellules autoréactives. Un grand nombre de cellules mourront par apoptose au cours de la sélection.

## LISTE COMPLÈTE DES GÈNES CONTENUS SUR LA *ATLAS™ CDNA* *EXPRESSION CELL CYCLE ARRAY*

NUMERO	NOM DU GENE
1	ubiquitin C
2	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
3	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)
4	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
5	tubulin, alpha, ubiquitous
6	major histocompatibility complex, class I, C
7	actin, beta
8	ribosomal protein L13a
9	ribosomal protein S9
10	cyclin A2
11	cyclin B1
12	cyclin C
13	cyclin D1 (PRAD1: parathyroid adenomatosis 1)
14	cyclin D2
15	cyclin D3
16	cyclin E1
17	cyclin G1
18	cyclin G2
19	cyclin H
20	cyclin I
21	proliferating cell nuclear antigen
22	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
23	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)
24	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)
25	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 2 (p39)
26	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)
27	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
28	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)
29	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M
30	cyclin-dependent kinase 2
31	junction plakoglobin
32	cyclin-dependent kinase 4
33	cyclin-dependent kinase 5
34	cyclin-dependent kinase 6
35	cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, <i>Xenopus laevis</i> , cdk-activating kinase)
36	cyclin-dependent kinase 8
37	WEE1 homolog ( <i>S. pombe</i> )
38	CDC-like kinase 1
39	CDC-like kinase 2
40	CDC-like kinase 3
41	PCTAIRE protein kinase 3

- 42 cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)
- 43 cyclin-dependent kinase-like 1 (CDC2-related kinase)
- 44 p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1 (STE20 homolog, yeast)
- 45 PCTAIRE protein kinase 1
- 46 PCTAIRE protein kinase 2
- 47 polo-like kinase (Drosophila)
- 48 cyclin-dependent kinase (CDC2-like) 10
- 49 cell division cycle 2-like 5 (cholinesterase-related cell division controller)
- 50 cell division cycle 25A
- 51 cell division cycle 25B
- 52 cell division cycle 25C
- 53 replication factor C (activator 1) 5, 36.5kDa
- 54 replication factor C (activator 1) 4, 37kDa
- 55 replication factor C (activator 1) 3, 38kDa
- 56 replication factor C (activator 1) 2, 40kDa
- 57 cell division cycle 34
- 58 CDC6 cell division cycle 6 homolog (*S. cerevisiae*)
- 59 CDC10 cell division cycle 10 homolog (*S. cerevisiae*)
- 60 CDC16 cell division cycle 16 homolog (*S. cerevisiae*)
- 61 cell division cycle 27
- 62 CDC37 cell division cycle 37 homolog (*S. cerevisiae*)
- 63 E2F transcription factor 1
- 64 E2F transcription factor 3
- 65 E2F transcription factor 5, p130-binding
- 66 transcription factor Dp-1
- 67 transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)
- 68 retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)
- 69 retinoblastoma-like 2 (p130)
- 70 retinoblastoma binding protein 4
- 71 retinoblastoma binding protein 1
- 72 retinoblastoma binding protein 2
- 73 retinoblastoma binding protein 6
- 74 retinoblastoma binding protein 5
- 75 tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
- 76 cell growth regulatory with ring finger domain
- 77 Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)
- 78 Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 4, p53 binding protein (mouse)
- 79 tumor protein p73
- 80 DNA-damage-inducible transcript 3
- 81 growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
- 82 inhibitor of growth family, member 1
- 83 growth arrest-specific 1
- 84 jun B proto-oncogene
- 85 v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)
- 86 prefoldin 5
- 87 mitogen-activated protein kinase kinase 1
- 88 mitogen-activated protein kinase kinase 2
- 89 mitogen-activated protein kinase kinase 5
- 90 mitogen-activated protein kinase kinase 6
- 91 mitogen-activated protein kinase 3
- 92 mitogen-activated protein kinase 6
- 93 mitogen-activated protein kinase 4

94	mitogen-activated protein kinase 7
95	mitogen-activated protein kinase 12
96	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3
97	mitogen-activated protein kinase 14
98	mitogen-activated protein kinase 11
99	mitogen-activated protein kinase 8
100	mitogen-activated protein kinase 9
101	mitogen-activated protein kinase 10
102	growth factor receptor-bound protein 2
103	growth factor receptor-bound protein 10
104	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
105	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
106	Rho GTPase activating protein 1
107	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)
108	p21 (CDKN1A)-activated kinase 2
109	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)
110	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
111	glycogen synthase kinase 3 alpha
112	abl-interactor 2
113	ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)
114	FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1
115	ubiquitin-conjugating enzyme E2A (RAD6 homolog)
116	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 5
117	replication protein A1, 70kDa
118	superoxide dismutase 1, soluble (amyotrophic lateral sclerosis 1 (adult))
119	purine-rich element binding protein A
120	RAD23 homolog A (S. cerevisiae)

En tout 111 gènes relatifs au cycle cellulaire et 9 contrôles positifs (« housekeeping genes »)