

50376
1992
186

65 668

50376
1992
186

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE

LILLE FLANDRES-ARTOIS

N° d'ordre 923

N° d'ordre:

**THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA
SANTÉ**

Option: IMMUNOLOGIE

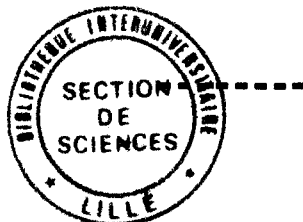
présentée par

DIDIER MONTE

LA LIGNEE MEGACARYOCYTAIRE DAMI:

DU RECEPTEUR POUR L'IFN- γ

A L'INFECTION PAR LE VIH-1



Soutenue le 10 juin 1992 devant la commission d'examen:

Président: Pr Maurice PORCHET

Rapporteurs: Dr Françoise BARRE-SINOUSI

Dr Juana WIETZERBIN

Examineurs: Pr André CAPRON

Dr Jean-Claude AMEISEN

Dr Claude AURIAULT



Ce travail a été réalisé au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (URA INSERM 167-CNRS 624) de l'Institut Pasteur de Lille, sous la direction du Pr André Capron.

Je tiens à remercier très vivement:

Monsieur le Pr André Capron, qui m'a accueilli et a permis la réalisation de ce travail.

Monsieur le Pr Maurice Porchet pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Monsieur le Dr Claude Auriault pour son soutien et son amitié sans condition.

Monsieur le Dr Jean-Claude Ameisen pour ses conseils avisés et son amitié de tous les jours.

Madame le Dr Juana Wietzerbin pour l'aide et les conseils que vous m'avez apportés dans la réalisation de ce travail.

Madame le Dr Françoise Barré-Sinoussi pour avoir accepté de juger l'ensemble de ce travail.

Je tiens également à remercier très vivement:

**Toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail
ou qui m'ont accordé leur amitié.**

A mes parents,

PLAN

-RESUME DE L'ENSEMBLE DES TRAVAUX.....	page 9
-SITUATION DU MODELE D'ETUDE.....	page 11
I. RAPPEL SUR L'HEMATOPOIESE.....	page 13
II. LA MEGACARYOCYTOPOIESE ET LA LIGNEE DAMI.....	page 14
-L'IFN- γ ET SON RECEPTEUR.....	page 16
I. L'INTERFERON- γ	page 19
A. Caractéristiques.....	page 19
B. Effets biologiques.....	page 19
1. Effets antiviraux.....	page 19
2. Modulation de l'expression des antigènes du CMH.....	page 21
3. Intervention de l'IFN- γ dans la prolifération et la différenciation cellulaires.....	page 22
4. Intervention de l'IFN- γ dans les mécanismes de défense.....	page 22
5. Intervention de l'IFN- γ dans la synthèse des cytokines et/ou de leurs récepteurs.....	page 23
6. Action sur les cellules de la moelle osseuse.....	page 24
II. LE RECEPTEUR POUR L'IFN- γ	page 25
A. Structure.....	page 25
B. Transduction du signal.....	page 27
1. Structure fonctionnelle.....	page 27
2. Effets précoces de la fixation de l'IFN- γ sur son récepteur.....	page 30
3. Existence de récepteurs nucléaires pour l'IFN- γ	page 30
4. Déclenchement de la réponse par des interactions protéine protéine.....	page 31
C. Modulation de l'expression du récepteur pour l'IFN- γ	page 31
1. Effets du ligand.....	page 32
2. Effets du PMA.....	page 32

3. Effets d'autres cytokines.....	page 32
D. Conclusions.....	page 33
-RESUME/CONCLUSIONS DE L'ARTICLE N°1.....	page 35
-ARTICLE N°1.....	page 38
-VIH ET SIDA	page 47
I. LE VIRUS.....	page 49
A. Classification.....	page 49
B. Structure.....	page 51
C. Organisation du génome de VIH.....	page 51
1. Gènes de structure.....	page 51
2. Protéines régulatrices.....	page 55
II. LE CYCLE DU VIRUS.....	page 56
A. Pénétration dans les cellules.....	page 56
1. Intervention du CD4.....	page 56
2. Autres modes de pénétration.....	page 58
B. Synthèse du provirus.....	page 58
C. Intégration.....	page 59
D. Transcription et traduction.....	page 59
1. Structure du promoteur.....	page 60
2. Rôle des facteurs de transcription cellulaire.....	page 60
3. Synthèse des ARN viraux.....	page 64
4. Rôle de la protéine Tat.....	page 66
5. Rôle de la protéine Rev.....	page 68
E. Assemblage.....	page 69
F. Activation du VIH.....	page 70
1. Facteurs influençant la production de virus.....	page 70
a. Les cytokines.....	page 70
b. Virus et bactéries.....	page 73
c. Les stress.....	page 73
III. CONSEQUENCES DE L'INFECTION DE L'ORGANISME PAR LE VIH page 73
A. Infection et atteinte des lymphocytes T CD4.....	page 74
1. Destruction par le virus.....	page 74
2. Autres possibilités.....	page 75
B. Infection des monocytes et des macrophages.....	page 75
C. Autres cellules infectées par le VIH.....	page 76
D. Infection des cellules de la moelle osseuse.....	page 76
IV. CONCLUSIONS.....	page 78
-RESUME/CONCLUSIONS DES ARTICLES N°2 ET N°3.....	page 80

-ARTICLE N°2.....	page 83
-ARTICLE N°3.....	page 115
-BIBLIOGRAPHIE.....	page 137
-CONCLUSIONS.....	page 153
-LISTE DE PUBLICATIONS.....	page 155

RESUME

Les fonctions et la maturation des cellules de la lignée plaquettaire sont sous la dépendance de nombreuses cytokines. Pour cette étude, nous avons utilisé une lignée tumorale d'origine mégacaryocytaire: la lignée Dami.

Nous avons pu caractériser un récepteur pour l'interféron gamma (IFN) sur ces cellules. Ce récepteur est le même que celui présent sur les autres types cellulaires. Son expression n'est pas affectée par le ligand, ni par le phorbol myristate acétate (PMA). Ce récepteur est fonctionnel puisque l'on observe la modulation de l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) après action de l'IFN.

Nous avons ensuite exploré l'infectabilité des Dami par le VIH-1, le rétrovirus responsable du SIDA. En dépit d'une faible expression du CD4 (le récepteur du virus), les Dami produisent une grande quantité de virions sans modification importante de leur métabolisme, et la réplication virale est modulable par des cytokines qui jouent un rôle dans la mégacaryocytopoïèse. En effet, les interférons alpha et gamma inhibent la production du virus alors que le Tumor Necrosis Factor alpha (TNF) et le Transforming Growth Factor bêta (TGF) augmentent fortement la quantité d'ARN et de protéines virales produites. Bien que ces deux cytokines induisent des effets similaires, leurs modes d'action sont différents. Le TNF active directement le promoteur du virus (LTR 5') par l'intermédiaire du facteur de transcription NF- κ B. Le TGF quant à lui n'exerce pas d'effet direct sur le promoteur et nécessite la présence de tout ou partie du génome viral en aval du LTR 5' pour agir. L'action du TGF semble néanmoins très proche de la transcription puisque cette cytokine provoque une accumulation importante d'ARN viraux.

Nos résultats démontrent l'existence d'un récepteur pour l'IFN-gamma sur des cellules d'origine mégacaryocytaire. D'autre-part, comme dans les monocytes et les lymphocytes, la réplication du VIH-1 est modulable dans les cellules d'origine mégacaryocytaire par des médiateurs du système immunitaire. Dans les lymphocytes ou les monocytes, l'augmentation de la production de virus a été décrite par des mécanismes transcriptionnels directs (cas du TNF et de l'IL1) et post-transcriptionnels (cas de l'IL6). Notre étude montre que le TGF, quant à lui fait appel à un nouveau mode de régulation de la réplication virale.

SITUATION DU MODELE D'ETUDE

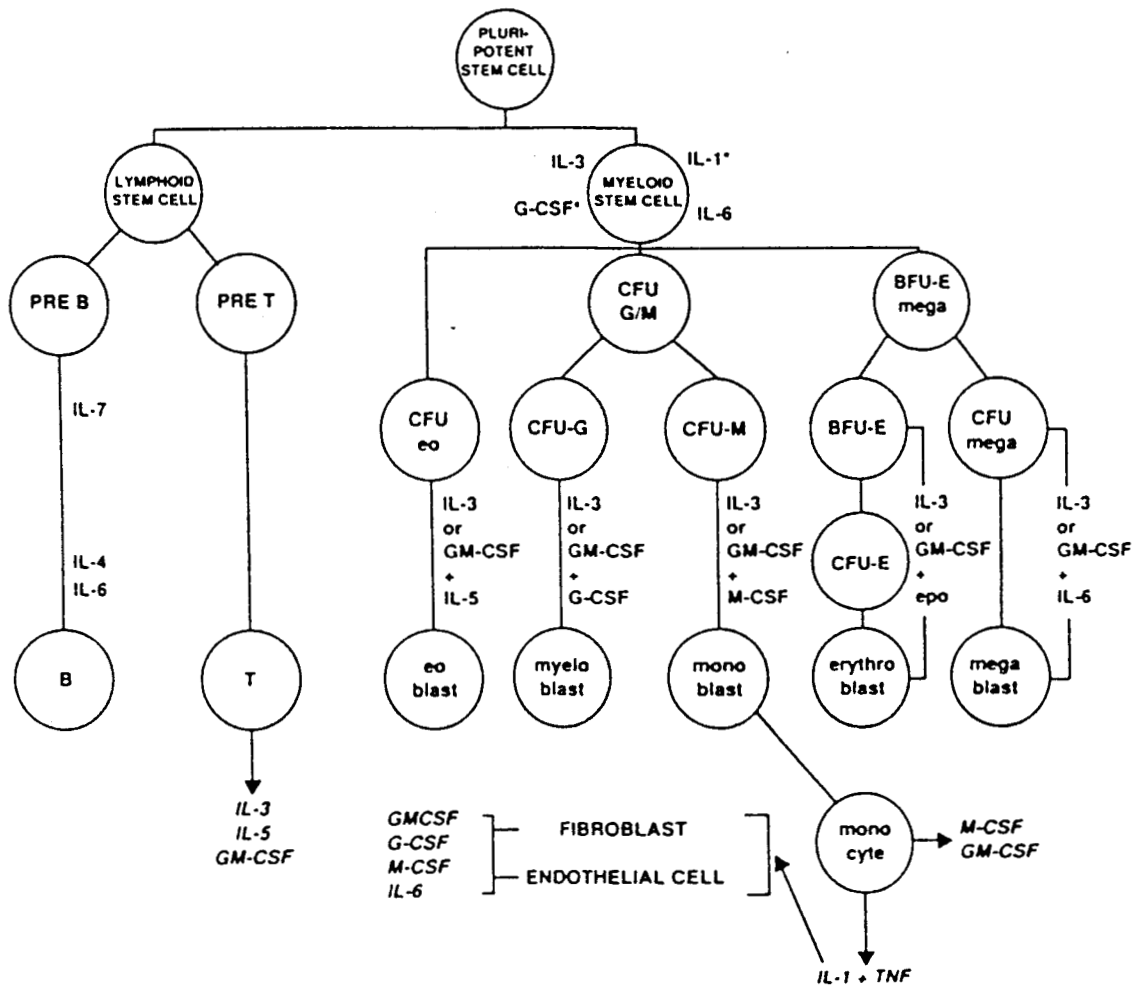


Schéma représentant la différenciation des différents progéniteurs hématopoïétiques à partir d'une cellule souche, les facteurs de croissance nécessaires à la prolifération des cellules sont indiqués. D'après Nathan *Seminars in hematology* 28:114, 1991.

I. RAPPELS SUR L'HEMATOPOIESE (cf schéma)

Les cellules matures qui peuplent les organes hématopoïétiques et circulent dans le sang, sont issues de la multiplication et de la maturation d'une petite population de cellules souches pluripotentes que l'on trouve dans la moelle osseuse des mammifères. Seule une petite partie d'entre-elles prolifèrent et se différencient pour compenser la mort des cellules matures de chaque lignée hématologique.⁽¹⁾

Divers stades de différenciation des cellules souches ont été caractérisés *in vitro* :

- les progéniteurs pluripotents des séries granulocytaires, érythrocytaires, monocytaires et mégacaryocytaires (CFU-GEMM) (Colony Forming Unit)
- les progéniteurs spécifiques d'une série (CFU-E, CFU-GM, CFU-MK)

Ces cellules ne peuvent survivre, proliférer et se différencier qu'en présence de facteurs de croissance plus ou moins spécifiques, qui provoquent *in vitro* la formation de colonies contenant un grand nombre de cellules matures et sont appelés "Colony Stimulating Factor" ou CSFs. Leur activité englobe la prolifération, l'induction de la différenciation terminale et la survie des cellules. Certains de ces CSFs sont relativement spécifiques d'une série (Macrophage CSF ou M-CSF et Granulocyte CSF ou G-CSF), d'autres par contre agissent sur toutes les séries (Granulocyte Monocyte CSF ou GM-CSF et IL3 ou multi-CSF). Des cytokines, telles que l'IL5 (CSF des éosinophiles), l'IL2 (nécessaire à la

maturation et à la prolifération des lymphocytes), l'érythropoïétine ou Epo (CSF des érythrocytes) peuvent également être rattachées à la famille des CSFs.

L'action des CSFs est par ailleurs modulable par d'autres médiateurs (IL1, IL4, IL6, IFNs, TGF, PF4, MIP).

In vivo, l'ensemble de ces interactions s'opère en présence des cellules du stroma de la moelle, qui jouent un rôle très important en contrôlant les effets de ces diverses cytokines.

II. LA MEGACARYOCYTOPOIESE ET LA LIGNEE DAMI

Les plaquettes sont l'aboutissement de la mégacaryocytopoïèse qui à partir d'une cellule souche permet d'obtenir un grand nombre de mégacaryocytes matures qui se fragmenteront en une multitude de plaquettes.⁽²⁾ Ces diverses étapes sont sous le contrôle en particulier de l'IL3, du GMCSF, de l'Epo, du "Thrombopoïesis Stimulating Factor" (TSF) et de la "Megakaryocyte Colony Stimulating Activity" (Meg-CSA) ainsi que de l'IL1, de l'IL4, de l'IL6, des IFNs, du TNF et du TGF- β .⁽²⁾

Ces données ont été obtenues grâce à l'utilisation de progéniteurs mégacaryocytaires issus de la moelle de sujets sains ou atteints de leucémie. Cependant, le mode d'obtention et la difficulté de cultiver ces cellules limitent l'étude des mécanismes intimes intervenant dans leur maturation. Pour palier ce problème, divers laboratoires se sont lancés dans l'établissement de lignées d'origine tumorale possédant des marqueurs mégacaryocytaires. Ces travaux ont abouti à la caractérisation de plusieurs lignées à partir des cellules de patients

souffrant de leucémie à granulocytes ou à mégacaryocytes (AML7). Ces cellules appartiennent toutes au stade mégacaryoblaste (entre le stade CFU-MK et le stade mégacaryocyte mature) et expriment les glycoprotéines plaquettaires Ib, IIb et IIIa. Bien qu'un certain degré de différenciation de ces lignées soit inductible par le phorbol myristate acétate (PMA), aucune ne peut produire de plaquettes. Ce dernier point représente sûrement leur principal défaut.⁽²⁾

La lignée Dami,⁽³⁾ caractérisée par l'équipe de SM Greenberg *et al* à Boston est avec la lignée MEG 01,⁽⁴⁾ l'une des lignées mégacaryocytaires qui a été le plus étudiée à ce jour. Ces travaux ont mis en évidence une homologie de réponse des Dami avec les mégacaryocytes en ce qui concerne notamment l'IL3, l'IL6, l'Epo, le TSF et le TGF- β .^(5,6)

L'ensemble de ces travaux indique que les lignées mégacaryocytaires et en particulier la lignée Dami peuvent servir à la dissection des mécanismes moléculaires de phénomènes observés sur les mégacaryocytes et/ou leurs progéniteurs.

L'IFN- γ ET SON RECEPTEUR

L'étude des propriétés antivirales de certaines glycoprotéines de mammifères a permis la découverte de trois sortes d'interférons (IFNs) (Table 1):⁽⁸⁾

- les IFN- α , d'origine leucocytaire, issus d'une famille multigénique et présentant 80% d'homologie entre-eux;
- l'IFN- β , d'origine fibroblastique, homologue à 30% avec les IFN- α ;
- l'IFN- γ , d'origine lymphocytaire, connu sous 2 formes (20 et 25 kDa) issues de la glycosylation différente du produit d'un gène unique.

En dépit d'une faible homologie entre-eux et d'une grande spécificité d'espèce, les IFNs induisent globalement les mêmes effets immunomodulateurs, antiprolifératifs, et différenciateurs quelque soit l'espèce animale considérée.⁽⁹⁾ Ces effets dépendent en particulier de la modulation de l'expression de certains gènes,^(10,11) qui ne sont pas exactement les mêmes selon le type d'IFN.⁽¹²⁾

Comme de nombreux autres médiateurs (hormones, cytokines), les IFNs doivent se fixer à un récepteur (Rc) membranaire de forte affinité pour déclencher une réponse biologique. Les IFNs de type I (IFN- α et IFN- β) se fixent sur le même récepteur (Rc de type I) bien que des molécules accessoires semblent nécessaires à la fixation de l'IFN- β .⁽¹³⁻¹⁵⁾ L'IFN- γ quant à lui possède son propre Rc (Rc de type II).^(13,15-17)

Ces 2 types de récepteurs ne présentent pas d'homologie de séquence particulière mais la conservation de certains motifs structuraux a permis leur regroupement avec le facteur tissulaire au sein de la famille des récepteurs hématopoïétiques de type II, qui présente des homologies structurales avec la famille des récepteurs hématopoïétiques de type I composée des Rc pour l'IL2,

CLASSE	IFN-ALPHA	IFN-BETA	IFN-GAMMA
TYPE	I	I	II
ORIGINE	LEUCOCYTES	FIBROBLASTES	CELLULES T
STABLE A pH2	+	+	-
NOMBRE	>15	1	1
GLYCOSYLATION	+/-	+	+
INTRONS	-	-	+
LOCALISATION CHROMOSOMIQUE	9	9	12

Table 1: Principales propriétés des IFNs.

l'IL3, l'IL4, l'IL5, l'IL6, l'IL7, le G-CSF et le GM-CSF.⁽¹⁸⁾ (Figure 1)

I. L'INTERFERON- γ .

Cette cytokine est exclusivement produite par les lymphocytes T (CD4 ou CD8) et les "large granular lymphocyte" (LGL) en réponse à l'antigène, aux mitogènes ou à d'autres cytokines. Son origine et ses fonctions immunes en font une véritable lymphokine.⁽¹⁹⁾

A. *Caractéristiques*

L'IFN- γ existe sous 2 formes : 20 et 25 kDa, qui sont la conséquence de 2 types de N-glycosylation d'un même "core" protéique de 17 kDa (127 à 134 AA). La molécule recombinante (*E coli*) étant totalement fonctionnelle, les glycanes ne semblent donc pas exercer de fonctions biologiques majeures.⁽²⁰⁾

Chez l'homme, le gène de l'IFN- γ situé sur le chromosome 12 (q24.1) comporte 3 introns et 4 exons. Son ARN messager (ARNm) a une taille de 1,3 kb et code une protéine de 166 AA.⁽²⁰⁾

B. *Effets biologiques de l'interféron- γ .*

1-Effets antiviraux

A la différence des IFNs de type I, l'action antivirale de l'IFN- γ est limitée. Sa fixation déclenche la synthèse de la 2', 5' oligoadénylate synthétase qui est

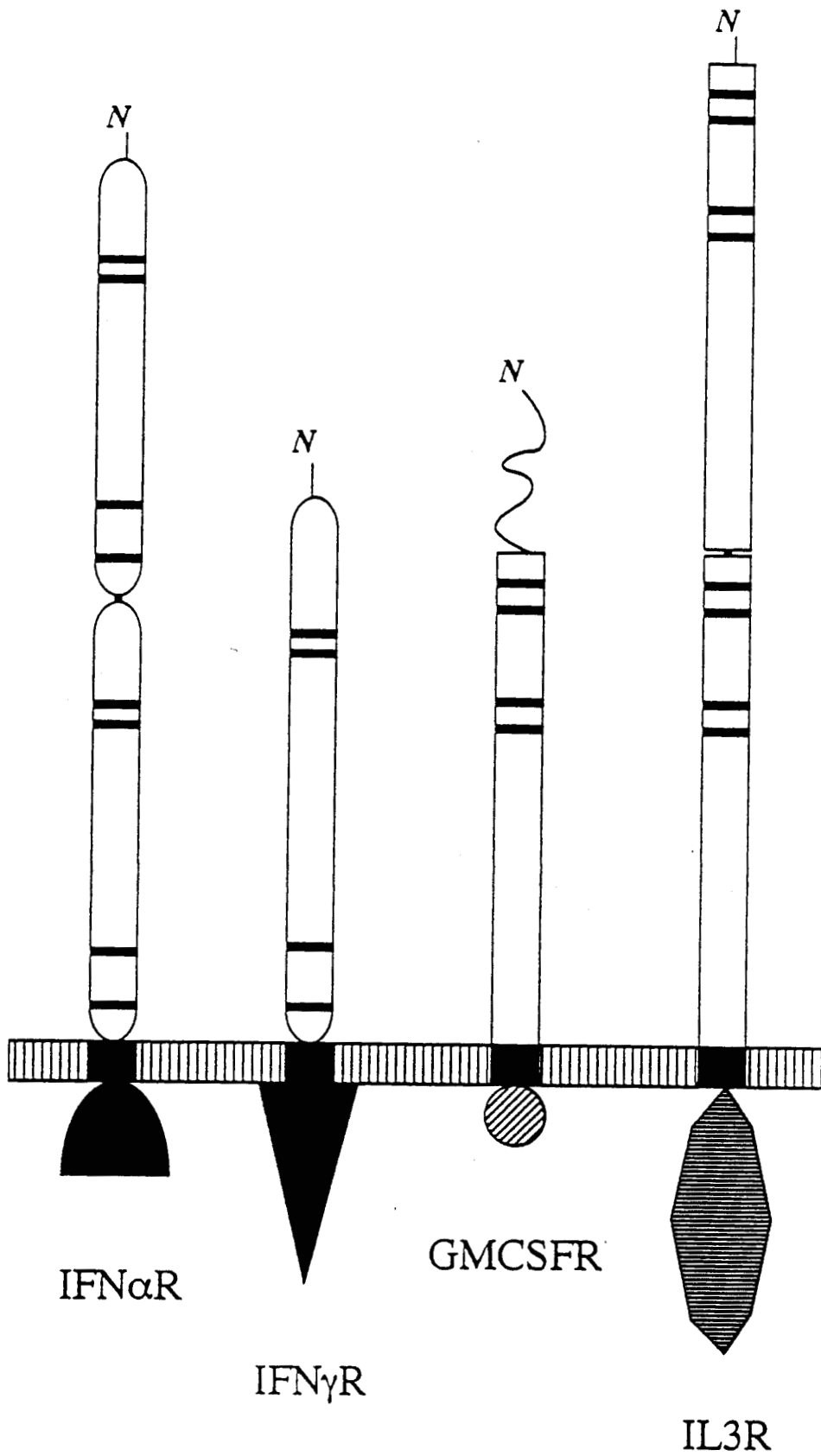


Figure 1: Structure du Rc pour l'IFN- γ et comparaison avec les récepteurs appartenant à la famille des récepteurs hématopoïétiques de type I et II.

ensuite rendue fonctionnelle par la présence d'ARN bicaténaire. Elle produit alors des oligonucléotides 2', 5' d'ATP qui sont de puissants activateurs de la Rnase L. Celle-ci, en dégradant les ARNs viraux et cellulaires, participe à la baisse de synthèse de virus.⁽²¹⁾

On observe également une modification de l'assemblage et de la libération des virions, vraisemblablement due à une modification du cytosquelette et de la membrane cytoplasmique.⁽²²⁾

2-Modulation de l'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

L'IFN- γ augmente, restaure ou induit la synthèse des produits de classe I et II du CMH sur la plupart des cellules (tumoraux ou non). Ces molécules sont essentielles à la présentation des antigènes étrangers aux lymphocytes T CD4 (Classe II) et CD8 (Classe I). L'IFN- γ provoque donc une augmentation des capacités de présentation des antigènes par l'organisme. L'expression de molécules de classe II sur des cellules ne les exprimant pas normalement (fibroblastes de la peau) pourrait intervenir dans les processus inflammatoires locaux . Par exemple, l'augmentation de la présence de molécules de classe I sur les cellules tumorales ou infectées par un virus est susceptible de faciliter leur élimination par les lymphocytes cytotoxiques .^(20,23)

Cependant, l'expansion des capacités de présentation des antigènes à de nombreux types cellulaires peut conduire dans des situations pathologiques à la présentation d'antigènes du soi et donc à un processus auto-immun.⁽²³⁾

3-Intervention de l'IFN- γ dans la prolifération et la différenciation cellulaire

En présence d'IFN- γ , certaines cellules normales ou tumorales perdent leur capacité de prolifération. Ce phénomène n'est pas la conséquence d'un arrêt brutal de la production d'ARNs ou de protéines mais fait intervenir la modulation sélective d'un nombre restreint de gènes, parmi lesquels certains oncogènes (*c-myc* par exemple). Le mécanisme intime de cet arrêt de prolifération reste à définir et s'apparente dans un certain nombre de cas à une différenciation.(20,24,25)

Une partie des cellules myéloïdes issues de la moelle de sujets sains ou leucémiques subissent ce phénomène. En présence d'IFN- γ , on observe simultanément un arrêt de la prolifération et une apparition de marqueurs de différenciation monocyttaire.(20)

Cette lymphokine est également un facteur de maturation des lymphocytes T cytotoxiques (CTL), des cellules NK et des lymphocytes B dont il module la commutation isotypique et la production d'immunoglobulines.(24)

4-Intervention de l'IFN- γ dans les mécanismes de défense

Ces fonctions peuvent résulter de mécanismes dépendants ou non d'anticorps.

- Anticorps dépendants:

L'augmentation (monocytes) et l'induction (neutrophiles) de la synthèse du récepteur de forte affinité pour le fragment Fc des immunoglobulines (Fc- γ R1) favorisent les mécanismes de cytotoxicité cellulaire dépendants

d'anticorps (ADCC), ainsi que la destruction de microorganismes recouverts d'anticorps (Ac) spécifiques (opsonisation).⁽²⁰⁾

- Anticorps indépendants:

L'IFN- γ provoque:

- l'augmentation de l'activité cytotoxique des cellules NK et des CTL;⁽²⁶⁾
- l'induction des fonctions effectrices antiparasitaires des plaquettes sanguines et des macrophages;⁽²⁷⁾
- l'augmentation du métabolisme radicalaire des monocytes et des neutrophiles, contribuant ainsi à la destruction d'un certain nombre de parasites (toxoplasme, leishmanie, plasmodium) et de bactéries;⁽²⁸⁻³¹⁾
- l'augmentation de la synthèse de TNF- α par les monocytes et l'accroissement des effets cytotoxiques de cette cytokine au niveau des cellules tumorales et des parasites.^(32,33)

5. Intervention dans la synthèse de cytokines et/ou de leurs récepteurs

L'IFN- γ , seul ou en association (avec le TNF ou le LPS par exemple) induit ou augmente la synthèse d'un certain nombre de cytokines (IL1, IL6, TNF, molécules de la famille du PF4) intervenant dans la réponse immune et les réactions inflammatoires.⁽³³⁻³⁵⁾ Par ailleurs, l'IFN- γ module l'expression du récepteur de certaines cytokines (IL6, TNF).^(36,37)

6-Action sur les cellules de la moelle osseuse

L'IFN- γ est considéré depuis de nombreuses années comme un inhibiteur de l'hématopoïèse et semble jouer un rôle important dans la pathogénèse des dysfonctionnements hématopoiétiques.⁽³⁸⁾

En effet, à partir de populations médullaires non-purifiées (i.e contenant des lymphocytes et des monocytes), de nombreux auteurs ont mis en évidence une action inhibitrice de l'IFN- γ sur le développement des progéniteurs pluripotents (CFU-GEMM) ou déjà spécifiques de lignées hématologiques (BFU-E, CFU-GM, CFU-MK).⁽³⁹⁻⁴¹⁾ Cependant, à la différence de ce que l'on observe avec l'IFN- α , l'élimination des lymphocytes et des monocytes contaminants provoque la perte des effets inhibiteurs de l'IFN- γ .^(39,42,43)

Diverses hypothèses peuvent rendre compte de cette observation. Tout d'abord, le traitement des cellules accessoires par l'IFN- γ induit des fonctions cytotoxiques qui peuvent être responsables de l'inhibition de la prolifération des progéniteurs.^(44,45) L'IFN- γ induit la synthèse de TNF- α qui est un puissant inhibiteur de la croissance des progéniteurs.^(32,46,47) L'IFN- γ augmente également l'expression du Rc pour le TNF et la sensibilité des cellules aux inhibiteurs de prolifération (transferrine).^(48,49)

Bien qu'une action directe de l'IFN- γ sur les progéniteurs médullaires ne soit pas à ce jour démontrée, cette lymphokine pourrait jouer un rôle très important, en modulant l'expression des récepteurs membranaires de diverses cytokines. Dans ce contexte, l'IFN- γ est capable d'augmenter l'expression du récepteur membranaire pour l'IL6,⁽³⁷⁾ un facteur très important pour la maturation et la

prolifération des progéniteurs.⁽¹⁾ Une action conjuguée de l'IFN- γ avec d'autres cytokines peut être également envisagée. Un travail très récent démontre d'ailleurs qu'en association avec l'IL3, l'IFN- γ stimule la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques et de la lignée mégacaryocytaire MO7.^(43,50)

II. LE RECEPTEUR POUR L'IFN- γ .

Cette glycoprotéine est exprimée en faible quantité (100 à 10000 sites/cellule) sur la plupart des cellules à l'exception des leucocytes de certaines personnes atteintes de leucémie lymphoïde et de la lignée lymphocytaire T CEM.⁽¹³⁾ Son affinité pour le ligand est très importante (kd de 10^{-10} à 10^{-11} M).⁽⁵¹⁻⁵⁵⁾ En dépit d'une très grande spécificité d'espèce, ce récepteur présente de nombreuses caractéristiques et zones d'homologies d'une espèce à l'autre (53% d'homologie avec la souris).⁽⁵⁶⁾

A. Structure.

L'utilisation des sondes moléculaires issues du clonage du gène et de l'ADN complémentaire (ADNc) du récepteur pour l'IFN- γ ,⁽¹⁷⁾ a permis la mise en évidence d'un ARN messager unique (2,3 kb) dans des lignées d'origines diverses.^(55,57) Ce gène situé sur le chromosome 6q21-22 code pour une protéine de 54 kDa (489AA) constituée des 3 domaines suivants:

- extracytoplasmique (AA18 à 246);

- intramembranaire (AA 247 à 268);
- intracytoplasmique (AA 248 à 489).

L'étude de la séquence primaire de cette protéine indique la présence de nombreux sites potentiels de N- et de O-glycosylation, mais ne permet pas d'attribuer une quelconque fonction enzymatique (de type kinase par exemple) au domaine intracytoplasmique.⁽¹⁷⁾

Les nombreuses études biochimiques effectuées pour la plupart avant le clonage ont attribué au récepteur un poids moléculaire compris entre 50 et 200 kDa, d'où l'élaboration de théories concernant une structure multimérique ou l'existence de plusieurs récepteurs.^(16,58,59) Récemment, Fountoulakis *et al* ont démontré que la plupart de ces résultats étaient en fait la conséquence d'un excès de pontages d'une molécule de 90 kDa et/ou de ses fragments de dégradation.⁽⁶⁰⁾ On observe cependant, une faible variation du poids moléculaire de cette glycoprotéine selon les lignées cellulaires (90 kDa pour les cellules Raji contre 105 kDa pour les U937), due à un degré différent de N-glycosylation.^(54,55) En effet, le "core" protéique de 54 kDa est très fortement N-glycosylé (17 kDa pour la plupart des cellules contre 30 kDa pour les U937) et O-glycosylé (19 kDa). Les N-glycosylations sont essentielles pour la fixation du ligand en situation biologique (i.e dans la membrane). Par contre, un récepteur N-déglycosylé est capable de fixer l'IFN- γ sans modification de son affinité, après adsorption sur de la nitrocellulose.⁽⁶¹⁾ Les N-glycanes sont donc essentiels au maintien du récepteur dans une conformation accessible au ligand, sans pour autant interagir

avec lui.

B. Transduction du signal.

Les étapes précoces (fixation, internalisation) et tardives (activation de l'expression de certains gènes) de l'action de l'IFN- γ sont relativement bien comprises.⁽⁹⁾ Par contre, les mécanismes assurant la liaison entre ces étapes demeurent inconnus. Actuellement, on peut sérieusement se poser la question de savoir si l'IFN- γ agit directement par le biais de son Rc membranaire, ou par l'intermédiaire d'un site de fixation intracellulaire.

1-Structure fonctionnelle

En dépit d'une homologie importante (53%) entre le récepteur pour l'IFN- γ de l'homme et celui de la souris, l'expression du Rc humain dans des cellules de souris (et vice-versa) après transfection ou réalisation d'hybrides somatiques ne confère pas à ces cellules la capacité de répondre à l'IFN- γ hétérologue, bien qu'il y ait fixation sur le Rc.^(56,63) Ces expériences ont mis en évidence l'intervention déterminante de facteur(s) spécifique(s) d'espèce(s) dans le déclenchement de la réponse biologique. Ce(s) produit(s) est(sont) issu(s) du chromosome 21 chez l'homme et du chromosome 16 chez la souris; ^(64,65) cette(ces) molécule(s) sera(ont) désormais appelée molécule accessoire.

Bien que l'interaction ligand/récepteur et au moins quelques étapes de la transduction du signal aient divergé entre l'homme et la souris, les gènes inductibles par l'IFN- γ fonctionnent sans spécificité d'espèce, laissant supposer

une conservation des éléments impliqués dans la régulation génique.⁽¹⁶⁾

Sur ces bases, Aguet *et al*⁽¹⁶⁾ ont proposé un modèle, comportant une interaction directe et spécifique d'espèce entre le Rc et la partie proximale de la molécule accessoire, et une interaction non-spécifique d'espèce entre la partie distale de cette molécule et un élément de signalisation cellulaire régulé par l'IFN- γ . (Figure 2)

Ce modèle peut être rapproché de celui du récepteur pour l'IL6 qui comporte 2 éléments: une glycoprotéine (80 kDa) fixant la cytokine, et un élément "transducteur" (gp130 kDa) qui déclenche l'effet biologique.⁽⁶⁶⁾ L'intervention d'un troisième participant est actuellement soupçonnée.⁽⁶⁷⁾

Des travaux très récents démontrent que, comme dans le cas du récepteur à l'IL6, la molécule accessoire se fixe spécifiquement sur la partie extracellulaire du récepteur à l'IFN- γ , sans influencer la fixation du ligand.⁽⁶⁸⁾ (Figure 2)

Le travail récent de Finbloom *et al*⁽⁶⁹⁾ sur les monocytes semble confirmer ce modèle multimérique. Ces auteurs viennent en effet de mettre en évidence la co-précipitation de 2 molécules (38 et 200 kDa) avec la glycoprotéine de 90 kDa fixant l'IFN- γ . Ces 2 nouvelles protéines possèdent par ailleurs des profils peptidiques différents de celui du Rc.

Il apparaît donc que la structure capable de déclencher une réponse biologique à l'IFN- γ est au moins dimérique; elle est constituée du récepteur proprement dit de 90 kDa, associé par sa partie extracellulaire à une molécule accessoire, issue du chromosome 21 chez l'homme ou du chromosome 16 chez la souris.

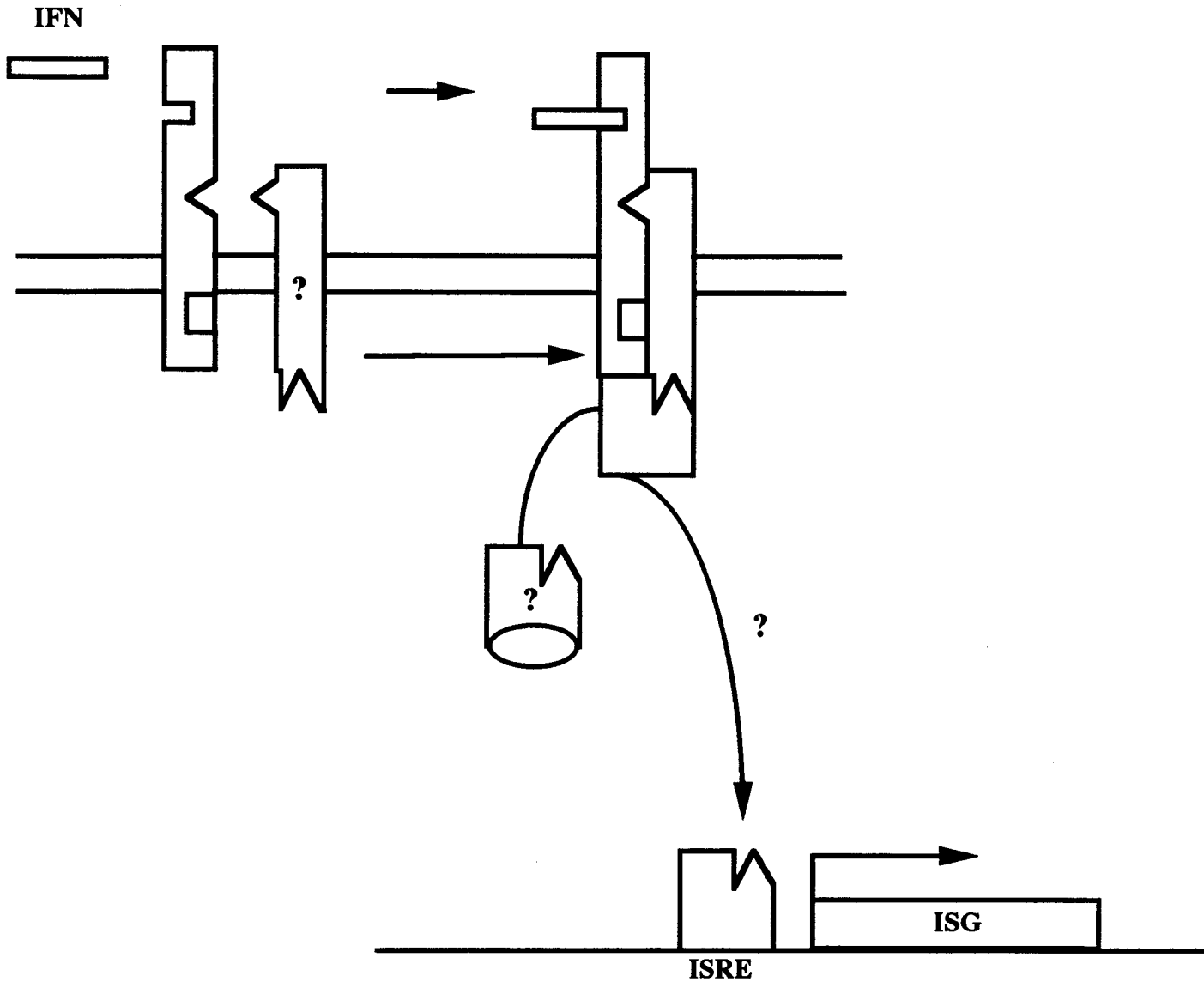


Figure 2: Hypothèse pour la transduction du signal induit par l'IFN- γ .

Ce schéma s'inspire de Aguet (*J Interferons Res* 10:551, 1990) et de Gibbs (*Mol Cell Biol* 11:5860, 1991). ISRE: Interferon Sensible Responsive Element; ISG: Interferon Sensible Gene.

2-Effets précoces de la fixation de l'IFN- γ sur son récepteur.

Chez la souris comme chez l'homme, la fixation de l'IFN- γ sur son récepteur entraîne une internalisation rapide du complexe Rc-ligand au niveau des puits recouverts de clathrine.^(55,70-72)

Chez l'homme, on observe ensuite l'apparition de produits de dégradation de l'IFN- γ dans le milieu de culture; par contre le ligand demeure intact dans les cellules de souris (L1210 et LIN175).^(72,73)

D'autre-part, la fixation de l'IFN- γ a également été décrite comme entraînant une modification du potentiel membranaire, du taux cytoplasmique de calcium, et une mobilisation de la protéine kinase C.⁽⁷⁴⁾ Cependant, ces résultats ne sont pas strictement corrélés aux effets biologiques et pourraient être une conséquence des perturbations membranaires liées à l'internalisation du complexe Rc/ligand.

On constate également une augmentation de la phosphorylation du récepteur à l'IFN- γ après fixation sur son ligand mais aucune fonction n'a pu être attribuée à ce phénomène.⁽⁷⁵⁾

3-Existence de récepteurs nucléaires pour l'IFN- γ .

Dans les cellules de souris, après internalisation, l'IFN- γ migre rapidement vers le noyau.^(72,76) On trouve par ailleurs un grand nombre de sites de fixation de forte affinité pour l'IFN- γ à ce niveau (24×10^3 à 2×10^{10} M).⁽⁷⁶⁾ La transfection de cellules murines avec l'ADNc tronqué de l'IFN- γ humain (ce qui empêche son excrétion) permet de reproduire les effets de l'IFN- γ murin.⁽⁷⁷⁾ Ces résultats indiquent que l'IFN- γ est capable d'agir directement sans spécificité d'espèce sur ces cellules, en l'absence de toute stimulation de son récepteur

membranaire. Un effet direct de cette cytokine sur l'activité des ADN polymérase a par ailleurs été rapporté.⁽⁷⁸⁾

Donc, tout au moins chez la souris, le Rc pour l'IFN- γ semble en partie agir comme un transporteur membranaire spécifique du ligand vers l'intérieur de la cellule où son interaction avec un autre site de fixation au niveau du noyau est responsable de l'activation. A ce jour, aucun argument solide ne permet d'envisager ce type de phénomène dans le cas des cellules humaines.

4-Déclenchement de la réponse biologique par des interactions protéine/protéine.

Si l'on exclut la possibilité de l'existence d'un récepteur nucléaire pour l'IFN- γ , un autre modèle similaire à celui de Aguet a été proposé.⁽¹¹⁾

Celui-ci implique des interactions de proche en proche entre des protéines cytoplasmiques dans la transmission du message du Rc vers le noyau. Ce modèle intègre par ailleurs un certain nombre de facteurs d'activation déjà connus dans le cadre de la stimulation des cellules par cette lymphokine.⁽¹¹⁾

C. Modulation de l'expression du Rc pour l'IFN- γ .

Le contrôle du taux de Rc pour l'IFN- γ exprimé à la surface des cellules est un phénomène très actif. En effet, les demi-vies de la protéine et de l'ARNm sont courtes: 4-7 h et 2 h respectivement.^(55,57)

1-Effets du ligand.

Après fixation de l'IFN- γ , le complexe ligand/Rc est rapidement internalisé.^(55,70-73) Cependant, le taux de récepteur présent à la surface des cellules est globalement constant. Ce phénomène est attribué à un recyclage et/ou à l'utilisation de Rc préformés.^(55,57,79) L'acido-résistance⁽⁵⁵⁾ et la présence d'un stock de récepteurs dans un certain nombre de cellules^(57,59) sont en parfait accord avec ces observations. On n'observe pas de modification du niveau d'expression de l'ARNm du récepteur (taux, 1/2 vie), ni du taux du Rc. En ce qui concerne les monocytes et la lignée THP1, il semble qu'en plus du recyclage, une certaine néosynthèse de récepteurs intervienne dans ce phénomène.⁽⁵⁷⁾

2-Effets du PMA.

Le phorbol myristate acétate (PMA) est un puissant activateur cellulaire, qui stimule la protéine kinase C.⁽⁸¹⁾ Cependant, il n'a aucun effet sur l'expression du récepteur pour l'IFN- γ , ni sur le taux ou la demi-vie de son ARNm dans les lignées d'origine B (IM9, Raji), monocyttaire (U937), myéloïde (HL-60), mégacaryocytaire (Dami) ou pancréatique (ASPC-1).^(55,57,81) Par contre, dans la lignée monocyttaire THP1, on observe une très forte augmentation de l'expression du récepteur et de son ARNm.⁽⁵⁷⁾ Cet effet du PMA est par ailleurs complètement réversé par l'IFN- γ . Des résultats équivalents ont été obtenus en utilisant le LPS dans les THP1.

3-Effets d'autres cytokines.

Le TNF- α augmente l'expression du Rc pour l'IFN- γ à la surface des cellules d'origine colorectale ou pancréatique. Néanmoins, les phénomènes intervenant

dans cette augmentation ne sont pas connus.^(81,82)

D. Conclusions.

L'ensemble des travaux effectués à ce jour permet de conclure à l'existence d'un récepteur unique pour l'IFN- γ chez l'homme et chez la souris. Un certain degré de polymorphisme peut être observé par suite d'une glycosylation variable de la même protéine. Cette molécule est très spécifique et affine pour son ligand et s'exprime sur la plupart des cellules. Le déclenchement de toute réponse biologique nécessite l'intervention d'une protéine accessoire qui interagit avec la partie extracellulaire du récepteur. Bien que le complexe Rc/ligand soit rapidement internalisé, le taux membranaire de récepteurs est maintenu relativement constant, par recyclage, utilisation de récepteurs préformés, et accessoirement par néosynthèse.

Le contrôle de l'expression du récepteur pour l'IFN- γ semble particulièrement rigoureux et stable. En effet, jusqu'à présent, seul le TNF- α et le PMA se sont révélés capables de le modifier et ceci seulement pour certains types cellulaires.

Les mécanismes précis, par lesquels la fixation de l'IFN- γ conduit à l'induction d'un certain nombre de gènes responsables des effets biologiques, sont inconnus. L'intervention des seconds messagers classiques semble actuellement écartée par la majorité des auteurs. On oscille actuellement entre la transmission du message par l'intermédiaire d'une cascade d'interactions protéine/protéine et l'intervention de récepteurs endogènes, selon le type cellulaire et l'espèce

considérée. De plus, il a été démontré récemment que des domaines différents de l'IFN- γ sont impliqués dans la fixation et la transduction des signaux selon l'effet biologique observé. Cette dernière observation pourrait expliquer l'existence de différents modes de transmission du signal.⁽⁸³⁾

Actuellement, il est important de poursuivre les travaux de clonage des gènes et des promoteurs des diverses protéines intervenant dans la stimulation des cellules par l'IFN- γ . En effet, la séquence du promoteur du Rc apportera de nombreux indices sur la régulation de l'expression de cette protéine dans les cellules. De même, le clonage du produit du chromosome 21 ou 16 selon l'espèce, permettra de savoir si l'on peut lui associer une activité transductrice classique (tyrosine/sérine-kinase ou GTP binding protein par exemple). Il serait aussi intéressant d'effectuer une transfection de cellules humaines avec l'ADNc tronqué de l'IFN- γ de souris afin de voir si, comme dans les expériences effectuées chez la souris, on observe une activation de la cellule sans utilisation du récepteur membranaire. Il faudrait également déterminer si, lors de l'expression du récepteur dans des cellules hétérologues, on a bien internalisation du complexe Rc/ligand homologue, ce qui permettrait d'éliminer l'intervention du produit accessoire en tant que molécule nécessaire à l'internalisation.

RESUME/CONCLUSIONS DE L'ARTICLE N°1

Les études entreprises dans le cadre des maladies parasitaires ont permis la mise en évidence de la modulation des fonctions cytotoxiques des plaquettes sanguines par certaines cytokines, et en particulier par l'IFN- γ .⁽²⁷⁾ Parallèlement, Molinas *et al*.⁽⁵³⁾ ont décrit un récepteur pour l'IFN- γ sur ces mêmes plaquettes. Ces résultats nous ont conduit à nous intéresser à la mise en évidence de ce récepteur sur les précurseurs médullaires des plaquettes, les mégacaryocytes. Devant la difficulté pour prélever et maintenir ces cellules en culture, nous avons utilisé la lignée mégacaryocytaire Dami tout au long de notre travail.

Nous avons mis en évidence l'existence de 11000 sites de fixation de forte affinité (3×10^{-10} M) pour l'IFN- γ à la surface des cellules Dami. Des expériences de pontage et d'immunoprécipitation ont permis d'évaluer le poids moléculaire de ce récepteur à 90 kDa. Comme sur les autres types cellulaires, la fixation du ligand entraîne l'internalisation du complexe ligand/Rc et la dégradation de l'IFN- γ . On observe cependant, un niveau constant d'expression du Rc à la surface des cellules par suite de son recyclage ou de l'utilisation de Rc préformés. D'autre-part, comme Mao *et al*.⁽⁵⁷⁾ nous n'avons pas observé de modulation de l'expression de l'ARNm ou de la protéine dans les Dami, par l'IFN- γ ou le PMA.

Ce Rc est totalement fonctionnel, puisque la fixation de l'IFN- γ entraîne la modulation de l'expression des molécules du CMH. Par contre, cette lymphokine ne modifie pas la prolifération des cellules ni l'expression des marqueurs de différenciation plaquettaire. Ces résultats sont en accord avec l'absence d'effet

direct de l'IFN- γ sur les progéniteurs mégacaryocytaires issus de la moelle osseuse. Néanmoins, en modulant l'expression de certains récepteurs ou en agissant en association avec d'autres facteurs, l'IFN- γ pourrait intervenir dans la thrombopoïèse. Dans ce contexte, l'IFN- γ augmente l'expression du Rc pour l'IL6 (un facteur très important dans l'hématopoïèse) et potentialise les effets de l'IL3 au niveau des progéniteurs et d'une autre lignée mégacaryocytaire, la lignée MO7.(34,37,50)

Ces lignées pourront désormais servir de modèle dans l'étude de la régulation de la mégacaryocytopoïèse par diverses cytokines.

ARTICLE N°1

Identification and Characterization of a Functional Receptor for Interferon- γ on a Megakaryocytic Cell Line

By Didier Monté, Jeanne Wietzerbin, Véronique Pancré, Gilles Merlin, Sheryl M. Greenberg, Jean-Pierre Kusnierz, André Capron, and Claude Auriault

We have previously shown that human interferon- γ (Hu-IFN- γ) induces platelets to become efficient effector cells, capable of killing young larvae of the parasite *Schistosoma mansoni*. Recently, binding sites for IFN- γ on platelets have been characterized. We show here the presence of high-affinity receptors for IFN- γ on the surface of the human megakaryocytic Dami cell line. Scatchard analysis indicated the presence of about 11,000 binding sites per cell, with a K_d of $3 \pm 0.5 \times 10^{-10}$ mol/L; the apparent molecular weight of the receptor was 90 Kd. Receptor-bound 125 I Hu-recombinant IFN- γ was rapidly internalized and degraded when the temper-

ature was increased from 4°C to 37°C. The half-life of this receptor was about 7 hours, and pretreatment of cells with IFN- γ or phorbol myristate acetate had very little effect on the surface receptor number and no detectable effect on IFN- γ receptor messenger RNA (mRNA) expression. The receptor was functional, because 24 hours of treatment with IFN- γ led to the increase of HLA class I mRNA expression and to the initiation of HLA class II mRNA expression. These effects were selective because platelet glycoprotein Ib, IIb, or IIIa mRNA expression and cell proliferation were unaffected. © 1991 by The American Society of Hematology.

INTERFERON- γ (IFN- γ) is a lymphokine produced by activated T lymphocytes that exerts immunomodulating, differentiating, antiproliferative, and antiviral effects on various cell populations.^{1,3} These pleiotropic activities require the interaction of this lymphokine with species-specific, high-affinity membrane receptors that are constitutively expressed by a variety of cell types.^{4,6} Recently, progress has been made in the molecular characterization of the human IFN- γ receptor (Hu-IFN- γ -R). It has been purified from Raji cells and placenta membranes as a glycoprotein (GP) with an apparent molecular weight of 90 Kd,^{7,8} and recently cloned from a Raji cell-derived cDNA library.⁹ The deduced amino acid sequence has indicated a molecular weight of 54 Kd, and the presence of several potential N- and O-linked glycosylation sites. The difference between the molecular weight of the native receptor and of the cloned protein has suggested a high degree of glycosylation of the native receptor. Indeed, the different molecular weights of the monocytic receptor (103 Kd) and of the Raji cell receptor (90 Kd) seem indeed to be due to different glycosylation.^{10,11}

The study of immune effector mechanisms against helminth parasites has led to the identification of antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) mechanisms involving inflammatory cells, including platelets,¹² that can kill parasite larvae (*Schistosoma mansoni*) in the presence of anaphylactic antibodies (IgE).¹³ These effector functions of platelets can be regulated by mediators released by activated T cells.¹⁴ Thus, Hu-IFN- γ ¹⁵ or tumor necrosis factors (TNF)¹⁶

are able to induce resting normal platelets into effector cells against parasite larvae in the absence of specific IgE antibodies. In line with these results, Molinas et al¹⁷ have described a high-affinity specific receptor for IFN- γ on the human platelet surface membrane.

These data led us to search for the presence of receptors for this lymphokine on the platelet-precursor-hematopoietic cells, the megakaryocytes. Indeed, because even platelets express this receptor, the question remains whether it is synthesized and expressed already in megakaryocytes before their fragmentation into functional platelets. To study this question, we used throughout this work a human megakaryocytic cell line, the Dami line, that has been previously reported by Greenberg et al¹⁸ to exhibit many of the morphologic and biochemical characteristics of bone marrow megakaryoblasts and megakaryocytes, including polyploidy, and expression of HLA class I, platelet GPIb and IIb-IIIa complex, and von Willebrand factor (vWF). Moreover, these cells can be induced to differentiate further along the megakaryocyte/platelet lineage with the tumor-promoting phorbol ester, phorbol myristate acetate (PMA).

In the present work, we report the identification of a high-affinity receptor for IFN- γ on the Dami megakaryocytic cell line and show that this receptor is functional.

MATERIALS AND METHODS

Cells

Dami cells, originally isolated by Greenberg et al,¹⁸ were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM; GIBCO-BRL, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% horse serum. Only exponentially growing cells were used for experiments.

IFN

Pure human recombinant IFN- γ (Hu-r IFN- γ) (specific activity, 2 to 5×10^7 U/mg of protein) was kindly provided by Roussel-UCLAF (Romainville, France). It was iodinated by the chloramine-T procedure as previously described¹⁹ without loss of biologic activity. The specific radioactivity ranged from 65 to 120 μ Ci/ μ g.

Binding Assay

Absorption isotherms were obtained by incubating 2×10^6 cells at 4°C for 2 hours with various concentrations of 125 I Hu-r IFN- γ , in U-bottomed microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark) at a cell density of 2×10^7 cells/mL in RPMI 1640 medium containing 10%

From the Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité mixte INSERM 167-CNRS 624, Institut Pasteur de Lille, Lille, France; Unité INSERM 196, Institut Curie, Paris, France; and the Hematology Division, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA.

Submitted December 6, 1990; accepted June 13, 1991.

Supported by INSERM and CNRS.

Address reprint requests to Didier Monté, Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité mixte INSERM U167-CNRS 624, Institut Pasteur, 1 rue du Pr. A. Calmette, 59019, Lille Cedex, France.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734 solely to indicate this fact.

© 1991 by The American Society of Hematology.

0006-4971/91/7808-0025\$3.00/0

fetal calf serum (FCS; GIBCO-BRL). After incubation, the cells were washed four times by centrifugation in the same cold medium. Cell-associated radioactivity was measured in a gamma counter (Perkin-Elmer, Bois d'Arcy, France). Nonspecific binding was determined in parallel experiments in the presence of 100-fold excess of unlabeled Hu-r IFN- γ . Nonspecific binding, which never exceeded 15% of total counts at saturation, was subtracted from total counts to determine specific binding.

Kinetic of ^{125}I Hu-r IFN- γ Binding to Dami Cells

Cells were incubated at 4°C with ^{125}I Hu-r IFN- γ (0.325 nmol/L) in the presence or the absence of 100-fold excess of unlabeled Hu-r IFN- γ . Aliquots of cells (2×10^6) were spun down (13,000g for 2 minutes) through a sucrose cushion (25% in incubation medium) at the indicated times and the radioactivity of the pellet was determined.

Dissociation of ^{125}I Hu-r IFN- γ From Dami Cells

Cells, preincubated with 2 nmol/L ^{125}I Hu-r IFN- γ , were washed and resuspended in the same volume of medium containing 200 nmol/L Hu-r IFN- γ . At the indicated incubation times, cells were isolated as above and the pellet counted to determine cell associated radioactivity.

Internalization of Receptor-Bound Hu-r IFN- γ

Dami cells were incubated with ^{125}I Hu-r IFN- γ (2 nmol/L) for 2 hours at 4°C. After incubation and washing, cells were kept at 4°C or warmed to 37°C. At different incubation times, aliquots of cell suspensions were spun down at 4°C. The supernatants were mixed with one volume of 20% trichloroacetic acid (TCA) on ice. TCA soluble and insoluble fractions were separated by centrifugation at 4°C (2,000g, 20 minutes) and radioactivity measured. The cell pellets were eluted by 5 minutes of incubation on ice with 10 mmol/L glycine-HCl buffer (pH 2.5) to remove surface-bound ^{125}I Hu-r IFN- γ . The cells were subsequently centrifuged to determine the radioactivity internalized by the cells.

Cross-Linking of ^{125}I Hu-r IFN- γ

Cells, 2.5×10^7 , were incubated with 2 nmol/L of ^{125}I Hu-r IFN- γ . After incubation for 2 hours at 4°C, unbound radiolabeled IFN- γ was removed by four washes with cold phosphate-buffered saline (PBS) containing CaCl_2 and MgCl_2 (2 mmol/L, without serum). Cells were then incubated in the same medium with an uncleavable cross-linking reagent, disuccinimidyl suberate (DSS; Pierce, Oud-Beijerland, Netherlands) at a final concentration of 1 mmol/L for 30 minutes on ice. The reaction was stopped by the addition of glycine (10 mmol/L final concentration) and centrifuged. The samples were then treated with lysis buffer (100 mmol/L phosphate, 150 mmol/L NaCl, 2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 1,000 U/mL aprotinin, 0.5% NP-40; pH 7.4) for 1 hour on ice and centrifuged for 20 minutes at 13,000g at 4°C. The supernatant was analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (8%) according to the method described by Laemmli.²⁰

Cell Surface Radiolabeling

Dami cells (5×10^7) were resuspended in 1.5 mL of PBS pH 7.4 and were incubated for 15 minutes on ice with 5 mCi ^{125}I carrier-free (Amersham, Paris, France) and 500 μg of Iodogen (Pierce). After radiolabeling, the cells were washed three times with RPMI 1640 and resuspended in the appropriate medium.

Immunoprecipitation

Radiolabeled cells (2.5×10^7) were resuspended in lysis buffer. The supernatant was then incubated overnight at 4°C with a mouse monoclonal antibody (MoAb) directed against the Hu-IFN- γ -R of Raji cells (A6)⁷ or with a mouse MoAb directed against the platelet GPIIIa (Immunotech, Luminy, France) (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as control. The complexes were then precipitated with protein-A sepharose (Pharmacia, Uppsala, Sweden) in the presence of a rabbit antimouse IgG serum (Nordic, Tilburg, Netherlands) (1:100). After washing, the immunoprecipitated molecules were analyzed by SDS-PAGE (7.5% to 15%).

Northern Blot Analysis

Total RNA was prepared from 5×10^6 cells by using RNazol (Cinna-Biotex, Houston, TX) and subjected to electrophoresis in 0.8% or 1.2% agarose denaturing gel.²¹ Equal amounts of total RNA (10 μg) from each sample were electrophoresed and were transferred to HYBOND-N filters (Amersham). The complementary DNA probes for Raji cell Hu-IFN- γ -R,⁹ for HLA-DP (HLA class II),²² for HLA-E (HLA class I; kindly provided by M.J. Truong, CIBP, Institut Pasteur Lille, France), for platelet GP Ib (kindly provided by Dr K. Clemetson, Theodor Kocher Institut, Bern, Suisse),²³ for platelet GPIIb, and for platelet GPIIIa (kindly provided by Dr Frachet and Dr Marguerie, DRF/Laboratoire d'Hématologie, Grenoble, France)²⁴ were radiolabeled using the method of random hexanucleotide priming and used for hybridization. Filters were washed with 0.1 SSC, 0.1% SDS at 55°C and were exposed to XAR Film (Kodak, Marne la Vallée, France) for autoradiography.

RESULTS

Kinetics of ^{125}I Hu-r IFN- γ Binding to Dami Cells

Dami cells were exposed to ^{125}I Hu-r IFN- γ (0.325 nmol/L), and the rate of binding was examined (Fig 1, representative of three experiments). During the first few minutes, the rate of binding was constant. The equilibrium binding was reached rapidly and the initial rate of association was directly proportional to the concentration of ligand added (data not shown). These results were consistent with a simple bimolecular reaction and allowed the determination of the forward kinetic constant k_1 , which was estimated to be 3.8×10^7 L/mol/min at 4°C.

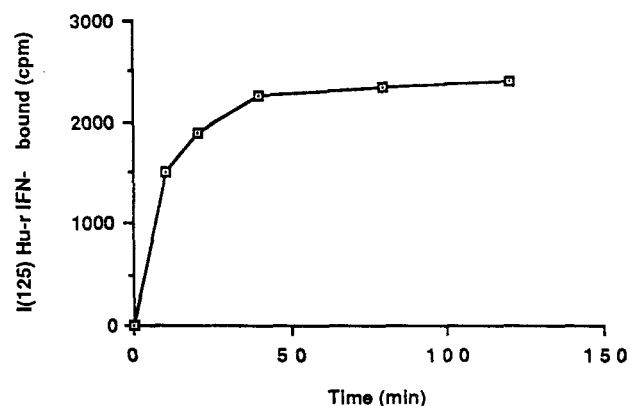


Fig 1. Kinetics of r IFN- γ binding to Dami cells. Cells ($2 \times 10^7/\text{mL}$) were exposed to ^{125}I -r IFN- γ (0.325 nmol/L) at 4°C. At the indicated times, 100 μL samples were centrifuged through a sucrose cushion, and radioactivity in the cell pellet was measured.

Binding Studies

Figure 2 illustrates one representative experiment of ^{125}I Hu-r IFN- γ binding to Dami cells at 4°C. The binding was dose-dependent and approached saturation at approximately 1 nmol/L of ligand. Scatchard analysis of the binding data (see insert) resulted in a linear plot compatible with noncooperative ligand binding to one homogeneous site. The apparent equilibrium constant k_d was about $3.0 \pm 0.5 \times 10^{-10}$ mol/L and the number of binding sites per cell was $11,000 \pm 2,000$.

Kinetics of Dissociation

Cells were incubated with ^{125}I -r IFN- γ (2 nmol/L) for 2 hours at 4°C and then washed rapidly by diluting 50-fold in medium and centrifuged. The cells were resuspended in the original volume of assay with 200 nmol/L of cold r IFN- γ . Zero time was taken immediately after resuspending cells and the reaction was stopped at each time by centrifugation through a sucrose gradient. The rate of dissociation (k_{-1}) calculated from the curve slope (Fig 3) was 7×10^{-3} /min. Using the association constant, k_1 , of 3.8×10^7 L/mol/min (calculated above), the k_d is 1.8×10^{-10} mol/L.

Internalization and Degradation of Receptor-Bound ^{125}I Hu-r IFN- γ

We investigated the fate of Hu-r IFN- γ in Dami cells. For this purpose, cells were first incubated with ^{125}I Hu-r IFN- γ for 2 hours at 4°C to allow equilibrium binding to specific cell surface receptors. After washing, cells were kept at 4°C or warmed to 37°C and cell-internalized IFN- γ was determined after elimination of IFN- γ bound on the cell surface by using the acid elution method.²⁵⁻²⁷

As shown in Fig 4, radioactivity internalized by the cells (\square) increased with time, was maximal at 20 minutes, and decreased thereafter, whereas TCA-soluble radioactivity

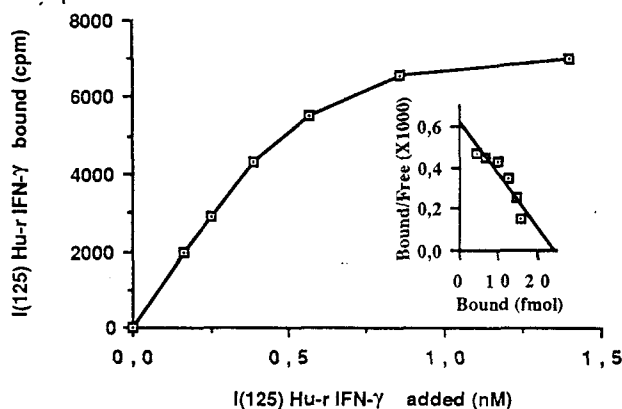


Fig 2. Specific binding of ^{125}I -Hu-r IFN- γ to Dami cells. Cells (2×10^7 cells/mL) were incubated for 2 hours at 4°C with the indicated concentrations of radiolabeled IFN- γ . Curves represent the specific binding determined as described in Materials and Methods. Nonspecific binding was linear and unsaturable, and accounted for less than 15% of total binding at saturation. Points represent the means of triplicate cultures at each ligand concentration. The standard deviation was less than 10%. Insert is the Scatchard plot of the binding data; the ordinate indicates the ratio of bound to free ligand concentration, and the abscissa the femtomoles bound per 2×10^6 cells.

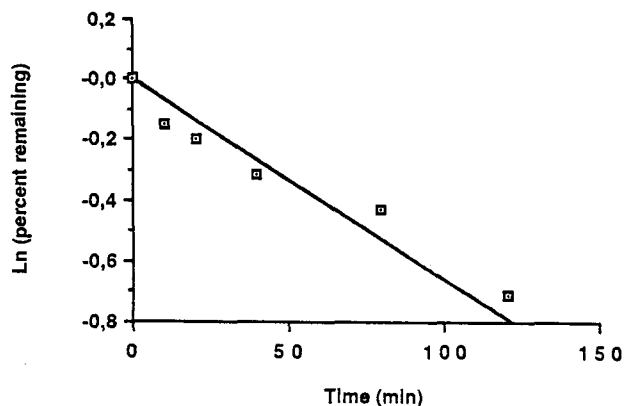


Fig 3. Dissociation of bound r IFN- γ from Dami cells. Cells (2×10^7 / mL) were allowed to bind radiolabeled IFN- γ (2 nmol/L) for 2 hours at 4°C. The cells were then diluted with 50 mL of medium and centrifuged. The cell pellet was resuspended at the original volume in medium containing 200 nmol/L cold IFN- γ . At each time, samples of cells were centrifuged through sucrose cushion and the pellet radioactivity determined. The data are presented as the Ln of the percent remaining bound onto the cells. Zero time is taken as 100%.

(\blacktriangle) increased in the supernatant. This result indicated that IFN- γ was internalized after binding to its cell-surface receptor and was subsequently degraded.

Ligand Effect on IFN- γ -R Expression

In several cellular systems, IFN receptors have been shown to be regulated by the ligand itself.²⁸⁻³² The following experiments were designed to investigate the effect of IFN- γ treatment on the expression of its cell surface receptor. Cells were treated (for 2.5 or 5 hours at 37°C) with a saturating amount of cold Hu-r IFN- γ in the presence or absence of cycloheximide, or with cycloheximide alone. Then, cell-surface bound IFN- γ was eliminated by the acid-elution procedure and the number of surface receptors available determined by measurement of binding of ^{125}I -r IFN- γ to the cell surface. As shown in Fig 5, the level of surface bound ^{125}I -IFN- γ was not reduced during the incubation period with lymphokine alone (\square) despite internalization of IFN- γ /IFN- γ -R complex (Fig 4). This result indicated that the receptor level was maintained at a constant level either through receptor recycling, by de novo synthesis, or by use of a cryptic receptor pool. Incubation of cells with cycloheximide alone (to inhibit protein synthesis), followed by saturation-binding experiments at 4°C, allowed the Hu-IFN- γ -R half-life determination (Fig 5 [\blacksquare]). This half-life was calculated as approximately 7 hours. Finally, preincubation of the cells with a saturating concentration of Hu-r IFN- γ together with cycloheximide did not decrease the level of surface binding below the reduction with cycloheximide alone (Fig 5 [\triangle]), indicating that de novo receptor synthesis was not responsible for the constant level of receptors on the cell surface. Therefore, the constant level of cell surface receptor expression must be due to either receptor recycling or to a cryptic receptor pool. In addition, the receptor was acid resistant because binding capacity of cells was not modified by acid elution (pH 2.5; 10 minutes).

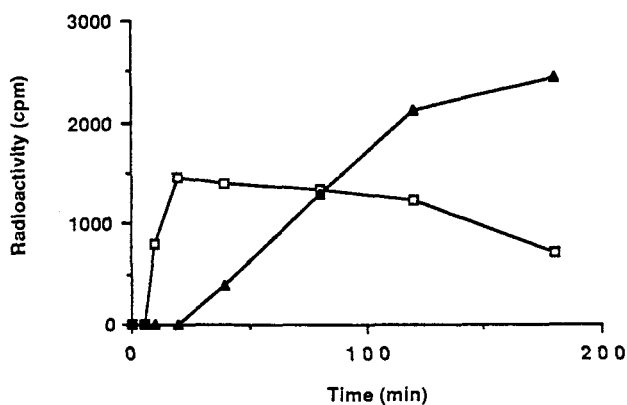


Fig 4. Internalization and degradation of surface-bound IFN- γ by Dami cells. Cells (2×10^7 /mL) were allowed to bind ^{125}I -r IFN- γ (2 nmol/L for 2 hours at 4°C). After four washings, cells were further incubated at 4°C or warmed to 37°C. After the indicated times, aliquots of cell suspensions were withdrawn. The supernatants were mixed with one volume of 20% TCA to allowed determination of TCA-soluble (\blacktriangle) material. The cell pellet was eluted by acid treatment and washed to determine the radioactivity internalized by the cells (\square).

Characterization of Hu-IFN- γ Receptor of Dami Cells

Cross-linking of ^{125}I -Hu-r IFN- γ to Dami cell surface component. Cross-linking of ^{125}I Hu-r IFN- γ to Dami cells, using DSS (Fig 6) as the cross-linking reagent, yielded a radiolabeled complex with an apparent molecular weight of 105 Kd on SDS-PAGE electrophoresis and autoradiography (lane 4). Excess unlabeled IFN- γ (lane 3) or the absence of DSS (lane 1) prevented the formation of this complex. In Fig 6, A and B indicate noncross-linked dimer (A) and monomer (B) of IFN- γ . Assuming a complex consisting of one molecule of ligand and one molecule of receptor, the molecular weight of the receptor or its binding subunit would be approximately 90 Kd.

Detection of Hu-IFN- γ -R messenger RNA (mRNA). As shown in Fig 7, Northern blot analysis of total RNA from Dami cells treated with 0.02, 0.1, 0.2, 1, or 2 nmol/L of IFN- γ , PMA (10 ng/mL), or medium for 24 hours permitted detection of the IFN- γ -R mRNA (2.3 kb). Total RNA of the monocytic cell line U937 was used as a positive control (data not shown). There was no apparent change in the 2.3-kb mRNA level on treatment with IFN- γ . These results were consistent with the absence of downregulation of this receptor after lymphokine binding. PMA slightly decreased the number of surface receptors (10%; data not shown) but had no effect on the mRNA level.

Immunoprecipitation of ^{125}I -labeled cell surface components. After cell surface iodination, the Dami cells were lysed in the presence of NP-40 and the lysate was immunoprecipitated. As shown in Fig 8, the mouse MoAb A6 directed against the Hu-IFN- γ -R of Raji cells precipitated a molecule of approximately 90 Kd (lane 1). This result was in agreement with the molecular weight of Hu-IFN- γ receptor immunoprecipitated from other cells. As a positive control, we used a mouse MoAb directed against platelet GPIIIa. This antibody precipitated two molecules of approximately 105 Kd and 147 Kd. The 105-Kd molecule

was probably the GPIIIa (molecular weight, 95 to 110 Kd) that is in cell membranes associated with GPIIb as the complex GPIIb-IIIa. The 145-Kd molecule corresponded to the molecular weight of GPIIb (153 Kd) and its detection likely due to the precipitation of nondissociated GPIIb-IIIa complex. The others molecules present in the two cases were nonspecifically absorbed by the reagents (protein-A, rabbit antiserum, or mouse IgG).

Biologic Effects of Hu-r IFN- γ

To correlate IFN binding and biologic effects, we examined the action of this lymphokine on Dami cells. Dami cell proliferation or ploidy were not affected by IFN- γ concentrations up to 20 nmol/L (data not shown). Because Dami cells exhibited high-affinity receptors for IFN- γ without expressing the usual biologic effect (inhibition of proliferation), we examined the expression of genes known to be modulated by IFN- γ in sensitive cells, such as HLA genes.² Figure 7 shows a Northern blot analysis of the mRNA extracted from Dami cells treated or not treated with IFN- γ . IFN- γ did not modify expression of platelet GPIb (2.4 kb), GPIIb (3.5 kb), or GPIIIa (6.1 kb), whereas PMA enhanced their expression. In contrast, whereas HLA class II gene expression was not detected in cells treated with buffer or PMA, mRNA (1.3 kb) expression appeared in a dose dependent manner on IFN action. Moreover, the HLA class I mRNA (1.7 kb) level was increased by IFN- γ or PMA. As a control, the same blot was hybridized with a β -actin cDNA probe. No significant modifications of its mRNA level were observed.

DISCUSSION

We present here evidence indicating that IFN- γ binds to a specific receptor on the human megakaryocytic, Dami cell

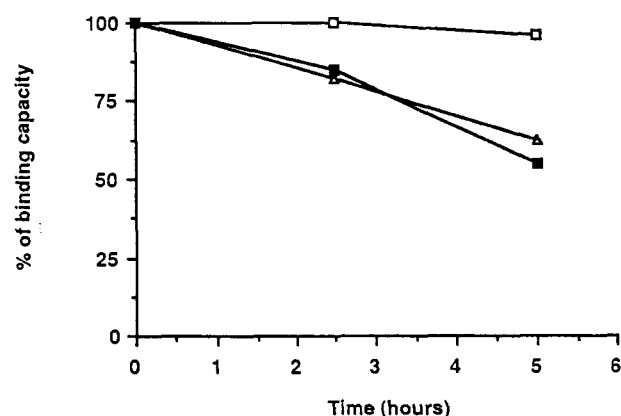


Fig 5. Effect of treatment of Dami cells with r IFN- γ on the subsequent specific binding of ^{125}I -r IFN- γ . Cells were incubated in culture medium with cold IFN- γ (2 nmol/L) (\square), cycloheximide (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (\blacksquare), or both (\triangle). After 2.5 or 5 hours at 37°C, cells were washed and cell-surface bound IFN- γ eliminated by acid treatment. They were then incubated for 2 hours at 4°C with a saturating concentration of radiolabeled IFN- γ for specific binding determination as described in Fig 1. Specific binding to control untreated cells is taken as 100%.

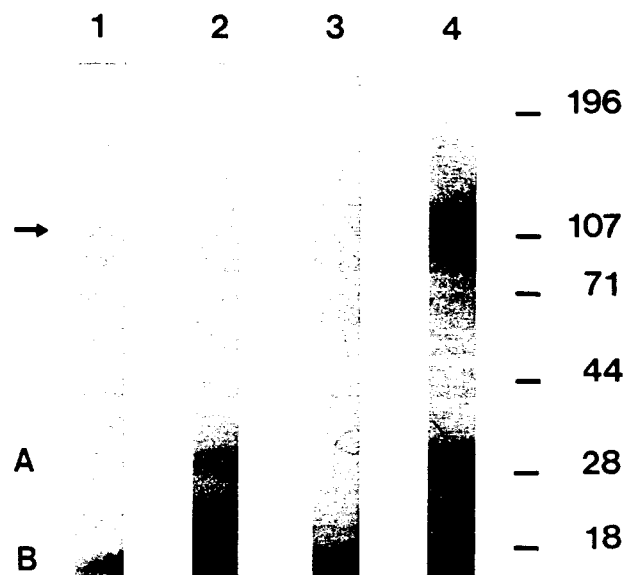


Fig 6. Cross-linking of ^{125}I -r IFN- γ bound to Dami cells and analysis by SDS-PAGE. For each experiment, 2×10^7 cells were incubated with labeled IFN (2 nmol/L) alone (lane 2 and 4) or in the presence of an excess of cold IFN- γ (lane 1 and 3) for 2 hours at 4°C. After washing, the cells were resuspended in cold PBS containing CaCl_2 and MgCl_2 (2 mmol/L) and treated (lane 3 and 4) or not treated (lane 1 and 2) with the cross-linking reagent DSS. Their lysates were prepared and analyzed by SDS-PAGE. This figure shows an autoradiograph of a dried gel. Not-cross-linked dimer (A) and monomer (B) of radiolabeled lymphokine.

line. To our knowledge, this is the first characterization of a receptor for IFN- γ on cells from the megakaryocytic lineage other than platelets. Its molecular weight was 90 Kd, as estimated by cross-linking or immunoprecipitation experiments. Our data are consistent with the existence of a single, high-affinity, noncooperative site. At 4°C the apparent equilibrium dissociation constant was 3×10^{-10} mol/L and there were approximately 11,000 binding sites per cell. At 37°C, surface-bound ligand was internalized and intracellular IFN- γ was rapidly degraded into TCA-soluble material. The cell surface Hu-IFN- γ -R was not downregulated after binding by its ligand, because a preincubation of cells with an excess of IFN- γ did not modify the number of cell surface receptors nor the expression of the receptor mRNA, even when protein synthesis was blocked with cycloheximide. This finding strongly suggests that the steady level of receptor obtained in the presence of an excess of ligand is not due to an increase in the amount of receptor synthesis but is probably related to the existence of preformed-receptor cryptic pool,³³ or to a recycling of the receptor following IFN- γ /Hu-IFN- γ -R complex internalization and dissociation. The acid resistance (pH 2.5; 10 minutes) of the receptor was in agreement with its recycling. PMA had no effect on the receptor mRNA level, a result in agreement with recent observations obtained with Raji cells.³³ Taken together, our data suggest that the Hu-IFN- γ -R on the Dami megakaryocytic cell line is very similar with Hu-IFN- γ -R, previously described on other human cells (Wish, HeLa, Raji).^{10,34,35}

The existence of two molecular forms of Hu-IFN- γ -R has been proposed by Fischer et al,³⁵ the first one being present on hematopoietic cells (monocytes) and the other one on nonhematopoietic cells (HeLa, Wish). These investigators reported that monocyte and HeLa receptors notably differed by the response to an excess of ligand and by their resistance or lability to acid treatment. Surprisingly, Dami cells present a receptor with the characteristics of the receptor described in cells of nonhematopoietic origin. It seems that the receptor for IFN- γ on monocytes has particular characteristics that could be due to different pattern of glycosylation or regulation,^{10,11,33} and not necessary to its hematopoietic origin. So, the presence of a receptor for IFN- γ on blood platelets and on a megakaryocytic cell line, which is similar to the receptor previously described on HeLa or Raji cells, suggests that this receptor is borne by bone marrow megakaryocytes and on their progenitors. In this context, it has been reported that r IFN- γ , as well as r IFN- α , markedly suppress the in vitro

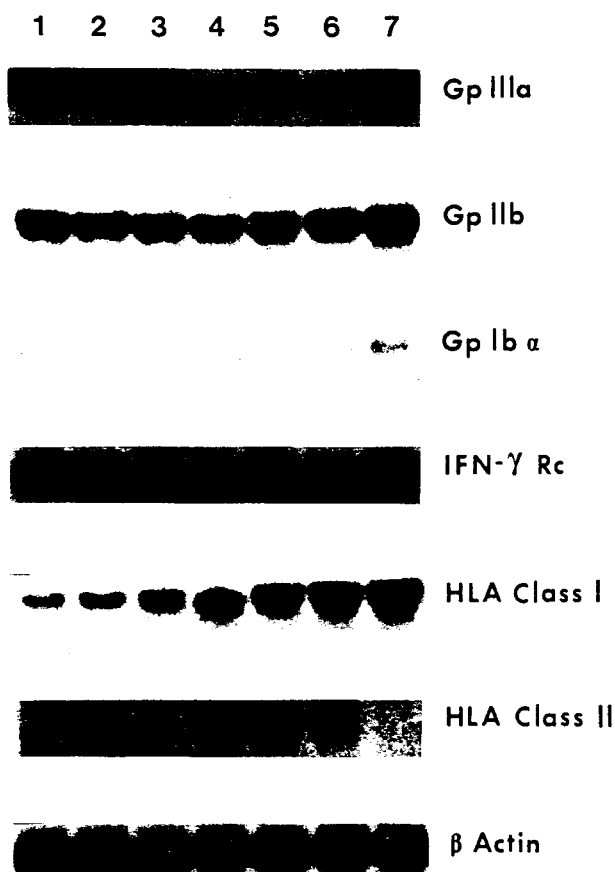


Fig 7. Identification of β -actin, Hu-IFN- γ -R, HLA class I, HLA class II, GPIIb- α , GPIIb, and GPIIIa transcripts in mRNA from Dami cells treated with IFN- γ or PMA. Total RNA (10 μg) from untreated cells (lane 1), from cells treated with 0.02 nmol/L (lane 2), 0.1 nmol/L (lane 3), 0.2 nmol/L (lane 4), 1 nmol/L (lane 5), 2 nmol/L (lane 6) of IFN- γ , or from cells treated with PMA (10 ng/mL) (lane 7) for 24 hours was fractionated on 1% agarose gel. The same blots were then hybridized with a ^{32}P -labeled β -actin cDNA probe, Hu-IFN- γ -R cDNA probe, HLA-E cDNA probe, HLA-DP β cDNA probe, GPIIb- α cDNA probe, GPIIb cDNA probe, or GPIIIa cDNA probe.

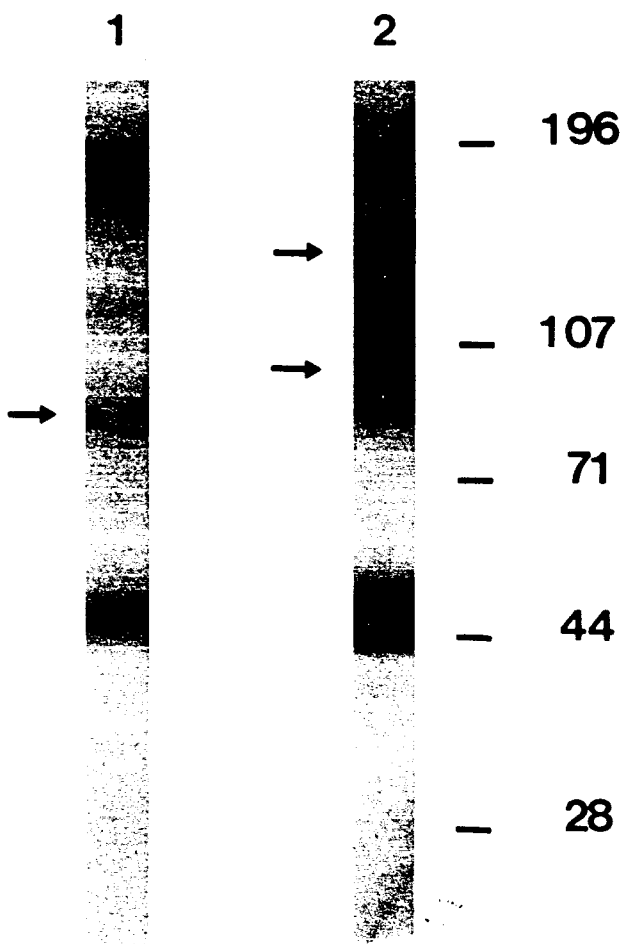


Fig 8. Analysis by SDS-PAGE gel electrophoresis of surface ^{125}I -labeled extracts of Dami cells immunoprecipitated by anti-Raji cell IFN- γ -R (lane 1) or by antiplatelet GPIIIa antibodies (lane 2).

proliferation of megakaryocyte progenitors (colony-forming unit-megakaryocyte [CFU-Mk]), of pluripotent hematopoietic progenitor cells (GFU-granulocyte, erythroid, monocyte, megakaryocyte [CFU-GEMM]), and of other cells of restricted lineage (burst-forming unit-erythroid [BFU-E] and CFU-granulocyte-macrophage [CFU-GM]), whether cells are isolated from normal subjects,³⁶⁻³⁸ from patients with chronic myeloid leukemia,³⁹ or from patients with myelofibrosis in the context of myeloid metaplasia.⁴⁰ In contrast, Dami cell proliferation was not inhibited by IFN- γ . It has been shown, however, that IFN- γ is unable to induce any effect on megakaryocytic progenitors when mononuclear light density bone marrow cells (LDBMC) are depleted of accessory cells, whereas IFN- α remains active in these conditions.^{36,40} Various hypotheses could account for this observation. Treatment of accessory cells with IFN- γ induces cytotoxic functions that could be responsible for the inhibition of progenitor cell growth.^{41,42} IFN- γ , but not IFN- α , also induces the production of TNF^{43,44} that directly inhibits progenitor cell proliferation.⁴⁵ IFN- γ also increases TNF receptor expression,⁴⁶ and in-

duces cell responsiveness to inhibitory mediators such as transferrin.⁴⁷

In this study, modulation of HLA antigen expression provided a very useful marker, showing that IFN- γ -R was functional. As previously described on lymphoblastoid Namalva cells,⁶ IFN- γ was able to induce HLA class II mRNA expression and to increase HLA class I mRNA expression in Dami cells. This effect was selective, because the expression of GPIb, IIb, and IIIa mRNA was not modified. HLA class II antigens are constitutively expressed only on a restricted number of cellular types (monocytes, B cells, follicular dendritic cells).⁴⁸ These antigens are not expressed on platelets and normal megakaryocytes, but are present on early progenitors of this lineage (CFU-Mk).⁴⁹⁻⁵¹ So, it seems that these antigens appear early in the differentiation process and are subsequently lost. In contrast, HLA class I antigens are present on all nucleated cells as well as on platelets and red blood cells.⁵² IFN- γ have been described to induce and to enhance HLA class I and HLA class II expression on numerous cells.⁵³ Whereas, the intervention of HLA class II products in antigen presentation is well documented, we do not yet know their role on megakaryocytic progenitors as well as on IFN- γ -treated Dami cells.

The effect of IFN- γ on megakaryocyte progenitors could be due to modified synthesis of certain mRNAs that are important in modulating cellular functions during megakaryocytopoiesis. The presence of a similar IFN- γ -R on human platelets¹⁷ raises the question of its role in a cell without a nucleus that contains only traces of rough endoplasmic reticulum and mRNA and synthesizes little protein.^{54,55} This platelet receptor appears functional, because platelets incubated with IFN- γ were able to kill *S mansoni* parasite larvae in vitro¹⁵ and to reduce, after passive transfer, the parasite burden in vivo.⁵⁶ One might speculate that the IFN- γ -R synthesized by megakaryocytes remains active in platelets and that IFN- γ -R mRNA remain present in the platelet cytosol after megakaryocyte segmentation.

In conclusion, the results presented here raise the question of the role of IFN- γ on the cells of the megakaryocytic lineage. Numerous cytokines do not directly exhibit in vitro hematopoietic colony activity but are able to modulate response to other cytokines in normally nonresponsive immature hematopoietic cells.^{57,58} To date, the possible relationships between IFN- γ and other factors influencing megakaryocytopoiesis and megakaryocyte functions have not been explored. It would be of a great interest to study the modulatory effect of IFN- γ in the presence of other cytokines, such as, interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-6, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, or TNF.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Christian Drolez for expert technical assistance and Drs J.C. Ameisen, M. Damonville, and R. Lafyatis for helpful comments and review of the manuscript. We acknowledge the following investigators for their gifts of recombinant cDNA probes: Drs Clemetson, Frchet, Marguerie, and Truong. The secretarial assistance of C. Colson and M.F. Massand is appreciated.

REFERENCES

1. Trinchieri G, Perussia B: Immune interferon: A pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today* 6:131, 1985
2. Revel M, Chebath J: Interferon-activated genes. *Trends Biochem Sci* 11:166, 1986
3. Pestka S, Langer JA: Interferons and their actions. *Ann Rev Biochem* 56:727, 1987
4. Anderson PS, Moore RN, Johnson HM, Oppenheim JJ: Specific binding of ¹²⁵I-human interferon- γ to high affinity receptors on human fibroblasts. *J Biol Chem* 257:11301, 1982
5. Littman SJ, Faltynek CR, Baglioni C: Binding of recombinant ¹²⁵I-interferon- γ to receptors on human cells. *J Biol Chem* 260:1191, 1985
6. Der Stepani L, Stefanos S, Lando D, Falcoff E, Wietzerbin J: Interferon gamma is active on human lymphoblastoid namalva cells without inducing an antiviral state. *Biochem Pharmacol* 37:3271, 1988
7. Aguet M, Merlin G: Purification of human γ interferon receptors by sequential affinity chromatography on immobilized monoclonal antireceptor antibodies and human interferon- γ . *J Exp Med* 165:988, 1987
8. Calderon J, Sheehan KCF, Chance C, Thomas ML, Schreiber RD: Purification and characterization of the human interferon- γ receptor from placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4837, 1988
9. Aguet M, Dembic Z, Merlin G: Molecular cloning and expression of the human interferon- γ receptor. *Cell* 55:273, 1988
10. Fisher T, Thoma B, Scheurisch P, Pfizenmaier K: Glycosylation of the human interferon- γ receptor. *J Biol Chem* 265:1710, 1990
11. Mao C, Aguet M, Merlin G: Molecular characterization of the human interferon gamma receptor: Analysis of polymorphism and glycosylation. *J Interferon Res* 9:659, 1989
12. Joseph M, Auriault C, Capron M, Vorng H, Viens P: A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. *Nature* 303:810, 1983
13. Joseph M, Capron M, Ameisen JC, Capron A, Vorng H, Pancré V, Kusnier JP, Auriault C: The receptor for IgE on blood platelets. *Eur J Immunol* 16:306, 1986
14. Pâncré V, Joseph M, Capron A, Delanoye A, Vorng H, Auriault C: Characterization of a suppressive factor of platelet cytotoxic functions in human and rat schistosomiasis. *Clin Exp Immunol* 76:417, 1989
15. Pancré V, Joseph M, Mazingue C, Wietzerbin J, Capron A, Auriault C: Induction of platelet cytotoxic functions by lymphokines: Role of interferon gamma. *J Immunol* 138:4490, 1987
16. Damonville M, Wietzerbin J, Pancré V, Joseph M, Delanoye A, Capron A, Auriault C: Recombinant tumor necrosis factors mediate platelet cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* larvae. *J Immunol* 140:3962, 1988
17. Molinas F, Wietzerbin J, Falcoff E: Human platelets possess receptors for a lymphokine: Demonstration of high specific receptors for HuIFN- γ . *J Immunol* 138:802, 1987
18. Greenberg SM, Rosenthal DS, Greelev TA, Tantravahi R, Handin RI: Characterization of a new megakaryocytic cell line: Dami cell. *Blood* 72:1968, 1988
19. Merlin G, Falcoff E, Aguet M: ¹²⁵I-labelled human interferon alpha, beta and gamma: Comparative receptor binding data. *J Gen Virol* 66:1149, 1985
20. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680, 1970
21. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (ed 2). Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
22. Tonnel C, DeMars R, Long EO: DO β : A new β chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J* 4:2839, 1985
23. Wicki AN, Walz A, Gerber-Huber SN, Wenger RH, Vornhagen R, Clemetson KJ: Isolation and characterization of human blood platelet mRNA and construction of a cDNA library in λ gt11. *Thromb Haemost* 61:448, 1989
24. Frachet P, Uzan G, Thevenon D, Denarier E, Pradini MH, Marguerie G: GpIIb and GpIIIa amino acid sequences deduced from human megakaryocytic cDNAs. *Mol Biol Rep* 14:27, 1990
25. Branca AA, Faltynek CR, D'Alessandro SB, Baglioni C: Interaction of interferon with cellular receptors. Internalization and degradation of cell-bound interferon. *J Biol Chem* 257:13291, 1982
26. Zoon KC, Arnheiter H, Zur Nedden D, Fitzgerald DJP, Willingham MC: Human interferon alpha enters cells by receptor mediated endocytosis. *Virology* 130:195, 1983
27. Haigler HT, Maxfield FR, Willingham RC, Pastani I: Dansylcadoverine inhibits internalization of ¹²⁵I epidermal growth factor in BALB 3T3 cells. *J Biol Chem* 255:1239, 1980
28. Wietzerbin J, Gaudet C, Aguet M, Falcoff E: Binding and cross-linking of recombinant mouse interferon- γ to receptors in mouse leukemic L1210 cells. *J Immunol* 136:2451, 1986
29. Littman SJ, Faltynek CR, Baglioni C: Binding of human recombinant ¹²⁵I interferon gamma to receptors on human cells. *J Biol Chem* 260:1191, 1985
30. Sarker FH, Gupta SL: Interferon receptor interaction. Internalization of interferon alpha-2 and modulation of its receptor on human cells. *Eur J Biochem* 140:461, 1984
31. Branca AA, Baglioni C: Down-regulation of the interferon receptor. *J Biol Chem* 140:461, 1982
32. Aguet M, Groebke M, Dreiding P: Down-regulation of the interferon receptor. *The biology of interferon system*. New York, NY, Elsevier, 1983, p 161
33. Mao C, Merlin G, Aguet M: Differential regulation of the human IFN- γ receptor expression in Raji and IM9 lymphoblastoid cells versus THP-1 monocytic cells by IFN- γ and phorbol myristate acetate. *J Immunol* 144:4688, 1990
34. Sarker FH, Gupta SL: Receptors for human γ -interferon: Binding and cross-linking of ¹²⁵I-labelled recombinant human γ -interferon to receptors on Wish cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5160, 1984
35. Fischer DG, Novick D, Orchansky P, Rubinstein M: Two molecular forms of the interferon- γ receptor. *J Biol Chem* 263:2632, 1988
36. Ganser A, Carlo-Stella C, Greher J, Volkens B, Hoelzer D: Effect of recombinant interferons alpha and gamma on bone marrow-derived megakaryocytic progenitor cell. *Blood* 70:1173, 1987
37. Neuman HA, Fauser AA: Effect of interferon on pluripotent hemopoietic progenitors (CFU-GEMM) derived from human bone marrow. *Exp Hematol* 10:587, 1982
38. Broxmeyer HE, Lu L, Platzer E, Feit C, Juliano L, Rubin BY: Comparative analysis of the influence of human gamma, alpha, and beta interferons on human multipotential (CFU-GEMM), erythroid (BFU-E) and granulocyte-macrophage (CFU-GM) progenitor cells. *J Immunol* 131:1300, 1983
39. Carlo-Stella C, Cazzola M, Ganser A, Bergamaschi G, Pedrazzoli P, Hoelzer D, Ascarì E: Synergistic antiproliferative effect of recombinant interferon gamma with recombinant interferon alpha on chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitor cells (CFU-GEMM, CFU-Mk, BFU-E, and CFU-GM). *Blood* 72:1293, 1988

40. Carlo-Stella C, Cazzola M, Ganser A, Barosi G, Dezza L, Meloni F, Pedrazzoli P, Hoelzer D, Ascari E: Effects of recombinant alpha and gamma interferons on the *in vitro* growth of circulating hematopoietic progenitor cells (CFU-GEMM, CFU-Mk, BFU-E, and CFU-GM) from patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 70:1014, 1987
41. Hosoi T, Ozawa K, Ohta M, Okabe T, Urabe A, Takaku F: Recombinant immune interferon inhibits leukemic cell growth by a monocyte-macrophage-mediated mechanism. *Exp Hematol* 13:597, 1985
42. Saito T, Berens ME, Welander CE: Direct and indirect effects of human recombinant gamma-interferon on tumor cells in a clonogenic assay. *Cancer Res* 46:1142, 1986
43. Nedwin GE, Svedersky LP, Bringham TS, Palladino MA, Goeddel DV: Effect of interleukin 2, interferon gamma and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta. *J Immunol* 135:2492, 1985
44. Collard MA, Belin D, Vassalli S, deKossodo S, Vassalli P: Gamma interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, Interleukin 1, and urokinase genes, which are controlled by short-lived repressors. *J Exp Med* 164:2113, 1986
45. Broxmeyer HE, Williams DE, Lu L, Cooper S, Anderson S, Beyer GS, Hoffman R, Rubin BY: The suppressive influences of human tumor necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donors and patients with leukemia: Synergism of tumor necrosis factor and interferon gamma. *J Immunol* 136:4487, 1986
46. Tsujimoto M, Yip YK, Uilcek J: Interferon gamma enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. *J Immunol* 136:2441, 1986
47. Broxmeyer HE, Piacibello W, Juliano L, Platzer E, Berman E: Gamma interferon induces colony-forming cells of the human monoblastic cell line U937 to respond to inhibition by lactoferrin, transferin, and acidic isoferritins. *Exp Hematol* 14:35, 1986
48. Hansen JA, Nelson JL: Autoimmune diseases and HLA. *Crit Rev Immunol* 10:307, 1990
49. Briddell RA, Hoffman R: Cytokine regulation of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* 76:516, 1990
50. Vinci G, Tabilio A, Deschamps JP, Van Haeke D, Henri A, Guichard J, Tettero P, Landsdorp PM, Hercend T, Vainchenker W, Breton-Gorius J: Immunological study of *in vitro* maturation of human megakaryocytes. *Br J Haematol* 52:205, 1984
51. Erber WN, Breton-Gorius J, Villeval JL, Oscier DG, Bai Y, Mason DY: Detection of cells of megakaryocyte lineage in haematological malignancies by immuno-alkaline phosphatase labelling cell smears with a panel of monoclonal antibodies. *Br J Haematol* 67:87, 1987
52. Giles CM, Botto M, King MJ: A study of HLA (Bg) on red cells and platelets by immunoblotting with monoclonal antibodies. *Transfusion* 30:126, 1990
53. Rosa F, Fellous M: The effect of gamma-interferon on MHC antigens. *Immunol Today* 5:261, 1984
54. Kieffer N, Guichard J, Farcet JP, Vainchenker W, Breton-Gorius J: Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur J Biochem* 164:189, 1987
55. Hickstein DD, Huckey KJ, Chang DW, Lopez JP, Roth GJ: Isolation of poly (A)⁺ mRNA from human platelets and neutrophils. *Blood* 70:891, 1987
56. Pancré V, Schellekens H, Van Der Meide P, Vorng H, Delanoye A, Capron A, Auriault C: Biological effect of interferon gamma during the course of experimental infection of rat by *Schistosoma mansoni*. *Cell Immunol* 125:58, 1990
57. Bruno E, Miller ME, Hoffman R: Interacting cytokines regulate *in vitro* human megakaryocytopoiesis. *Blood* 73:671, 1989
58. Peschel C, Paul WE, Ohara J, Green I: Effect of B cell stimulatory factor-1/interleukin-4 on hematopoietic progenitor cells. *Blood* 70:254, 1987

VIH ET SIDA

C'est en 1980 au San Fransisco General Hospital, que l'équipe du Dr MS Gottlieb détecta les premiers cas de Syndrome d'Immuno-Déficiencie Acquis (SIDA) chez de jeunes homosexuels. Le SIDA est devenu en 10 ans un fléau à l'échelle planétaire qui touche toutes les couches sociales. La situation la plus alarmante se situe actuellement dans les pays du Tiers-Monde. On estime à plus de 10 millions le nombre de personnes infectées par le rétrovirus Virus de l'Immuno-Déficiencie Humaine (VIH) et 500 000 cas de SIDA ont été répertoriés. L'explosion de cette maladie, à la fin des années 70, est vraisemblablement un phénomène dû à l'évolution de la société, et non la conséquence de l'apparition d'un nouveau virus; en effet, des études rétrospectives ont permis la détection du VIH chez l'homme dès 1959.^(84,85)

Le virus se transmet par les contacts sexuels, le sang et ses dérivés, de la mère à l'enfant à travers le placenta et peut-être aussi par le lait. Dans l'organisme, il peut rester, à l'intérieur des cellules qu'il infecte, dans une phase de latence plus ou moins longue. Néanmoins, sa présence entraîne une dégradation lente et progressive des fonctions immunes de la personne contaminée conduisant peu à peu à une immunosuppression profonde. On estime que 20 à 30% des personnes infectées développent un SIDA (apparition de maladies opportunistes, cancers, atteintes neurologiques), dans un délai de 5 ans et environ 50% dans un délai de 8 ans.

I. LE VIRUS.

C'est en 1980, que le premier rétrovirus humain, Human T cell Leukemia Virus 1 (HTLV-I) fut isolé, à partir des cellules d'un patient atteint d'un lymphome cutané.⁽⁸⁶⁾ Par la suite, les études entreprises dans de nombreux laboratoires pour mettre en évidence l'agent infectieux responsable du SIDA ont conduit à la caractérisation, par l'équipe de Dr F Barré-Sinoussi de l'Institut Pasteur de Paris, d'un autre rétrovirus humain le VIH.⁽⁸⁷⁾ Cette découverte fut confirmée peu de temps après par deux équipes américaines.^(88,89) En 1986, l'étude de patients africains souffrant du SIDA permit l'isolement d'un autre rétrovirus de type VIH, le VIH-2,⁽⁹⁰⁾ qui présente de fortes homologues avec le SIV (Simian Immunodeficiency Virus) responsable de l'apparition d'un SIDA chez le macaque, alors qu'il n'est pas pathogène chez son hôte habituel, le singe vert. ^(91,92) Le VIH partage d'autre-part, de nombreuses caractéristiques communes (morphologiques, biologiques, moléculaires) avec les *lentivirus* du mouton, du cheval ainsi qu'avec les virus de l'immunodéficience bovine (BIV) ou féline (FIV).⁽⁹³⁾

A. CLASSIFICATION

Les rétrovirus sont définis par leur capacité à rétrotranscrire leur ARN génomique monocaténaire en un ADN bicaténaire. La famille des rétrovirus comprend trois sous-familles définies selon des critères de pathogénicité: ⁽⁹⁴⁾

- Les ONCOVIRUS:

Les oncovirus sont responsables de la formation de tumeurs et de l'apparition de leucémies chez un grand nombre d'espèces animales. Les deux premiers rétrovirus humains caractérisés ont été rattachés à ce groupe et appartiennent à la famille des HTLV (Human T cell Leukemia Virus). HTLV-I est responsable de la leucémie T et de certains lymphomes cutanés;⁽⁹⁵⁾ HTLV-II, quant à lui, a été isolé dans le cadre d'une leucémie à tricholeucocytes (Hairy cells).⁽⁹⁶⁾ Le Feline Leukemia Virus (FeLV) et le Simian T cell Leukemia Virus (STLV) font également partie de cette sous-famille.

- Les LENTIVIRUS:

Ces rétrovirus sont associés à des maladies chroniques (pneumonies, arthrites, atteintes neurologiques et maintenant SIDA) sans rapport direct avec les cancers. Les VIH appartiennent à ce groupe. On connaît depuis longtemps le virus Visna du mouton et le Virus de l'Anémie Infectieuse Equine (EIAV).⁽⁹³⁾ Récemment, d'autres virus de cette sous-famille ont été mis en évidence, notamment les Feline, Bovine et Simian Immunodeficiency Virus (FIV, BIV et SIV). Ces derniers virus, comme leurs homologues humains HIV-1 et HIV-2, sont responsables d'une immunodéficience accompagnée de l'apparition de maladies opportunistes.

- Les SPUMAVIRUS

Détectés pour la première fois dans des cellules de singes qui dégénéraient en formant des syncytia avec d'importantes vacuoles, ils n'ont pas de

pathogénicité connue pour l'homme et sont présents chez de nombreux mammifères. L'un des représentants de cette sous-famille a été récemment cloné et séquencé.⁽⁹⁷⁾

B. STRUCTURE

La structure de VIH ressemble à celle de nombreux autres rétrovirus. La particule virale est constituée de 2 molécules d'ARN monocaténaire associées à des enzymes virales à l'intérieur d'une capsidie protéique elle-même entourée d'une enveloppe qui est formée de protéines virales et d'un fragment de membrane cellulaire.⁽⁹⁸⁾ (Figure 1)

C. ORGANISATION DU GENOME DE VIH

1- Gènes de structure

Chez les rétrovirus, par exemple l' Avian Leukemia Virus (ALV), les protéines nécessaires au cycle du virus sont codées par trois gènes différents.⁽⁹⁹⁾ Le gène *gag*, qui code les protéines structurales du virion; le gène *pol* (polymerase), qui code les enzymes nécessaires à la transcription inverse et à l'intégration du provirus; et enfin le gène *env* (enveloppe), qui code les glycoprotéines de surface du virion, responsables de la fixation et de la fusion du virus avec les cellules cibles et donc du tropisme du virus. Chez les rétrovirus complexes (*lentivirus*), il existe des gènes additionnels qui participent au cycle cellulaire du virus. En effet, celui-ci nécessite l'intervention d'un certain nombre

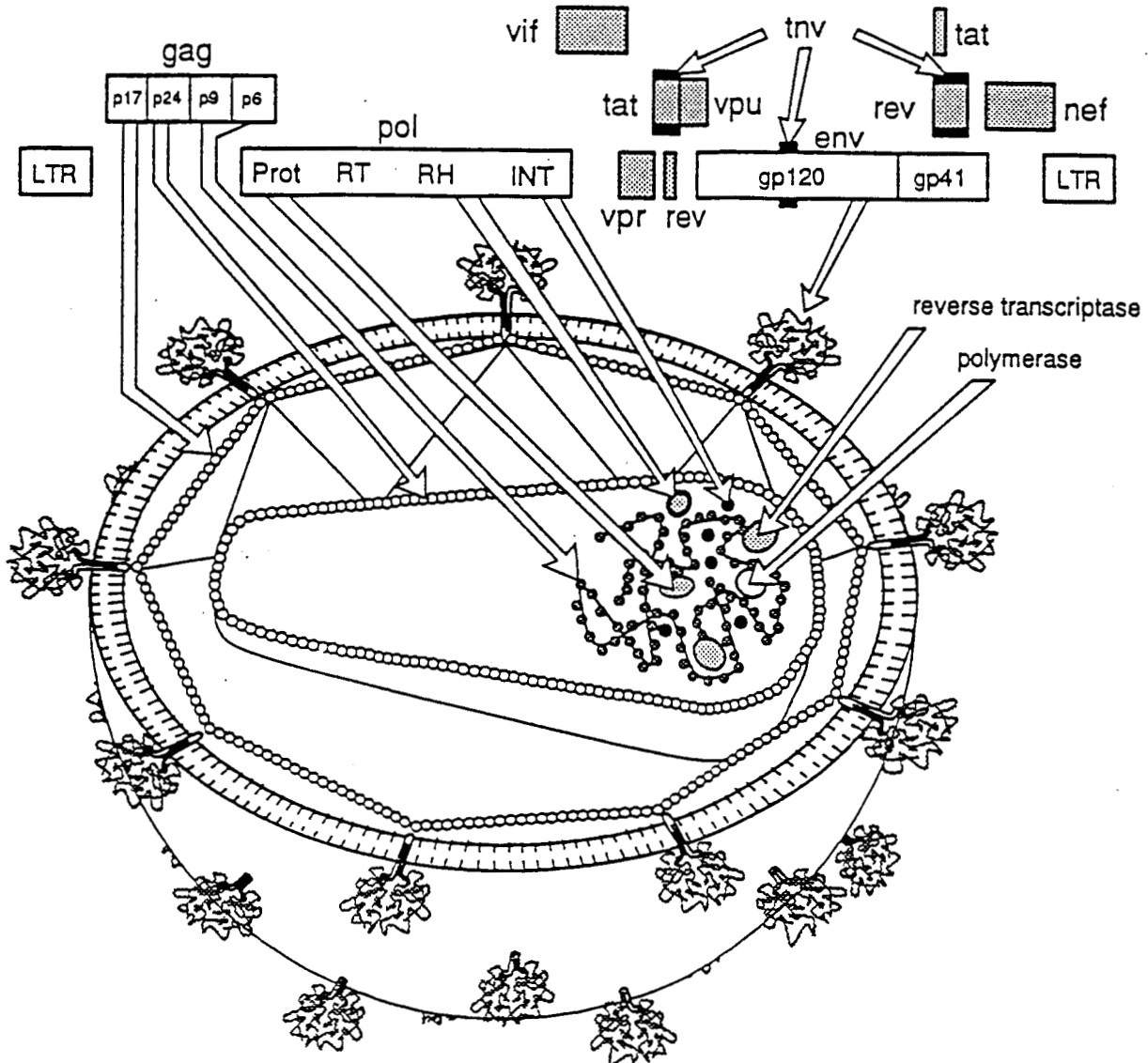


Figure 1: Schéma de la particule virale et du génome du VIH-1. Les gènes de régulation apparaissent en gris. La localisation des protéines structurales est indiquée par des flèches. D'après Haseltine FASEB J 5:2349, 1991.

de gènes auxiliaires, ce qui entraîne une organisation génomique plus complexe que chez les rétrovirus simples tel que ALV (Figure 2).

Le génome de HIV est long d'environ 10 kb et comporte à chacune de ses extrémités une séquence Long Terminal Repeat (LTR) générée pendant le processus de transcription inverse. Le LTR situé en 5' sert de promoteur pour la transcription du virus alors que le LTR situé en 3' est nécessaire à la poly-adénylation des transcrits viraux, ceux-ci donnant lieu après traduction, à la synthèse des protéines rétrovirales classiques:

-Le gène *gag* code un précurseur protéique de 55 kDa qui est clivé par la protéase du virus en:⁽¹⁰⁰⁾

- p6 et p9 qui sont des protéines associées à l'ARN viral;
- p17 qui constitue la matrice protéique de la face interne de l'enveloppe lipidique;
- p24 constituant le "core" protéique interne.

-Le gène *pol* qui code la transcriptase inverse/RNase H (p68), la DNA polymérase, la protéase (p10), et l'endonucléase/intégrase (p34).⁽¹⁰¹⁾

-Le gène *env* code un précurseur de 160 kDa qui sera clivé en gp120 et gp41 qui restent associées par des liaisons non covalentes au niveau de l'enveloppe.⁽¹⁰²⁾

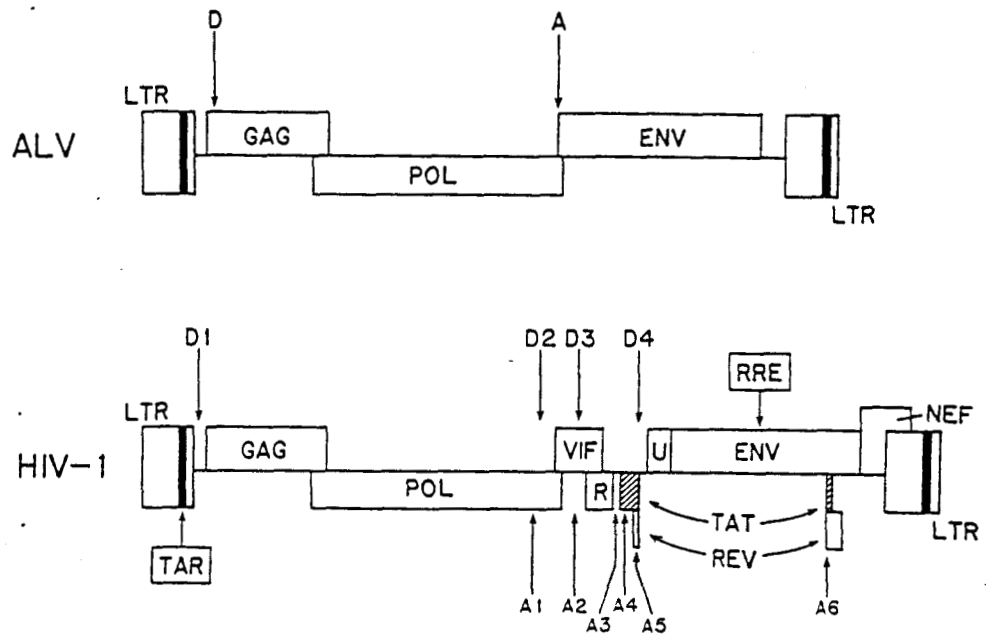


Figure 2: Comparaison de la complexité génétique de l'ALV et du VIH-1. La localisation des sites donneurs (D) et accepteurs (A) pour la maturation des ARNm, ainsi que les zones responsables de la fixation de Tat (TAR) et de Rev (RRE) sont indiquées. D'après Cullen et Greene, *Virology* 178:1, 1990.

2- Protéines régulatrices

A côté de ces protéines qui constituent le virion, on a pu démontrer que le virus, en utilisant les différents cadres de lecture possibles, code des protéines régulatrices (5 pour HIV-1 et 6 pour HIV-2). Ces molécules sont exprimées dans les cellules infectées et interviennent dans de nombreuses phases du développement viral: (102)

-*Tat* (transactivator) est une protéine de 14/16 kDa qui assure une régulation positive de la transcription;(103)

-*Rev* (regulatory of expression of virus) est une protéine de 13 kDa qui intervient dans la maturation des ARNm viraux;(103)

-*Vif* (virion infectivity factor) est une protéine de 24 kDa qui apparaît tardivement au cours de l'infection(104) et qui semble augmenter le caractère infectieux des particules virales,(105,106) peut-être en intervenant dans le clivage de la partie carboxyterminale de la gp41;(102)

-*Nef* (negative factor) est une protéine de 27 kDa produite très rapidement après l'infection.(107) Elle semble être responsable de l'inhibition de certains événements précoces de l'infection permettant ainsi l'installation d'une infection latente. L'étude de la fonction de *Nef* est le sujet de nombreux travaux contradictoires, notamment en ce qui concerne l'inhibition de la réplication virale.(108-110) Récemment, l'équipe de Kestler a démontré que la présence de *Nef* était essentielle pour la réplication et la pathogénicité de SIV.(111) Actuellement, la fonction de *Nef* reste obscure.

-*Vpr* (viral protein R) est une petite protéine produite tardivement dans l'infection. On trouve environ 100 molécules de *Vpr* par particule virale.(112,113)

Cette protéine est capable d'accélérer la réplication virale. Elle pourrait donc intervenir dans la transcription indépendante de Tat, intervenant juste après l'infection.⁽¹⁰²⁾

-*Vpu* (viral protein U) est responsable de l'exportation des particules virales à l'extérieur de la cellule.^(114,115) Elle joue donc un rôle important dans la dissémination du virus.

II. CYCLE DU VIRUS.(Figure 3)

A.PENETRATION DANS LES CELLULES:

1- Intervention de la molécule CD4

Le VIH présente un tropisme préférentiel pour les cellules exprimant la molécule CD4,^(116,117) qui s'explique par la forte affinité de sa glycoprotéine externe (gp120) pour cette molécule.⁽¹¹⁸⁾

Le CD4 est une glycoprotéine présente sur un grand nombre de cellules d'origine hématopoïétique.⁽¹¹⁸⁾ On la retrouve en faible quantité à la surface des monocytes, des macrophages, des cellules dendritiques et de certains mégacaryocytes.^(118,119) Par contre, elle est fortement exprimée par les lymphocytes immatures et par les lymphocytes matures de phénotype helper.⁽¹²⁰⁾

La fixation de la gp120 sur le CD4 de surface entraîne un changement de conformation du complexe gp120/gp41, qui permet la pénétration de la partie N-terminale de la gp41 dans la membrane de la cellule à infecter, déclenchant ainsi la fusion des membranes.^(102,121)

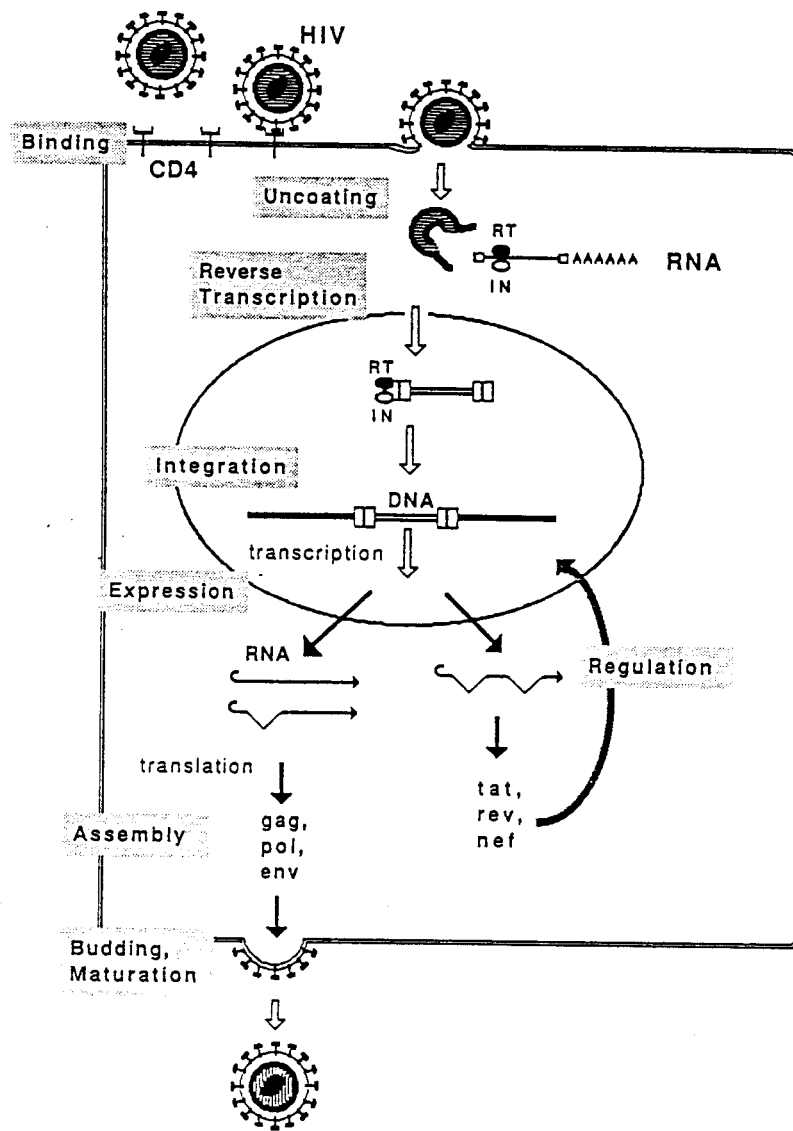


Figure 3: Schéma représentant les différentes phases du cycle cellulaire de VIH-1. D'après Pavlakis *New Biologist* 2:20, 1990

2- Autres modes de pénétration

Dans les cellules exprimant peu ou pas de CD4, d'autres modes d'infection sont susceptibles d'expliquer la pénétration du virus:

La particule virale recouverte d'anticorps,⁽¹²²⁾ ou de protéines du complément⁽¹²³⁾ pénètre dans les cellules par l'intermédiaire de la fixation de ces molécules sur leurs récepteurs de surface.

L'infection pourrait aussi être causée par la fixation du VIH sur les molécules de classe II du CMH, l'interaction directe du virus avec la membrane cytoplasmique, l'endocytose de virions et l'emperipolesis.⁽¹²⁴⁻¹²⁶⁾

En conclusion, l'interaction du CD4/gp120 constitue la voie royale de pénétration du virus dans les cellules, mais un grand nombre de processus d'efficacité moindre prennent le relais en l'absence de CD4.

B.SYNTHESE DU PROVIRUS

Après pénétration, la particule virale est transformée en un complexe nucléoenzymatique.⁽⁹⁸⁾ La transcriptase inverse présente dans les virions crée alors une copie d'ADN complémentaire de l'ARN du virus. Puis un second brin d'ADN est synthétisé pour former un ADN bicaténaire linéaire.^(127,128) Cette réaction a lieu dans le cytoplasme des cellules infectées au cours des 6 heures

suivant la pénétration du virus.(128,129)

C. INTEGRATION

L'intégration de l'ADN viral circulaire dans l'ADN cellulaire complète la phase précoce de l'infection. Cette opération met en jeu une enzyme d'origine virale présente dans la particule, l'intégrase qui possède trois activités:(130)

-préparation des extrémités de l'ADN bicaténaire viral pour la réaction de recombinaison;

-coupure de l'ADN de la cellule infectée;

-association des extrémités de l'ADN viral et de l'ADN génomique.

La finition est ensuite effectuée par les enzymes nucléaires de réparation.

Dans les lymphocytes T, l'intégration du VIH qui a pénétré dans la cellule, nécessite une étape d'activation lymphocytaire.(131)

L'ADN viral reste donc sous forme de provirus, associé de manière permanente au génome de la cellule infectée et entre dans une phase de latence plus ou moins prolongée.(132)

D. TRANSCRIPTION ET TRADUCTION

Après l'intégration, le provirus dépend pour son expression d'une enzyme cellulaire (la RNA polymérase de type II) et des mêmes mécanismes de régulation que les gènes cellulaires (induction, répression, épissage, maturation, transit, traduction). C'est l'activation ou la différenciation de la cellule infectée qui provoque le réveil du provirus.

La transcription s'effectue à partir d'un promoteur unique, situé dans la région U3 du LTR (5').

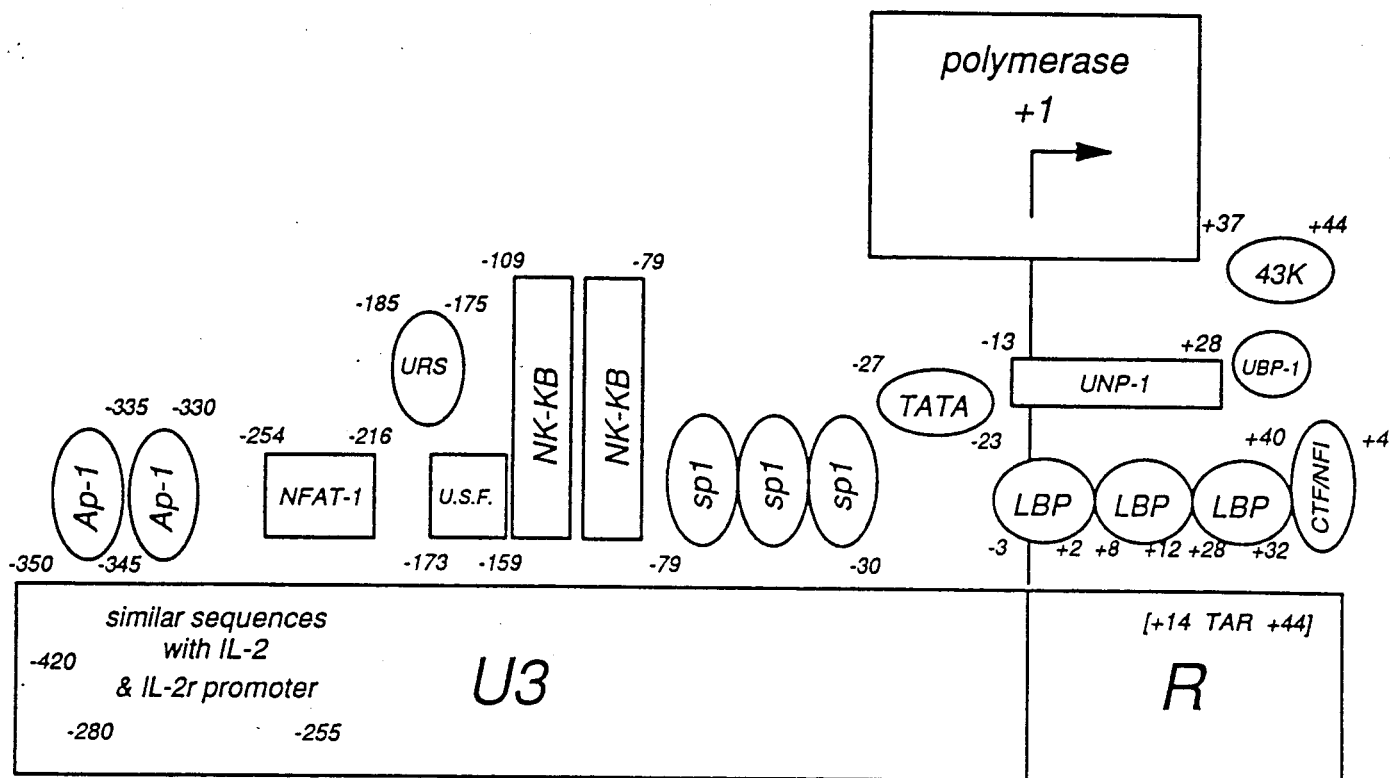
1- Structure du promoteur (Figure 4)

L'expression du virus débute avec la synthèse d'une copie (ARN) de l'ADN proviral. L'activité du LTR de VIH est faible dans la plupart des cellules et sous le contrôle positif ou négatif de protéines d'origine virale ou cellulaire. De nombreuses séquences reconnues par des facteurs de transcription constitutifs ou inductibles ont été caractérisées dans le promoteur de HIV-1.⁽¹⁰²⁾ (Figure 4)

2- Rôle des facteurs de transcription cellulaire

TFIID: Un motif classique TATAA est présent dans le promoteur de HIV-1, 27 bp avant le site d'initiation de la transcription. Des mutations opérées dans cet élément du promoteur provoquent une perte de l'activité basale et induite du LTR, probablement due à une baisse de la fixation de TFIID (facteur TATA). De plus, l'activation du LTR par la protéine E1A d'adénovirus semble faire appel à la TATA box.^(133,134)

Sp1: Trois sites consécutifs de fixation du facteur de transcription Sp1 sont présents entre les nucléotides -77 et -46 du LTR. Chacun de ces sites fixe Sp1.⁽¹³⁵⁾ La mutation de ces séquences entraîne une perte progressive de l'activité du LTR *in vitro*.⁽¹³⁶⁾



LTR

Figure 4: Différentes zones du promoteur du VIH-1 permettant l'interaction des facteurs de transcription cellulaire. La présence de séquences consensus pour ces protéines laisse supposer leur intervention dans le contrôle de la transcription du virus. D'après Haseltine FASEB J 5:2349, 1991.

NF- κ B: Deux motifs consensus de fixation pour NF- κ B ont été localisés entre les nucléotides -104 et -81 et possèdent les propriétés d'un "enhancer" (fonctionnement indépendant de la distance et de l'orientation).^(137,138)

NF- κ B est un facteur de transcription inductible qui joue un rôle central dans l'activation d'un grand nombre de gènes impliqués dans la réponse cellulaire aux infections et aux agressions.⁽¹³⁹⁾ Ces gènes comprennent ceux des cytokines (GM-CSF, IL2, IL6, TNF, IFN- β) et des récepteurs de surface (IL2-Rc, CMH-I).⁽¹⁰²⁾ Dans la plupart des cellules, NF- κ B est exprimé sous une forme cytoplasmique inactive constituée de trois sous-unités de 50, 65 et 37 kDa.⁽¹⁴⁰⁾ La protéine de 37 kDa, appelée I- κ B, sert à maintenir le complexe protéique sous une forme cytoplasmique inactive. La phosphorylation de I- κ B induit la séparation des sous-unités et la migration vers le noyau des protéines de 50 et 65 kDa. La sous-unité de 50 kDa qui semble porter la spécificité d'interaction avec l'ADN appartient à une famille de protéines régulatrices qui inclut également l'oncogène *rel* et le produit du gène dorsal de la *Drosophile*.⁽¹⁴⁰⁾

Un grand nombre de stimulations activent NF- κ B, parmi lesquels les esters de phorbol, les mitogènes des cellules T, le LPS ainsi que certaines cytokines (IL1, TNF). D'autre-part, les espèces radicalaires oxygénées et les thiols semblent jouer un rôle essentiel dans ces processus d'activation.⁽¹⁴¹⁾

La délétion ou la mutation des sites de fixation de NF- κ B au niveau du LTR de VIH-1 entraînent une baisse importante voire une perte totale de son activation par les mitogènes T, le TNF, le PMA et la protéine Tax de HTLV-I.⁽¹⁴²⁻¹⁴⁴⁾

De même, la modification ou la délétion de tout ou partie des sites de fixation pour NF- κ B ou Sp1 causent une perte de la capacité du virus à entraîner une infection productive *in vitro*.⁽¹³⁶⁾

NFAT-1: Un site de fixation pour Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT-1) a également été localisé dans le LTR de VIH. NFAT-1 est un facteur de transcription synthétisé *de novo* lors de la stimulation des cellules T, qui contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes nécessaires à l'activation T.⁽¹⁴⁵⁾ Ce site de fixation pour NFAT-1 intervient dans la stimulation du LTR dans les cellules T, en réponse aux mitogènes.⁽¹⁴⁴⁾

NRE: La délétion de la partie 5' du LTR de VIH-1 est à l'origine d'une augmentation significative de son activité transcriptionnelle. Ces expériences ont permis la mise en évidence du site Negative Responsive Element (NRE) (-360,-140), qui fixe entre autre une protéine cellulaire de 50 kDa situé entre les nucléotides -173 et -159 .^(146,147) Une séquence similaire fixant la même protéine a été également décrite dans le promoteur de l'IL2-Rc.⁽¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾

D'autres sites de fixation pour divers facteurs de transcription (AP1, LBP) ont été localisés dans le LTR de VIH-1. Néanmoins, leur fonctionnalité reste à établir.⁽¹³¹⁾

3- Synthèse des ARN viraux

Dans les cellules chroniquement infectées, on observe 3 classes d'ARNm viraux (+ de 30 espèces) (Figure 5):^(102,150)

- un ARNm "full-length" de 9,3 kb qui code *gag* et *pol*
- un mélange d'ARNm de 4 kb (+de 12 types) qui codent *env*, *vpr*, *vpu*, *vif* et *Tat* (14 kDa).
- un mélange d'ARNm de 2 kb (+ de 12 types) issus de la maturation totale de l'ARNm de 9,3 kb et qui codent *Tat* (16 kDa), *nef* et *Rev*.

L'ensemble de ces ARNm est issu de la combinaison de différents exons et sont mono ou multicistroniques.⁽¹⁵⁰⁾ Ce type d'organisation permet la synthèse d'un grand nombre de protéines, parfois de taille importante, à partir d'un génome relativement petit.

La seule stimulation du promoteur du VIH par les facteurs de transcription cellulaire ne permet pas la production de virions. En effet, le cycle cellulaire du virus nécessite l'intervention de 2 "RNA binding protein" virales *Tat* et *Rev*.⁽¹⁰³⁾

L'activation du LTR provoque la transcription d'un ARNm de 9,3 kb qui est aussitôt mûri en l'espèce de 2 kb, ce qui permet la synthèse des protéines de régulation et en particulier de *Tat*.

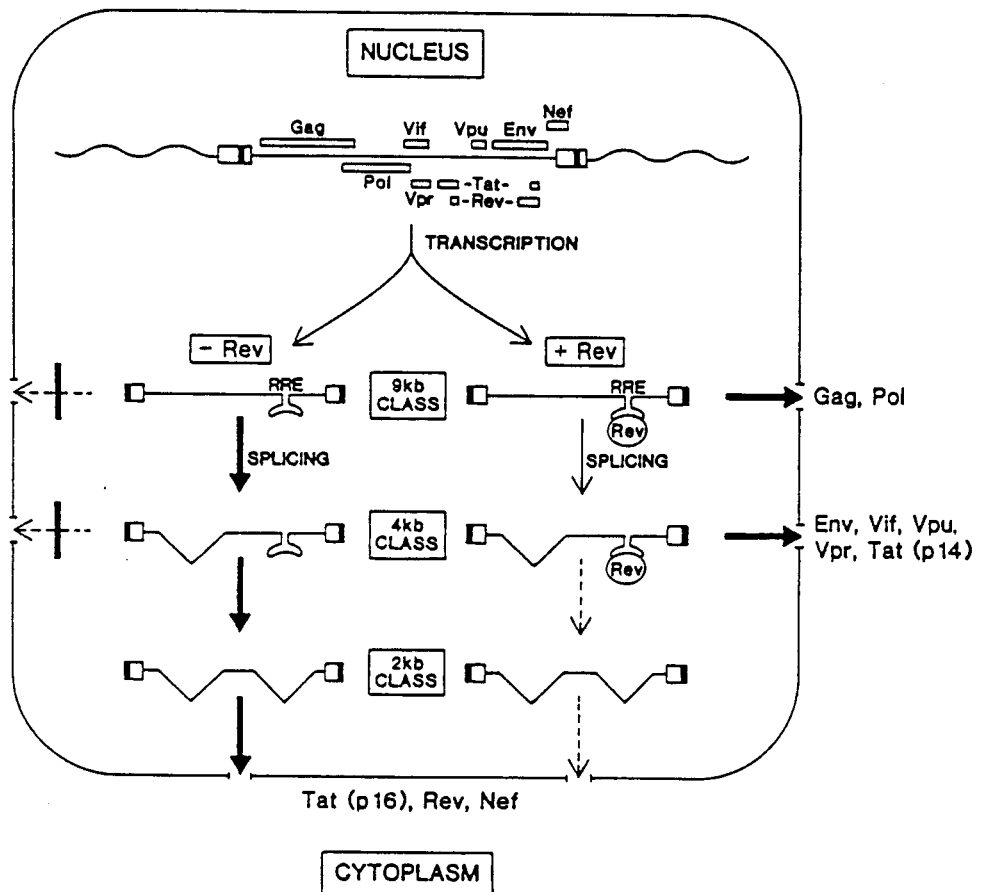


Figure 5: Schéma représentant la fonction de Rev. Les patterns nucléaire et cytoplasmique des ARNm du VIH-1 en l'absence (gènes précoces) et en présence de Rev (gènes tardifs) sont indiqués. D'après Cullen FASEB J 5:2361, 1991.

4 Rôle de la protéine *Tat*

Cette "RNA-binding protein" est responsable de l'amplification de la transcription. Elle se localise dans le noyau des cellules infectées⁽¹⁵¹⁾ et se fixe, avec l'aide de certains facteurs cellulaires,^(146,152,153) à la séquence TAR (Transactivation Response) présente entre les nucléotides +1 et +60 de tous les ARN viraux.⁽¹⁵²⁾

Trois fonctions différentes ont été attribuées à *Tat*:

- Facteur anti-terminaison;

Tat améliore la stabilité du complexe RNA polyméraseII / DNA au cours de la transcription et donc, améliore son rendement.^(103,121)

- Intervention de *Tat* comme facteur de transcription.

TAR peut être considérée comme un "RNA-Enhancer".⁽¹⁰³⁾ En association avec des facteurs cellulaires, la fixation de *Tat* sur TAR entraîne la formation d'un complexe multimérique qui agit au niveau du promoteur et/ou de l'enhancer (Figure 6).^(103,155) D'ailleurs, l'activité transactivatrice de *Tat* nécessite une organisation particulière du promoteur TATA et des enhancers au sein du LTR.⁽¹³³⁾ En effet, si l'on remplace la zone TATA du promoteur de VIH par les zones TATA d'autres promoteurs, le taux basal de transcription est maintenu, mais on perd l'activité transcriptionnelle de *Tat*.⁽¹³⁶⁾

La présence du gène *Tat* et de son élément de réponse TAR est essentielle pour la réplication du virus *in vitro*.⁽¹⁵⁶⁾

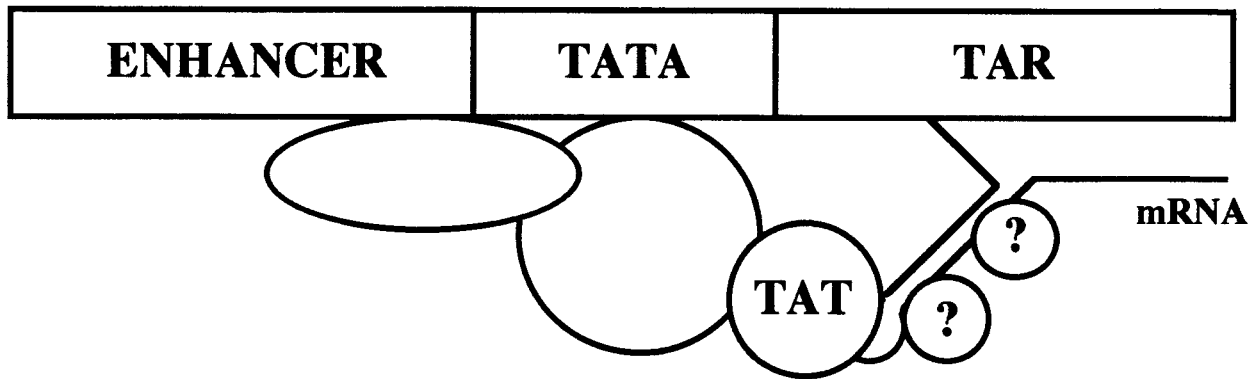


Figure 6: Modèle hypothétique du complexe multimérique induit par Tat au niveau du promoteur du VIH. Les protéines impliquées ne sont pas caractérisées actuellement. D'après Rosen TIGS 7:9, 1991.

- Intervention de *Tat* à un niveau post-transcriptionnel

Cet effet a été décrit mais son mécanisme demeure non élucidé.⁽¹⁰³⁾

5- Rôle de la protéine *Rev* (Figure 5)

L'action de *Tat* entraîne l'emballement du système et donc une production massive d'ARNm de 2kb, ce qui provoque l'accumulation des protéines régulatrices et en particulier de *Rev*.

Au-dessus d'un certain taux,⁽¹⁵⁷⁾ cette protéine entre en action et interagit de manière spécifique avec l'ARN viral au niveau d'une séquence de 264 nucléotides, le Rev Responsive Element (RRE) présent dans le gène *env*.⁽¹⁵⁸⁾ Cette interaction nécessite néanmoins l'intervention d'un composant de la machinerie nucléaire de maturation ou de transport des ARN.⁽¹⁵⁹⁾

Elle empêche alors la maturation totale des ARNm,⁽¹⁶⁰⁾ facilite leur transit vers le cytoplasme et augmente leur traduction. ^(161,162)

Rev provoque donc un déplacement de l'expression des ARNm précoces, complètement maturés de 2 kb, vers les ARNs d'expression tardive comprenant l'ARN non maturé de 9 kb et les ARN incomplètement maturés de 4 kb. Cette transition permet la production de protéines de structure et donc la synthèse de virions.^(161,162) En l'absence de *Rev*, seul les ARN de 2 kb sont exprimés^(163,164) et des virus mutants dépourvus du gène *Rev* se révèlent incapables de produire du virus.⁽¹⁶⁵⁾

La latence du virus pourrait donc être la conséquence du maintien de *Rev* à

un taux suboptimal. Ce taux reflèterait en fait l'absence de facteurs de transcription critiques pour l'expression efficace des gènes sous la dépendance du LTR.

D'autre-part, l'action de Rev entraîne une baisse de la synthèse des ARNm de 2 kb et donc de la traduction de Rev et de Tat. Le maintien d'un taux élevé de Tat est assuré par la traduction de celle-ci (14 kDa) à partir de l'ARNm de 4 kb et assure donc le maintien de l'activation du promoteur.

Par contre, la baisse du taux de Rev provoque peu à peu un retour vers l'expression des ARNm de 2 kb, on observe donc une réplication virale de type sinusoïdal.

E. ASSEMBLAGE

L'ARN génomique de VIH-1 (9,2 kb) sert de matrice à la traduction des précurseurs de *gag* (55 kDa) et de *gagpol* (160 kDa).⁽¹⁶⁶⁾ Ces précurseurs sont ensuite clivés par la protéase du virus (codée par la partie 5' de *pol*) pour donner les différentes protéines de structure et les enzymes nécessaires aux premières phases de la réplication.⁽¹⁶⁷⁾ L'ARN maturé de 4 kb est, quant à lui traduit sous la forme d'un précurseur *env* (90 kDa), qui après glycosylation atteint une masse moléculaire de 160 kDa.⁽¹⁶⁸⁾ Celui-ci est ensuite coupé par une protéase cellulaire au niveau d'un site riche en acides aminés basiques pour donner la glycoprotéine externe (gp 120) et la protéine transmembranaire (gp 41).⁽¹⁶⁹⁾ L'accumulation de *gag* à la face interne de la membrane cytoplasmique s'accompagne de l'apparition

de *env* à la face externe de la membrane cellulaire. On a ensuite formation des virions par bourgeonnement (Figure 7).⁽¹⁰²⁾

F. ACTIVATION DU VIH

Après l'infection par le VIH, le virus peut être détecté chez les patients pendant une courte période. Puis son titre diminue rapidement, parallèlement à l'augmentation des anticorps. Le virus circulant n'est détectable que cycliquement, ou lors de l'évolution terminale de la maladie. Durant la phase de latence clinique du virus, seules des techniques sensibles telle que la Polymerase Chain Reaction (PCR) permettent de détecter la présence du provirus intégré.⁽⁹⁹⁾

Au niveau cellulaire, le passage de l'état latent du virus à sa production active fait suite à la stimulation de la cellule qui l'héberge.

Outre l'IL2 et les mitogènes qui déclenchent l'hyperactivation ou le réveil du provirus dans les cellules T infectées, d'autres facteurs exercent le même type d'effets dans d'autres types cellulaires.⁽⁹⁹⁾

1- Facteurs influençant la production de virus

a) Les cytokines.

Parmi les facteurs susceptibles d'intervenir dans la pathogénie du VIH, les cytokines tiennent une place particulièrement importante. Ces molécules sont très importantes pour la régulation de la réponse immune et sont utilisées par le virus.⁽¹⁷⁰⁾

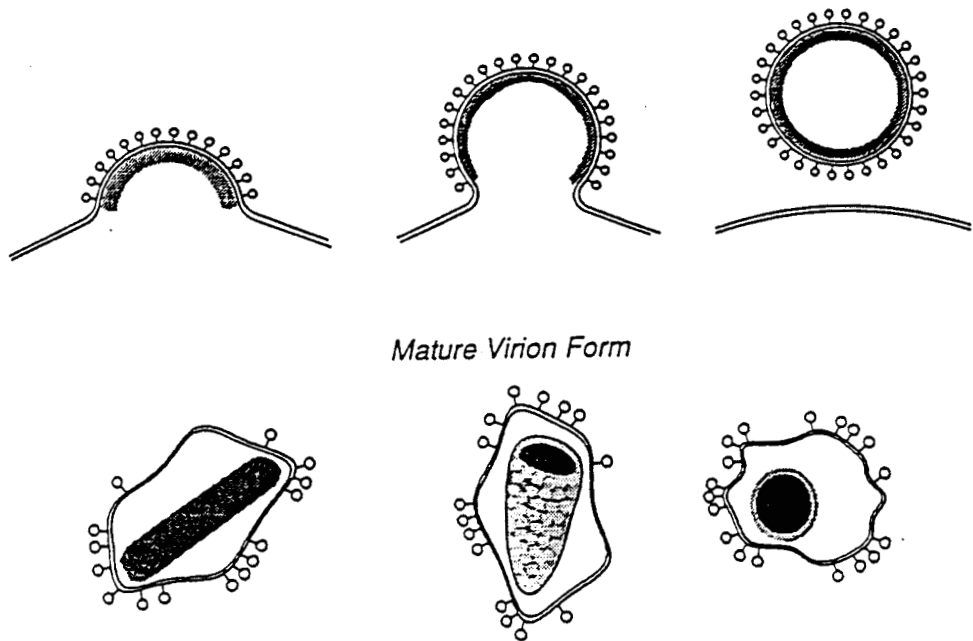


Figure 7: Schéma du "budding" et de la libération des particules virales de VIH-1. D'après Haseltine FASEB J 5:2349, 1991.

Elles sont capables d'augmenter la production de virus par l'intermédiaire de mécanismes transcriptionnels, c'est le cas de l'IL1, de l'IL2 et du TNF- α sur les cellules d'origine lymphocytaire T, monocytaire ou mégacaryocytaire,^(99,171-175) ou post-transcriptionnels, cas de l'IL6 et du GMCSF dans les cellules monocytaires.^(176,177) Des résultats contradictoires ont été publiés, sur le rôle du TGF- β dans la production du VIH. En effet, cette molécule s'est révélée capable d'inhiber la production constitutive ou induite (PMA) de VIH dans une lignée monocytaire chroniquement infectée.⁽¹⁷⁸⁾ A l'inverse, nos résultats et ceux de deux autres équipes font apparaître le TGF- β comme un très puissant stimulant de la production de virus dans les cellules d'origine T, monocytaire ou mégacaryocytaire.⁽¹⁷⁹⁻¹⁸¹⁾

Les cytokines sont par ailleurs capables d'agir en synergie sur la production de virus. C'est le cas en particulier du TNF- α avec l'IL6 ou le TGF- β .^(177,181)

A l'inverse, les interférons (α et γ) sont capables d'inhiber la production de virus par des cellules infectées d'origine lymphocytaire, monocytaire ou mégacaryocytaire.^(173,182) Les IFNs agissent de manière pré-transcriptionnelle (sur l'infection) ou post transcriptionnelle (sur la formation des virions).⁽¹⁸²⁻¹⁸⁵⁾

L'action des cytokines semble d'autant plus importante que leurs taux circulants et/ou leur production par les cellules du système immunitaire sont augmentés chez les personnes infectées.^(174,186,187)

b) Virus et bactéries

Certains virus (HTLV-I, CMV, EBV, HSV-1, HSV-2 et HHV-6) augmentent la réplication du VIH *in vitro*, au cours d'expériences de transfection ou de co-infection.^(141,188-191) Une partie de ces virus active le promoteur du VIH via les sites Sp1, NF-κB ou la TATA-box.

Le rôle de ces pathogènes n'est pas à négliger dans le cas d'une évolution du stade asymptomatique vers le SIDA. Ils sont présents chez les personnes infectées par le VIH et on les observe fréquemment dans les cellules hébergeant le VIH.^(99,192) Certaines bactéries et/ou leurs composants augmentent également la production de virus.^(193,194)

c) Les stress

Tout stress d'une cellule infectée engendre la production de virus. C'est le cas des UV,⁽¹⁹⁵⁾ des chocs thermiques,⁽¹⁹⁶⁾ ou de la mitomycine. Dans le cas des UV et les chocs thermiques, NF-κB est impliqué.^(196,197)

III. CONSEQUENCES DE L'INFECTION DE L'ORGANISME PAR LE VIH.

La diminution des lymphocytes T CD4/Helper-Inducer est le point critique de la pathogénèse de l'infection de l'homme par le VIH.⁽⁹⁹⁾

Ces cellules jouent un rôle pivot dans l'induction et le contrôle de la réponse immune, et les dommages qui leur sont infligés directement ou indirectement par le virus entraînent une immunosuppression sévère, d'où l'apparition de

nombreuses maladies opportunistes qui sont avec les atteintes neurologiques les principales causes de morbidité du SIDA.

A. INFECTION ET ATTEINTE DES LYMPHOCYTES T CD4

La baisse du nombre de lymphocytes T CD4 chez les personnes infectées par HIV, est lente et progressive; néanmoins, ces cellules présentent des anomalies fonctionnelles précoces.⁽⁹⁹⁾ De nombreuses hypothèses rendent compte de la disparition et des dysfonctionnements observés *in vivo*.

1- Destruction par le virus

In vitro, l'infection des LcT CD4 et des lignées lymphocytaires par le VIH conduit rapidement à leur destruction par la formation de syncytia, qui sont la conséquence de l'interaction du CD4 avec la gp120.^(99,198) Cependant, si des syncytia sont observables *in vivo*, ils sont majoritairement d'origine monocyto-histiocytaire.⁽¹⁹⁹⁾ De plus, lorsque le taux de Lc T commence à baisser, seule une très faible proportion de ces cellules est infectée (1/10000 à 1/100000).⁽²⁰⁰⁾ C'est pourquoi, on peut vraisemblablement écarter l'intervention de la formation de syncytia ou d'un excès de production de virus dans la destruction des Lc T dans les stades précoces de la maladie. Ces mécanismes peuvent par contre entrer en jeu au cours des stades tardifs de la maladie et en particulier lors de la montée de la virémie. On observe alors une nette augmentation du nombre de cellules infectées *in vivo*.^(201,202)

2- Autres possibilités

Une partie des anomalies des Lc T est attribuée à la présence d'anticorps ou de Lc T cytotoxiques dirigés contre eux, ainsi qu'à l'apparition de Lc T suppresseurs.(99,203,204)

Récemment, une hypothèse particulièrement intéressante a été formulée par le Dr JC Ameisen et le Pr A Capron.⁽²⁰⁵⁾ Elle implique la réactivation dans les cellules T des patients asymptomatiques du processus d'apoptose gouvernant l'élimination thymique des cellules T auto-réactives. Cette hypothèse a été démontrée par la suite par Dr H. Groux *et al*,^(206,207) dans notre laboratoire. En effet, en présence d'un antigène, les cellules T des patients meurent par apoptose au lieu de proliférer. Les raisons de la résurgence de ce programme de mort cellulaire ne sont pas connues. Ces travaux ont l'avantage d'expliquer à la fois les anomalies fonctionnelles observées précocément, mais aussi la diminution progressive de leur taux et l'apparition de trous dans le répertoire T.⁽²⁰⁸⁾

B. INFECTION DES MONOCYTES ET DES MACROPHAGES

L'infection des monocytes/macrophages par VIH peut avoir lieu par l'intermédiaire du CD4 présent à leur surface, par phagocytose ou par opsonisation.⁽²⁰⁹⁾ On a pu mettre en évidence l'infection de lignées monocytiques et promyélocytiques, de monocytes périphériques, et de macrophages alvéolaires.⁽²¹⁰⁻²¹²⁾ D'autre part, on a détecté du VIH au niveau des monocytes/macrophages sanguins, du cerveau, et du poumon de patients

infectés.⁽⁹⁹⁾

In vitro, les monocytes infectés se comportent de manière très différente des lymphocytes. En effet, l'infection est persistante sans apparition de syncytia.⁽²¹³⁾

Cependant, les monocytes/macrophages de patients infectés par VIH présentent quelques dysfonctionnements,⁽⁹⁹⁾ qui sont en partie la conséquence d'une mauvaise fonction helper,⁽⁹⁹⁾ mais la majorité de leurs capacités restent intactes.^(99,214-216)

C. AUTRES CELLULES INFECTÉES PAR LE VIH

On peut citer les autres cellules de l'organisme exprimant le CD4.⁽¹¹⁸⁾ L'infection de cellules neurorétiniennes, de cellules cervicales, de cellules de Langerhans, et de cellules dendritiques a été observée *in vivo*.^(99,217-219) De nombreuses lignées tumorales d'origine colorectale, gliale, musculaire, mégacaryocytaire se sont révélées infectables *in vitro*.^(174,220-222)

L'infection de ces cellules laisse supposer des effets directs du virus à leur niveau et donc permettrait d'expliquer certaines pathologies associées au SIDA.

D. INFECTION DES CELLULES DE LA MOELLE OSSEUSE

Des anomalies hématologiques sont fréquemment observées chez les patients infectés par le VIH.⁽²²³⁻²²⁵⁾ En plus de l'effondrement du taux de lymphocytes

CD4 caractéristique du SIDA, on observe une baisse des leucocytes, des plaquettes, ainsi qu'une anémie et de profondes modifications de la moelle.⁽²²³⁻²²⁶⁾ La physiopathologie de cette pancytopénie n'est pas parfaitement comprise et a conduit à la publication de nombreux résultats contradictoires.

Les anomalies hématologiques apparaissent très tôt dans l'évolution de la maladie et ne peuvent être dues aux infections opportunistes, qui sont responsables de ce type de trouble dans le stade SIDA.⁽²²⁷⁾

Au niveau de la moelle, l'utilisation des techniques de PCR et d'hybridation *in situ* a permis la détection du VIH dans les lymphocytes CD4, les monocytes/macrophages et les mégacaryocytes.⁽²²⁸⁻²³⁰⁾ Les progéniteurs de la moelle sont par ailleurs infectables *in vitro* mais la production de virus nécessite la différenciation des cellules souches en monocytes/macrophages.⁽²³¹⁾ La production de virus par ces cellules pourrait être rendue responsable d'une partie de la baisse de leurs taux circulants.

Le nombre de progéniteurs hématopoiétiques (CFU), y compris les progéniteurs pluripotents, est fortement diminué au niveau de la moelle et dans le sang.^(223,232) Cette chute a plusieurs explications:

- l'intervention d'anticorps ou de Lc T cytotoxiques;^(232,233)
- la présence de facteurs inhibiteurs de l'hématopoïèse, en particulier du TNF- α , de l'IFN- α , et du TGF- β dont la production augmente chez les personnes infectées;^(186,187,47, 234,235)
- l'absence de facteurs essentiels au développement des progéniteurs pouvant

rendre compte des anomalies observées. Par les facteurs qu'elles libèrent, les cellules du stroma de la moelle, au même titre que les monocytes/macrophages et les lymphocytes sont essentielles à la prolifération des CFU.⁽¹⁾ La présence du VIH au niveau de ces cellules pourrait entraîner une perte de leur activité régulatrice. Dans ce contexte, Scadden *et al* ont démontré que ces cellules sont infectables par le VIH.⁽²³⁶⁾ L'administration de GM-CSF par exemple améliore le taux de cellules circulantes et de progéniteurs chez les malades.⁽²³⁷⁾

En plus de l'origine centrale des thrombopénies associées au VIH, on observe une destruction périphérique des plaquettes mettant en jeu des auto-anticorps ou le dépôt de complexes immuns à la surface des thrombocytes.⁽²³⁸⁾

IV. CONCLUSIONS.

Même si le virus peut être rendu directement responsable d'une partie des troubles hématologiques et immunologiques observés au cours du SIDA, leurs causes sont pour le moins multi-factorielles et incomprises à ce jour. Le virus provoque une profonde perturbation des fonctions de l'organisme et en particulier du système immunitaire, qui aboutit à l'apparition de nombreuses maladies opportunistes, principales causes de morbidité avec les atteintes neurologiques.

L'ensemble des travaux effectués à ce jour sur le VIH a permis une bonne compréhension de la biologie de ce rétrovirus et la découverte d'un grand

nombre de phénomènes d'ordre fondamental en immunologie, hématologie, et en biologie cellulaire et moléculaire. Néanmoins, les mécanismes intimes gouvernant le déclenchement de la maladie ne sont pas encore élucidés, d'où la nécessité de poursuivre des études fondamentales sur cette infection.

RESUME/CONCLUSIONS DE L'ARTICLE N°2 ET 3

La disparition progressive des lymphocytes T CD4, principales cibles de l'infection par le VIH, est la cause du SIDA.⁽⁹⁹⁾ Mais cette baisse des fonctions immunes, qui provoque l'apparition de nombreuses maladies opportunistes, s'accompagne d'autres manifestations, en particulier des désordres hématologiques.⁽²²³⁻²²⁵⁾

Parmi ces modifications, on observe l'apparition d'une thrombopénie, qui à la différence des autres cytopénies, peut survenir à tous les stades d'évolution de la maladie et constitue parfois le seul signe de la présence du virus. L'origine de cette baisse des plaquettes est multifactorielle, et implique la destruction périphérique des plaquettes ainsi que la diminution de la thrombopoïèse.⁽²³⁸⁾ Des études récentes ont par ailleurs mis en évidence des mégacaryocytes infectés ou abîmés dans la moelle osseuse de personnes infectées par le VIH.^(226,230)

L'étude approfondie de l'infection des cellules de la lignée plaquettaire demeure limitée par les difficultés rencontrées lors de l'isolement et la culture de ces cellules. Dans ce contexte, nous avons décidé d'étudier l'infection de la lignée mégacaryocytaire Dami par le VIH-1.

Nous avons démontré que ces cellules, en dépit d'une expression du CD4 très faible, voire inexistante, sont parfaitement infectables par la souche HTLV-III_B de VIH-1. On observe une production importante de virus totalement fonctionnel (induction d'effets cytopathogènes dans les lignées T) pendant plus d'une année sans apparition d'effets cytopathogènes, ni de modifications du cycle cellulaire ou de l'expression des marqueurs plaquettaires. Les taux d'ARN et de protéines virales sont augmentés par le TNF- α et le TGF- β 1 alors que les IFNs

exercent un effet inhibiteur. Comme dans les lymphocytes et les monocytes, l'action du TNF- α semble être la conséquence de la transactivation du LTR du virus via NF- κ B. Le TGF- β quant à lui n'agit pas directement sur le promoteur et nécessite la présence de tout ou partie du génome viral. Cet effet est néanmoins proche de la transcription puisque le TGF- β induit une augmentation importante du taux des ARNm viraux.

L'ensemble de nos résultats indique donc que des cellules d'origine mégacaryocytaire sont infectables *in vitro* par le VIH-1 et que cette infection est modulable par des médiateurs du système immunitaire. L'absence d'effets cytopathogènes et de modifications de l'expression des marqueurs de différenciation plaquettaire ne permet pas actuellement d'impliquer une action directe du virus sur la thrombopoïèse.

Parallèlement à notre étude, une autre équipe a mis en évidence l'infection productive de la lignée mégacaryocytaire CMK par le VIH-2 mais pas par le VIH-1.⁽²²²⁾ Nous ne possédons pas actuellement d'hypothèse concernant cette différence, mais il faut noter que l'infection des mégacaryocytes *in vivo* n'a été actuellement décrite que pour le VIH-1. Comme dans le cas de la lignée Dami, ces auteurs n'ont pas observé d'effets cytopathogènes, ni de modifications de l'expression des marqueurs plaquettaires.

En considérant le fait qu'il est très difficile d'obtenir une quantité suffisante de mégacaryocytes purs, ces lignées peuvent constituer un modèle intéressant pour l'étude de la régulation de la production et de l'infection par le VIH dans les cellules d'origine mégacaryocytaire. Elles peuvent également présenter un intérêt pour les études pharmacologiques.

ARTICLE N°2

**PRODUCTIVE HIV-1 INFECTION OF MEGAKARYOCYTIC CELLS IS
ENHANCED BY TUMOR NECROSIS FACTOR- α .**

By Didier Monté, Hervé Groux, Bebisoa Raharinivo, Bénédicte Plouvier, Joelle Dewulf, Thierry Clavel, Corinne Grangette, Gérard Torpier, Claude Auriault, André Capron, Jean-Claude Ameisen.

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

Unité mixte INSERM 167-CNRS 624

Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex (FRANCE)

This work was supported by INSERM, CNRS, ARC and ANRS. Didier Monté is a fellow of Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS).

ACKNOWLEDGMENTS: The authors thank Christian Drolez, Liu Jinly and Françoise Cottrez for expert technical assistance, Dr M Houache-Labalette for FACS analysis and Drs R Lafyatis, JL Virelizier and F Arenzana-Seisdedos for helpful comments and review of the manuscript. We acknowledge the following investigators for their gifts:

Drs P Frachet and G Marguerie for GP IIb and IIIa cDNA probes

Drs F Arenzana-Seisdedos and JL Virelizier for HIV-1-LTR constructs

Drs F Traincard and JC Mazié for the 25-C-90 monoclonal antibody directed against the HIV-1 p24 protein

Dr SM Greenberg for the Dami cell-line.

CORRESPONDENCE:

Adress correspondence to Dr Didier Monté

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité mixte INSERM U167-CNRS 624, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. A. Calmette, 59019 Lille Cedex (FRANCE). Telefax: 20 87 78 88

ABSTRACT

Recent findings have indicated that megakaryocytes may be susceptible to HIV infection, suggesting a potential role for megakaryocytes as viral reservoirs in HIV-infected patients. We report that the megakaryocytic cell-line Dami could be productively infected with the HTLV III-B strain of HIV-1, in 26 different experiments (results from 16 experiments are shown); productive infection lasted up to 30 weeks. Despite a lack of detectable surface expression of the CD4 molecule, and very low levels of CD4 mRNA, between 40% and 60% of megakaryocytic cells produced viral proteins after contact with HIV-1. Neither cytopathogenic effects nor syncytia formation were observed. The production of high levels of functional viral particles was indicated by analysis of p24 protein levels, reverse transcriptase activity, ultrastructural studies, and by the capacity of supernatants from infected Dami cells to infect the Molt-4 T lymphocytic cell-line. HIV-1 RNA and protein levels in infected Dami cells were enhanced by treatment with tumor-necrosis-factor- α (TNF- α), and decreased by treatment with interferon- α and γ . Transient transfection of the megakaryocytic cells with various constructs of the HIV-1 promoter (LTR) linked to the luciferase reporter gene suggested that the effect of TNF- α was related, as in monocytic and T cell-lines, to transactivation of the enhancer region of the HIV-1 LTR. These findings indicate that signals provided by the immune system may modulate HIV-1 expression in cells of the megakaryocytic lineage.

INTRODUCTION

Thrombocytopenia, is a common finding in patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV).⁽¹⁾ Its cause is believed to be multifactorial, involving immune-mediated peripheral platelet destruction, as well as impaired thrombocytopoiesis.⁽¹⁾ Recent studies have indicated that megakaryocytes may be a target for HIV infection,⁽²⁻⁴⁾ suggesting both a potential mechanism for defective thrombopoiesis, and a role for megakaryocytes as viral reservoirs in the bone marrow. Investigation of the expression of the CD4 molecule, the high affinity receptor for HIV, on megakaryocytes has led to diverging results,^(5,6) expression being at best detected in about 25% of this cell population.⁽⁶⁾ *In situ* hybridization studies by Zucker-Franklin and Cao⁽²⁾ have allowed the identification of the HIV type 1 (HIV-1) virus RNA in megakaryocytes from HIV infected patients. Recently, Sakagushi *et al* ⁽⁴⁾ have reported that certain clones of the megakaryocytic cell-line CMK⁽⁷⁾ that expressed the CD4 molecule could be productively infected *in vitro* with HIV type 2 (HIV-2) strains. Susceptibility of CMK cells to the HTLV III-B strain of HIV-1 was however very poor, leading to infection of less than 1 in 10⁵ cells, and requiring co-culture with CD4 positive T cell-lines in order to detect production of viral particules.⁽⁴⁾ We have investigated the susceptibility to HIV-1 infection of the Dami megakaryocytic cell-line, originally described by Greenberg *et al* ⁽⁸⁾, which expresses several morphological and biochemical features of bone marrow megakaryocytes, no detectable surface CD4 molecule, and only low levels of CD4 mRNA. The Dami cell-line could be productively infected by the III-B strain of HIV-1, and produced high levels of functional virions. This cell-line, which expresses functional receptors for several cytokines,⁽⁹⁻¹¹⁾ provided a model to explore the effect of these cytokines on HIV-1 transactivation and protein synthesis in cells of the megakaryocytic lineage.

MATERIALS AND METHODS

Dami cell-line. Dami cells, originally described by Greenberg *et al.*⁽⁸⁾ were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM)(Gibco-BRL, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% horse serum or in some experiments, with 2% Ultrosor HY (IBF, Villeneuve-la-Garenne, France). Expression of surface markers was analyzed by flow cytometry (EPICS, Coulter, Margency, France) using IgG1 mouse monoclonal antibodies directed against CD2 (T11, Coulter), CD4 (T4, Coulter; and IOT4a, Immunotech, Marseille, France), CD41b (GPIIb) (IOP41b, Immunotech) and CD61 (GPIIIa) (IOP61, Immunotech). Intracellular HIV-1 p24 was detected by using a monoclonal mouse IgG1 (25-C-90) directed against this protein (kindly provided by Drs Traincard and Mazié, Hybridolab, Institut Pasteur de Paris, France) after cell permeabilization.⁽¹²⁾ These antibodies were then detected with a Fluorescein-conjugated affinity purified F(ab')₂ directed against mouse IgG (Cappel Laboratories, Fresnes, France). Mouse purified IgG1 (Sigma, L'Isles d'Abeau Chesnes, France) was used as a negative control.

Virus. The HTLV III-B strain of HIV-1⁽¹³⁾ was provided by Dr Cogniaux (Institut Pasteur du Brabant, Belgium) (Smith-Kline-Ritt, Belgium) and was obtained highly purified and titrated to HIV core protein p24/mL (10^9 pg/mL). The virus was propagated in the Molt-4 CD4 positive T cell-line, supernatants were harvested at peak of virus production, virus stocks were made after filtration and stored in aliquots at -80°C. Reverse transcriptase activity was then determined. In some experiments, virus was obtained from Molt-4 cells cultured in ultrosor HY.

Infection of Dami cells. Cells (10^5 /mL) were incubated with cell-free virus supernatant of HTLV III-B (5000 or 50000 cpm of RT activity) for three days. The cells were then washed twice with phosphate-buffered-saline (PBS) and resuspended in fresh medium at a concentration of 10^5 cells/mL. Every 3 or 4 days, cell-free supernatant was withdrawn for HIV p24 assay, then the cells were washed and resuspended in fresh medium at a concentration of 10^5 cells/mL. HIV-1 p24 antigen production was evaluated by using a commercial enzyme

immunoassay (Abott Laboratories, North Chicago, USA). Each determination was made from one aliquot at two different dilutions. Infectivity of p24 positive supernatants was tested by adding them to the CD4 positive Molt-4 T cell-line and by monitoring syncytia formation and HIV p24 production by these cells. When cells were cultured in the presence of cytokines (Genzyme, Cambridge, USA), cytokines were added at each passage (3 to 4 days).

Immunoperoxidase staining. Expression of cytoplasm and/or membrane HIV-1-p24 protein in Dami cells was investigated by using the monoclonal mouse IgG1 (25-C-90). Cells were washed in phosphate-buffered-saline (PBS), resuspended at 10^6 /mL and cytocentrifuged at 500 rpm for 2 minutes. The slides were then fixed at 4°C in ethanol/acetone (1/1) for 5 minutes. After washing, the cells were incubated in PBS supplemented with 1mg/mL of purified human IgG (Sigma) for 30 minutes. Cells were then incubated with the 25-C-90 antibody (5µg/mL) for 30 minutes at 37°C. After two washing steps, biotinylated-goat IgG anti-mouse IgG (Amersham) was added (1:150 dilution) for 30 minutes at 20°C. Biotin-streptavidin-horseradish peroxidase complexes were then added (Amersham) (1:250 dilution). For development the slides were incubated at 20°C for 10 minutes in the presence of diaminobenzidine (DAB; 0.5 mg/mL) and hydrogen peroxide (H_2O_2 ; 0.01%). The reaction was stopped by water. The slides were then counterstained with hematoxylin, covered with permount and a glass coverslip. Specificity controls included mouse IgG1 fraction (Sigma) on infected and non-infected cells as well as the 25-C-90 antibody on uninfected cells.

Ultrastructural studies. Cells were harvested, centrifuged at 200 g for five minutes and washed twice with PBS. The cells were then fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol/L cacodylate buffer (pH 7.2). Ultrathin sections were then performed by standard procedures and photographed using a PHILIPS EM-420 (Philips, Amsterdam, Netherlands).

HIV-1 and CD4 RNA analysis. Total RNA was prepared from 10^7 cells by the RNazol procedure (Cinna-Biotecx, Friendwood, USA) . 10 µg samples of total RNA were separated by electrophoresis on 1% agarose denaturing gels⁽¹⁴⁾ and transferred to HYBOND-N

filters (Amersham, Paris, France). Blots were hybridized for 16 to 24 hours at 42°C with oligolabeled (random primed) restriction fragments. Filters were then washed with 0.1 SSC, 0.1% SDS at 60°C and exposed to XAR-Film (Kodak, Marne la vallée, France) for autoradiography.

Probes used were HTLV III-B cDNA: fragment (8390-9130), platelet GPIIb cDNA, platelet GPIIIa cDNA⁽¹⁵⁾ and human CD4 cDNA.⁽¹⁶⁾

In situ hybridization. The probe used in our study was a 770 bp fragment (Sac I-Sph I) of the gag region of HTLV III-B virus, cloned into the pBluescript (Stratagene, La Jolla, USA). Synthesis of the S³⁵-radiolabeled RNA probe and hybridization procedure have been previously described.⁽¹⁷⁾ After autoradiography and development, the slides were stained with methylene blue and eosin (RAL-kit, Rhône-Poulenc, Villers St Paul, France).

HIV-1 RNA detection in infected Dami cells after treatment with TNF- α .

Various dilutions of total RNA extracted from 5.10⁵ HIV-1 infected Dami cells were spotted on Hybond-N membrane as previously described.⁽¹⁸⁾ Blots were then hybridized with an HIV-1 probe and after stripping with a β actin probe.

Transient cell transfection. The plasmids used have been previously described^(19,20) and included the HIV-1-LTR region linked to the luciferase reporter gene, the HIV-1-LTR enhancer region linked to luciferase, and the HIV-1-LTR region linked to the HIV-1-Tat region. Dami cells (2x10⁷) were transfected with 5-10 μ g of plasmid using a modified DEAE-dextran technique.^(19,20) Some experiments involved co-transfection with the LTR-Tat construct. Transfected cells were dispatched at 5x10⁵/mL and incubated at 37°C for 4 hours before stimulation. After 18 hours treatment, cells were lysed and assayed for luciferase activity as previously described^(19,20) using a nucleotimetre 107 CLV (Interbio, Paris, France). This activity was standardized as a function of the proportion of living cells, as determined by MTT assay.⁽¹⁹⁻²¹⁾ Results are expressed as fold increase, corresponding to luciferase activity of stimulated transfected cells/luciferase activity of unstimulated transfected cells.

RESULTS

HIV-1 infection of Dami cells. Incubation of the Dami megakaryocytic cells with the HTLV III-B strain of HIV-1 was performed 26 times and led, in each case, to a highly productive infection. Results reported in Figure 1 (4 different experiments), Figure 5.A (10 experiments), Figure 5.B (1 experiment) and Table 2 (1 experiment) involve a total of 16 different infections. 4 experiments are shown in Fig.1, in which infection were followed during a period ranging from 80 days to 30 weeks. In some, but not all infections (Fig.1), peaks of p24 antigen release greater than $1 \mu\text{g}/\text{mL}/10^6$ cells were observed. The delay preceding detectable production of p24 antigen in supernatants depended on the reverse transcriptase activity of the initial HTLV III-B inoculum (Figure 1.A (5,000 cpm) versus 1.B (50,000 cpm)). In the 26 experiments, the earliest p24 antigen detection ($\text{p24} \geq 10 \text{ pg}/\text{mL}/10^6$ cells) was 12 days and 22 days after infection with 50,000 and 5,000 cpm, respectively. However, the onset of highly increasing viral production was detected only later, around 50 days (Figure 1.A; 5,000 cpm) and 30 days (Figure 1.B; 50,000 cpm). Such delays of productive infection have been previously, reported for in vitro infection of bone marrow progenitors.⁽²²⁾ There was no detectable loss of cell-viability, gross cytopathic effect, nor modification in cell proliferation (doubling time of 24 hours) or ploidy in Dami cells up to 30 weeks after HIV infection (not shown). Viral particles released in cell free supernatants by Dami cells infected with HIV-1, retained their capacity to infect the Molt-4 T cell-line. Moreover, addition to Molt-4 cells of 5,000 cpm (corresponding to 350 pg of p24 protein) of RT activity of virus produced by the Dami cells led, after 8 days, to cytopathogenic effects in the T cell-line (not shown).

Electron-microscopy of infected Dami cells revealed the presence of morphologically normal HIV-1 viral particles (Fig. 2). Immunoperoxidase staining (Fig. 3; A, B, C) with a monoclonal antibody directed against HIV-1 p24 antigen showed that about 40% of Dami cells expressed this protein (B, C) and in Table 1 flow cytometry analysis with the same monoclonal antibody showed that up to 60 % of infected Dami cells (Dami cells 3) expressed this protein (4 months after infection with 50,000 cpm inoculum, p24 level 320 ng/mL/million cells). *In situ* hybridization with the S³⁵-HIV-1-gag RNA probe (Fig. 3; D, E, F) showed silver grains localized to some infected

Dami cells (D, E). A high density of silver grains that resulted from hybridization of the labeled probe with endogenous HIV-1 RNA was detected over certain cells (approximately 30% of cells were highly positive). This high density of silver grains was in contrast to a much lower level of silver grains scattered randomly throughout all others regions of the slides or when uninfected cells were used (D).

As shown in Figure 4.A, specific HIV-1 RNA species were detectable by Northern-Blot analysis. 9.3, 4.2 and 2 Kb HIV-1-transcripts were detected using a HIV-1 cDNA probe (8390 to 9130 bp) in HIV-1-infected Dami cells, and were not detected in uninfected Dami cells.

CD4 protein and mRNA expression by Dami cells. Before infection, and at different intervals following infection, cells were analyzed by flow cytometry for surface expression of platelet glycoproteins (GPIIb and GPIIIa) and of the CD4 protein. Two different monoclonal anti-CD4 antibodies were used, and gave similar results. Table 1 shows a representative experiment (out of 4 different experiments). Both uninfected and HIV-1 infected Dami cells expressed highly the GPIIIa but not the CD4. In contrast, monocytic and lymphocytic cell-lines expressed CD4 but not GPIIIa. As shown in figure 4.B, Northern blot analysis with a CD4 cDNA probe of total RNA extracted from infected and uninfected Dami cells required 10 days of exposure in order to give detectable signal, whereas CD4 mRNA was detected after only 18 hours exposure in human peripheral blood mononuclear cells. These experiments indicate that either each Dami cell expresses a very low level of CD4 mRNA, or that a very small subpopulation of the cells expresses significant levels of CD4 mRNA. Expression of GPIIb and GPIIIa platelet glycoproteins mRNA was not modified by HIV-1 infection of the cells (Fig. 4.C). Hybridization experiments shown in figure 4. A and B were performed on the same blot after stripping and were representative of three independent experiments. HIV-1 infection of Dami cells did not involve serum components such as IgG or complement, since productive infection could be obtained in cells cultured in Ultrosor HY in the absence of serum, after infection with virus that had been produced in Molt-4 cultured in the same serum-free medium.

Cytokine-mediated modulation of HIV-1 production. HIV-1 infected cells

(10^5 /mL) were cultured with TNF- α (100U/mL) or a mixture of IFN- γ and IFN- α (1000U/mL each) for 5 to 11 days. As shown in table 2, HIV-1 p24 production in the supernatants was enhanced by TNF- α , whereas the combination of IFN- γ and IFN- α inhibited p24 production, IFN- α or IFN- γ alone having less effect (data not shown). The enhancing effect of TNF- α was reproducible and is shown in 13 experiments (Fig. 5.A (10), 5.B (1), 5.C (1) and Table 2 (1)). As shown in figure 5.B, neutralizing antibodies against human TNF- α prevented the overproduction of p24 induced by TNF, but did not affect the basal level of p24 production. No TNF- α secretion by infected or uninfected Dami cells could be detected using a Genzyme ELISA kit; strongly suggesting that the spontaneous HIV-1 production by infected Dami cells, in medium alone does not involve TNF- α . Dot-hybridization experiments showed that TNF- α -mediated increase in p24 protein expression was associated with increased levels of HIV-1 RNA, whereas the β actin mRNA level was not modified (Fig. 5.C). When TNF- α treatment was initiated 4 days prior to HIV-1 infection, production of virus was detected earlier than in untreated cells. Indeed in two different experiments, p24 production over 1 ng/mL/million cells were obtained 10 days after such TNF- α treatment, whereas untreated cells had not begun to produce virus at day 15 (p24 \leq 10 pg/mL/million cells). In three different experiments, TNF- α treatment was initiated after HIV-1 infection of Dami cells but before productive infection was detected. This induced p24 production in 4 days (p24 level of 50, 140 and 200 pg/mL/ 10^6 cells), while p24 was still undetectable in the untreated cells. In contrast, 8 different experiments showed that TNF- α treatment of chronically infected Dami cells, more than 3 months after infection, had no or low (up to 1.5 fold) enhancing effect on p24 production.

In order to determine whether the TNF- α -mediated increase in HIV-1 p24 production by Dami cells was due to a transcriptional or to a post-transcriptional effect, transient transfection experiments of uninfected Dami cells were performed using HIV-1 LAV Bru LTR-constructs. The LTR of LAV Bru or LAI is similar to that of IIIB; ⁽²³⁾ only 3 bases substitution in 188 exist in the enhancer-promotor region that are outside the enhancer NF- κ B consensus sites. ^(24,25) The LTR of LAV Bru and of IIIB have been shown to have similar responses to TNF- α in T cell lines (7 to 8

fold increase).^(26,27) However, the response of a given HIV-1 LTR to stimulation has been shown to vary depending of the cell line transfected. For example, 2 to 20 fold increases have been reported in response to PMA.⁽²⁸⁾ In 7 transient transfection experiments of the Bru LTR-Luc construct in Dami cells, TNF induced a 5 ± 2 fold increase in Luc activity. Table 3 shows one representative experiment out of 7 in which TNF- α , as well as PMA,^(28,29) transactivated the HIV-1-LTR promoter linked to the luciferase reporter gene and had the same effect on a construct containing only the enhancer region of the HIV-1-LTR.

DISCUSSION

Incubation of the Dami megakaryocytic cell-line with the HTLV III-B strain of HIV-1 led to long lasting production of high levels of viral proteins. HIV-1 p24 antigen could be detected in the cytoplasm and/or membrane of about half of the megakaryocytic cells. This is consistent with previous observations that high level virus production can be observed with only 40 to 60% of cells expressing HIV proteins. (4,30) Morphological normal viral particles that were identified by electron-microscopy and cell free viral particles released in the supernatant were infectious for a CD4 T lymphocytic (Molt-4) cell line (not shown).

Interestingly, Dami cells did not express detectable surface CD4 antigen, the major HIV-1 receptor on T lymphocytes and monocytes, and only low levels of CD4 mRNA were found in these cells. Studies of CD4 expression on bone marrow megakaryocytes have led to variable results, (5,6) suggesting that, at most, only a subset of megakaryocytes present detectable surface CD4 molecule. (6) One possibility, therefore, is that Dami cells express surface CD4 in a transient manner. Alternatively, HIV-1 entry in the megakaryocytic cell-line could involve a CD4-independent pathway. Antibody and complement (31,32) mediated entry have been described in monocytic and T cell-lines. Since productive infection of Dami cells could be obtained in serum free medium (Ultrosor HY), using HIV-1 virus produced in the same medium, the involvement of antibodies or complement could be ruled out in our assays. In a recent study, Sakagushi *et al* (4) reported poor susceptibility of CD4 positive clones of the CMK megakaryocytic cell-line to infection with the HTLV III-B strain of HIV-1, with less than one in 10^5 cells infected, viral production being only detected in coculture experiments with a CD4 T cell-line. These results suggest that expression by megakaryocytes of the CD4 molecule might not be sufficient to allow efficient infection of these cells. Further, it has been shown that platelets, which do not express CD4 can, like megakaryocytes, internalize HIV-1 viral particles *in vitro*. (3) HIV-1 infection of other CD4 negative cell populations has been previously reported, (33-36) but in contrast to Dami cells, viral particle production could not be detected directly in these cases, and required coculture with CD4 positive T cell-lines in order to be measured.

Human hematopoietic cell-lines developed from patients with acute leukemia have become useful tools to explore differentiation and function of cells of the bone marrow lineages. Recent studies of CD4 T lymphocytic and monocytic cell-lines have led to the identification of the regulatory effect of various activation signals, including cytokines, on the regulation of HIV-1 proviral expression and viral particles production in these cell populations.⁽³⁷⁻⁴¹⁾ Cytokines play an important role in megakaryocyte lineage maturation,⁽⁴²⁾ and Dami cells express functional receptors for several cytokines, including tumor necrosis factor- α (TNF- α). We therefore investigated whether such mediators could influence the level of HIV-1 expression in this megakaryocytic cell-line.

As in CD4 positive T lymphocytic and monocytic cell-lines,⁽³⁸⁻⁴⁰⁾ TNF- α significantly increased HIV-1 production in infected Dami cells. As in T lymphocytes and monocytes, interferon- α inhibited HIV-1 production, an effect that was maximal in the presence of interferon- γ .⁽⁴³⁾ The enhancing effect of TNF- α was repeatedly observed in several experiments. Moreover, when TNF- α treatment was initiated 4 days prior to HIV infection of Dami cells, the delay preceding production of virus was shortened to 10 days. However, TNF- α had no or low enhancing effect on chronically infected Dami cells (more than 3 months). This was not due to secretion of TNF- α by the infected cells. Mechanisms involved in this loss of TNF enhancing effect along time are under investigation.

The enhancing effect of TNF- α on HIV-1 expression in T lymphocytic and monocytic cell-lines has been shown to involve transactivation of the HIV-1 long terminal repeat (LTR) promoter, in part through the binding of the nuclear factor kappa B (NF- κ B) to the two responsive elements located in the enhancer region of the HIV-1 promoter.⁽³⁹⁾ Dot hybridization analysis of RNA from HIV-1 infected Dami cells showed that addition of TNF- α increased the quantity of HIV-1 RNA. Transient transfection of uninfected Dami cells with a construct containing the luciferase reporter gene under the control of the HIV-1-LTR showed that TNF- α , as well as phorbol esters, induced transactivation of the HIV-1 promoter. This effect was enhanced when a LTR-Tat construct was co-transfected. Interestingly, TNF- α -mediated transactivation was still observed in Dami-cells transfected with a construct containing only the two 12 base-pairs NF- κ B

binding sequences of the enhancer region of the LTR linked to the luciferase gene, suggesting that the effect of TNF- α in the megakaryocytic cells may involve, as in T cells and monocytes, nuclear translocation of an active form of the NF- κ B protein.

Since HIV-1 infected patients have elevated serum levels of TNF- α ,^(44,45) our results raise the question of a possible enhancing effect of this cytokine on HIV-1 production by bone marrow megakaryocytes.

Considering that it is difficult to obtain both significant quantities and pure populations of bone marrow megakaryocytes, the Dami cell-line might represent a useful model to study the possible regulation by cytokines of HIV-1 expression in bone marrow cells of the megakaryocytic lineage.

BIBLIOGRAPHY

1. Oksenhendler E, Seligman M: HIV-related thrombocytopenia. *Immunodeficiency Review* 2:221, 1990
2. Zucker-Franklin D, Cao Y: Megakaryocytes of human immunodeficiency virus infected individuals express viral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5595, 1989
3. Zucker-Franklin, Seremetis S, Zeng ZY: Internalization of human immunodeficiency virus type I and other retrovirus by megakaryocytes and platelets. *Blood* 75:1920, 1990
4. Sakagushi M, Sato T, Groopman JE: Human immunodeficiency virus infection of megakaryocytic cells. *Blood* 77:481, 1991
5. Zucker-Franklin D, Termin CS, Cooper MC: Structural changes in the megakaryocytes of patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV-1). *Am J Pathol* 134:1295, 1989
6. Basch RS, Kouri YH, Karpatkin S: Expression of CD4 by human megakaryocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8085, 1990
7. Sato T, Fuse A, Egushi M, Hayashi Y, Ryo R, Adachi M, Kishimoto Y, Teramura M, Mizogushi H, Shima Y, Komori I, Sunami S, Okimoto Y, Nakajima H: Establishment of a human leukemic cell line (CMK) with megakaryocytic characteristics from a Down's syndrome patient with acute megakaryoblastic leukemia. *Br J Haematol* 72:184, 1989
8. Greenberg SM, Rosenthal DS, Greely TA, Tantravahi R, Handin RI: Characterization of a new megakaryocytic cell line: the Dami cell. *Blood* 72:1968, 1988
9. Greenberg SM, Chandrasekhar C, Golan DE, Handin RI: Transforming growth factor β inhibits endomitosis in the Dami human megakaryocytic cell-line. *Blood* 76:533, 1990
10. Greenberg SM, Chandrasekhar C: Hematopoietic factor-induced synthesis of von Willebrand factor by the Dami human megakaryocytic cell-line and by human megakaryocytes. *Exp Hematol* 19:53, 1991
11. Monté D, Wietzerbin J, Pancré V, Merlin G, Greenberg SM, Kusnierz JP, Capron A, Auriault C: Identification and characterization of a functional receptor for IFN- γ on a megakaryocytic cell line. *Blood* 78:2042, 1991

12. Cory JM, Olhson-Wilhelm BM, Brock EJ, Sheaffer NA, Steck ME, Eyster ME, Rapp F: Detection of human immunodeficiency virus-infected lymphoid cells at low frequency by flow cytometry. *J Immunol Methods* 105:71, 1987
13. Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livach KS, Starcick B, Joseph SF, Doran ER, Rafalski JA, Whitehorn EA, Banmeister K, Ivanoff L, Pelleway SR, Pearson ML, Lantenbeiger JA, Papas TS, Chrayeb J, Chang NT, Gallo R, Wong-Staal: Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 313:277, 1985
14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
15. Frachet P, Uzan G, Thevenon D, Denarier E, Pradini MH, Marguerie G: Gp IIb and Gp IIIa amino-acid sequences deduced from human megakaryocytic DNA. *Mol Biol Reports* 14:27, 1990
16. Maddon PJ, Littman DR, Godfrey M, Maddon DE, Chess L, Axel R: The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4. *Cell* 42:93, 1985
17. Navarro S, Debili N, Le Couedre JP, Klein B, Breton-Gorius J, Doly J, Vainchenker W: Interleukin-6 and its receptor are expressed by human megakaryocytes: In vitro effects on proliferation and endoreplication. *Blood* 77:461, 1991
18. White BA, Carter Bancroft F: Cytoplasmic dot hybridization. *J Biol Chem* 257:8569, 1989
19. Bachelerie F, Alami J, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL: HIV-enhancer activity perpetuated by NF- κ B induction on infection of monocytes. *Nature* 350:709, 1991
20. Schwartz O, Virelizier JL, Montagnier L, Hazan U: A microtransfection method using the luciferase encoding reporter gene for the assay of HIV LTR promoter activity. *Gene* 88:197, 1990
21. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K: Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* 119:203, 1989
22. Folks TM, Kessler SW, Orenstein JM, Justement JS, Jaffe ES, Fauci AS: Infection and replication of HIV-1 progenitor cells of normal human bone marrow. *Science* 242: 919, 1988
23. Wain-Hobson S, Vartanian JP, Henry M, Chenciner N, Cheynier R, Delassus S, Pedroza Martins, Sala M, Nuguyere MT, Guetard D, Klatzmann D, Gluckman JC, Rozenbaum W, Barre-Sinoussi F, Montagnier L: LAV revisited: Origins of the early HIV-1 isolates from Institut



Pasteur. Science 252:921, 1991

24. Rosen GA, Sodroski JG, Haseltine WA: The location of cis-acting regulatory sequences in HTLV III/LAV long terminal repeat. *Cell* 41:813, 1985
25. Dellassus S, Cheynier R, Wain-Hobson S: Evolution of HIV-1 nef and long terminal repeat sequences over 4 years in vivo and in vitro. *J Virol* 65:225, 1991
26. Israel N, Hazan U, Alcami J, Munier A, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F, Israel A, Virelizier JL: TNF stimulates transcription of HIV-1 in human T-lymphocytes, independently and synergistically with mitogens. *J Immunol* 143:3956, 1989
27. Osborn L, Kunkel L, Nabel GJ: TNF and IL1 stimulate the HIV enhancer by activation of the nuclear factor κ B. *Proc Natl acad Sci USA* 86:2336, 1989
28. Kaufman JO, Valandra G, Roderiquez G, Giri BC, Norcross MA: Phorbol ester enhances HIV-promoted gene expression and acts on a repeated 10-base-pair functional enhancer element. *Mol Cell Biol* 7:3759, 1987
29. Tong-Starksen S, Luciw PA, Peterlin BM: Signaling through T lymphocyte surface proteins, TCR/CD3 and CD28, activates the HIV-1 LTR. *J Immunol* 142:702, 1989
30. Dewhurst S, Sakai K, Bresser J, Stevenson M, Evinger-Hodges MJ, Volsky DJ: Persistent productive infection of human glial cells by HIV and by infectious clone of HIV. *J Virol* 61:3774, 1987
31. Takeda A, Tuazon CU, Ennis FA: Antibody-enhanced infection by HIV-1 via Fc receptor-mediated entry. *Science* 242:580, 1988
32. Boyer V, Desgranges C, Traub MA, Fischer E, Kazatchkine MD: Complement mediates HIV-1 infection of a human T cell line in a CD4 and antibody independent fashion. *J Exp Med* 173:1151, 1991
33. Werner A, Winskowsky G, Cichutek K, Norley SG, Kurt R: Productive infection of both CD4+ and CD4- human cell lines with HIV-1, HIV-2 and SIVagm. *AIDS* 4:537, 1990
34. Tateno M, Gonzalez-Scarano F, Levy JA: Human immunodeficiency virus can infect CD4-negative human fibroblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4287, 1989
35. Adachi A, Koenig S, Gendelman HE, Daugherty D, Gattoni-Celli S, Fauci AS, Martin MA: Productive, persistent infection of human colorectal cell lines with HIV. *J Virol* 61:209, 1987

36. Ling Li X, Moudgil T, Vinters HV, Ho DD: CD4-independent, productive infection of a neuronal cell line by HIV-1. *J Virol* 64:1383, 1990
37. Koyanagi Y, O'Brien WA, Zhao JQ, Golde DW, Gasson JC, Chen ISY: Cytokines alter production of HIV-1 from primary mononuclear phagocytes. *Science* 241:1673, 1988
38. Folks TM, Justement JS, Kinter A, Dinarello CA, Fauci AS: Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line. *Science* 238:800, 1987
39. Rosenberg ZF, Fauci AS: Immunopathogenic mechanisms of HIV infection: cytokine induction of HIV expression. *Immunol Today* 11:176, 1990
40. Folks TM, Clouse KA, Justement JS, Rabson A, Duh E, Kehrl JH, Fauci AS: TNF induces expression of HIV in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2365, 1989
41. Poli G, Bressler P, Kinter A, Duh A, Timmer WC, Rabson A, Justement JS, Stanley S, Fauci AS: Interleukin 6 induces HIV expression in infected monocytic cells alone and in synergy with TNF by transcriptional and post-transcriptional mechanism. *J Exp Med* 172:151, 1990
42. Hoffman R: Regulation of megakaryocytopoiesis. *Blood* 74:1196, 1989
43. Hartshorn KL, Neumeier D, Vogt MW, Schooley RT, Hirsch MS: Activity of interferon alpha, beta, and gamma against human immunodeficiency virus replication in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* 3:125, 1987
44. Lahdevirta J, Maury CPJ, Teppo A, Repo H: Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with AIDS. *Am J Med* 85:289, 1988
45. Reddy M, Sorell SJ, Lange M, Grieco MH: Tumor necrosis factor and HIV p24 levels in serum of HIV-infected populations. *J AIDS* 1:436, 1988

LEGENDS

Figure 1: Kinetics of p24 antigen production in cell supernatant of Dami cells after exposure to the HTLV III-B strain of HIV-1 (4 representative experiments). Cells were infected either with 5,000 cpm/mL (A) or 50,000 cpm/mL (B) of HTLV III-B reverse transcriptase activity. Every 3 or 4 days, cells were counted, p24 levels assayed in supernatants, and results expressed as ng/mL/10⁶ cells.

Figure 2: Electron microscopy of thin sections of Dami cells 73 days after infection with 5,000 cpm of HTLV III-B RT activity (p24 level of 80 ng/mL/10⁶ cells). Arrows in A indicate viral particles in the periphery of the cell. B represents high magnification of viral particles and C virion budding.

Figure 3: Detection of p24 protein expression by immunoperoxidase and of HIV-1 RNA expression by *in situ* hybridization in Dami cells 85 days after infection with 5,000 cpm of HTLV III-B RT activity (p24 level of 350 ng/mL/10⁶ cells). The cells were cytopun and subjected either to:

a) An indirect immunoperoxidase staining procedure; photomicrograph A shows cells stained with control mouse IgG1 (5 µg/mL) and photomicrographs B and C show cells stained with an anti HIV-1 p24 antigen mouse monoclonal IgG1 (5 µg/mL). Cells were counterstained with hematoxylin. No staining was detected after incubation of uninfected Dami cells with the anti-p24 antibody (not shown). Specificity of the staining is also indicated by the presence of unstained cells in the photomicrographs B and C.

b) Or *in situ* hybridization with the HTLV III-B gag probe; slides used were the same as in a), and were further fixed with paraformaldehyde (4% in PBS) before hybridization. (D) uninfected cells, (E) and (F) HIV-1 infected Dami cells. Arrows indicate the cells that expressed HIV-1 RNA. Exposure time was 72 hours.

Figure 4: Northern-blot analysis of total RNA from Dami cells for the detection of: (A) HIV-1 RNA in uninfected Dami cells (lanes 1 and 4), and in HIV-1 infected Dami cells (5,000 cpm inoculum), 108 and 115 days after infection with 5,000 cpm of HTLV III-B RT activity (p24 level of 130 and 200 ng/mL/10⁶ cells) (lanes 2 and 5) respectively, or 73 and 80 days after infection with 50,000 cpm of HTLV III-B RT activity (p24 level of 80 and 210 ng/mL/10⁶ cells) (lane 3 and 6). The lower panel shows ethidium bromide staining of the nylon membrane before hybridization. (B) CD4 mRNA on the same blot after stripping and rehybridization with a radiolabelled CD4 cDNA probe. Lane 1 to 6 represents autoradiography obtained after 10 days of exposure, whereas lane 7 represents an 18 hour exposure of RNA extracted from human PBL. (C) Gp Iib and Gp IIIa mRNA in uninfected (lane1) and HIV-1 infected Dami cells, 80 days after infection with 5,000 cpm of HTLV III-B RT activity (p24 level of 200 ng/mL/10⁶ cells) (lane 2), or 55 days after infection with 50,000 cpm of HTLV III-B RT activity (p24 level of 400 ng/mL/10⁶ cells) (lane 3).

Figure 5: TNF- α effect on HIV-1 protein and RNA production in infected Dami cells. (A) 10 different infected Dami cells were treated with medium (\square) or with 100 U/mL of TNF- α (\blacksquare) for 7 days and HIV-1 p24 levels determined in cultures supernatants (TNF induce fold increase are indicated above each experiments). (B) Infected cells (5,000 cpm infection, p24 level of 2 ng/mL/10⁶ cells) were cultivated with medium or TNF- α (100 U/mL) in the absence (\square) or in the presence of normal rabbit serum (1:500) (\boxtimes) or rabbit serum directed against human TNF- α (1:500) (\blacksquare) for 3 days (D3) or 7 days (D7). HIV-1 p24 levels were, then, determined in cell supernatants. (C) Dot-hybridization detection of HIV-1 RNA in HIV-1 infected Dami cells (50,000 cpm infection, p24 level of 10 ng/mL/10⁶ cells) treated with TNF- α . Total RNA extracted from 5x10⁵ HIV-1 infected Dami cells treated for 7 days with medium alone (lane 1) or with TNF- α (100 U/mL) (lane 2), or for 11 days with medium (lane 3) or TNF- α (lane 4) were spotted on Hybond-N membrane. The blots were then hybridized with a radiolabeled HIV-1 cDNA (upper panel) and after stripping with a radiolabeled β actin cDNA probe (lower panel). Each successive line represents a 1:2 dilution of the preceding line.

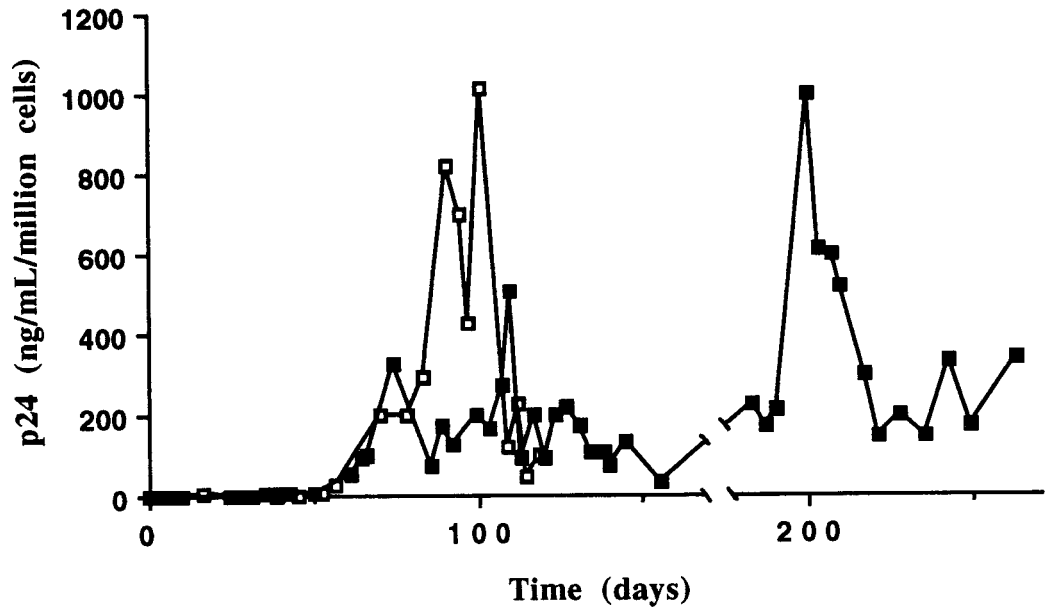


Figure 1.A

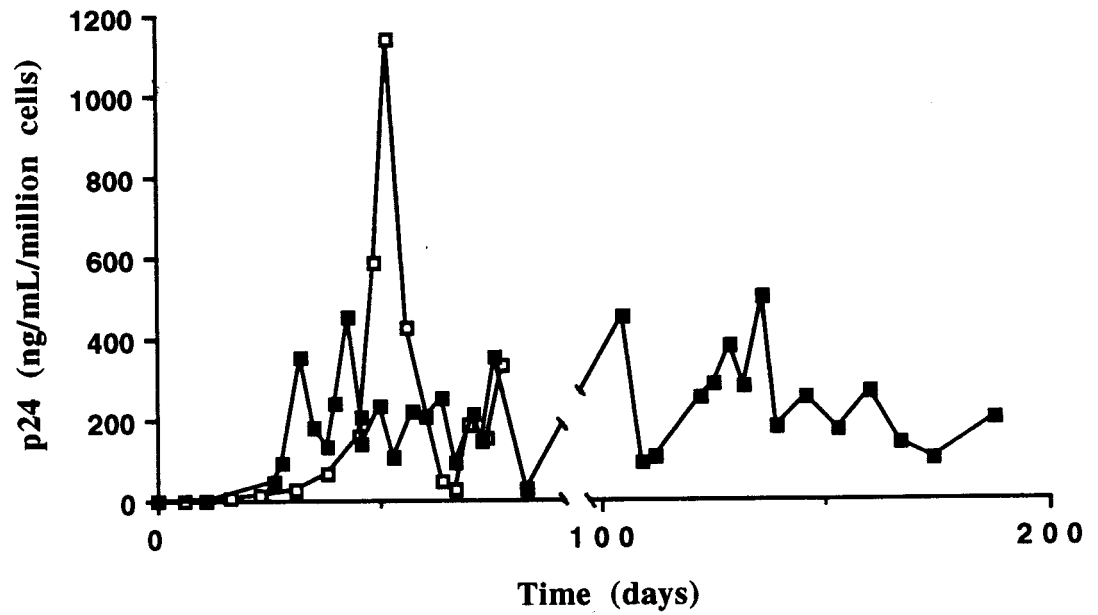


Figure 1.B

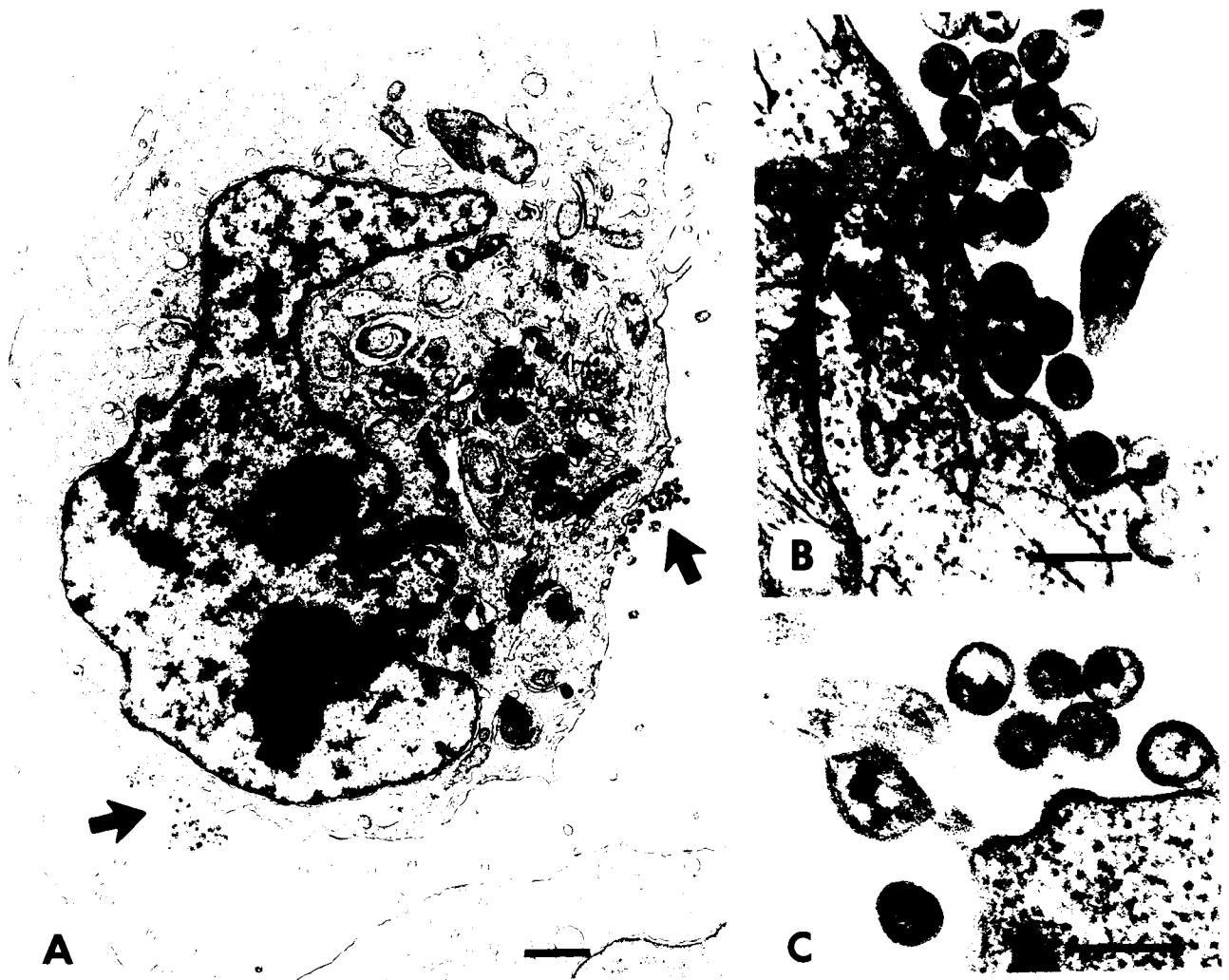


Figure 2

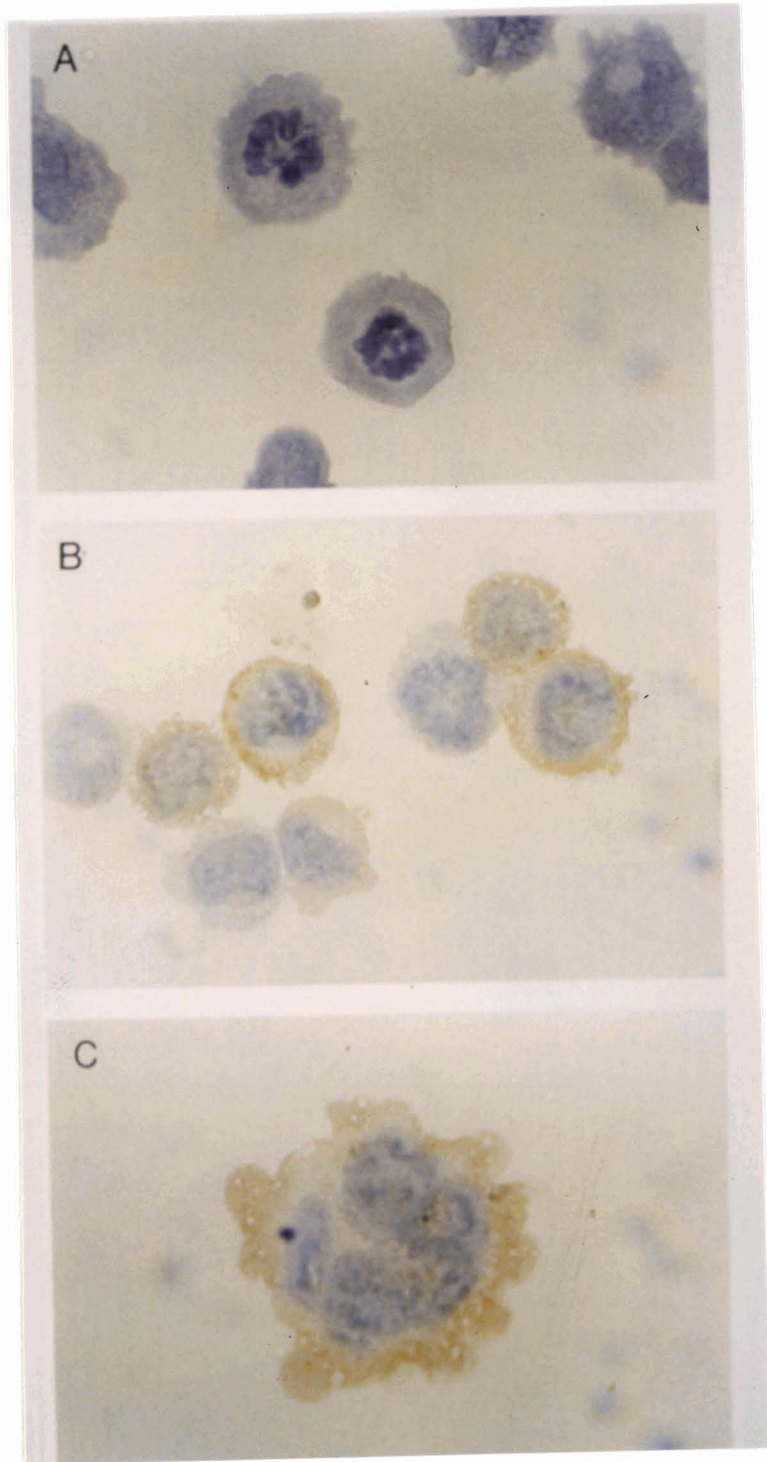


Figure 3.A

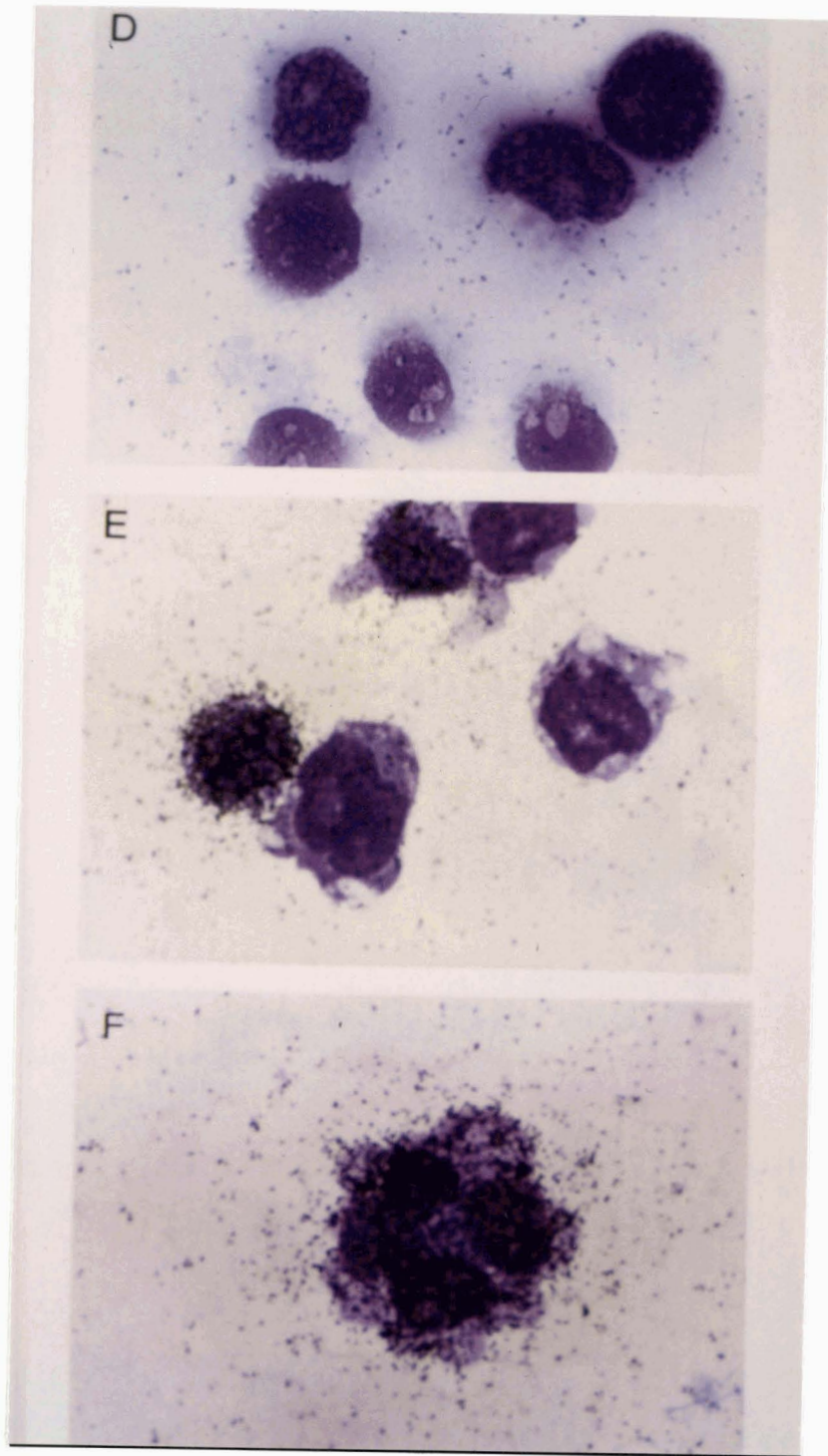


Figure 3.B

**Figure 4.A**

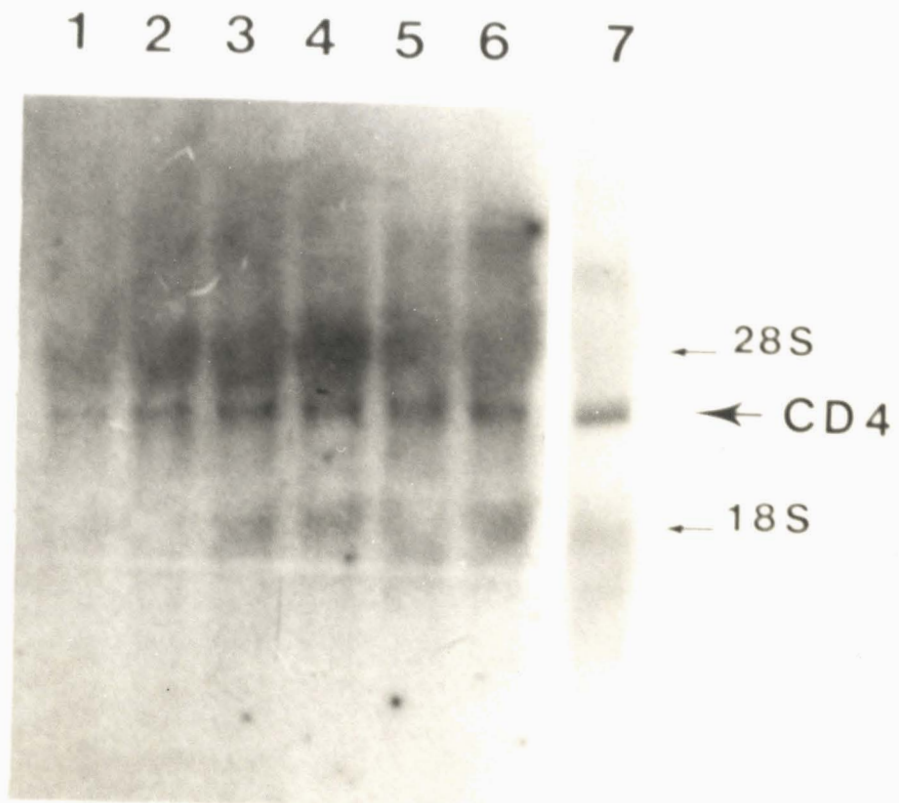
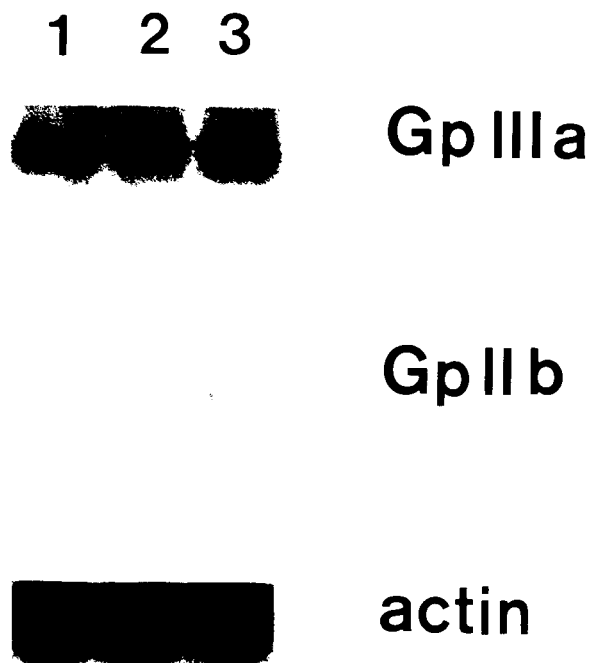


Figure 4.B

**Figure 4.C**

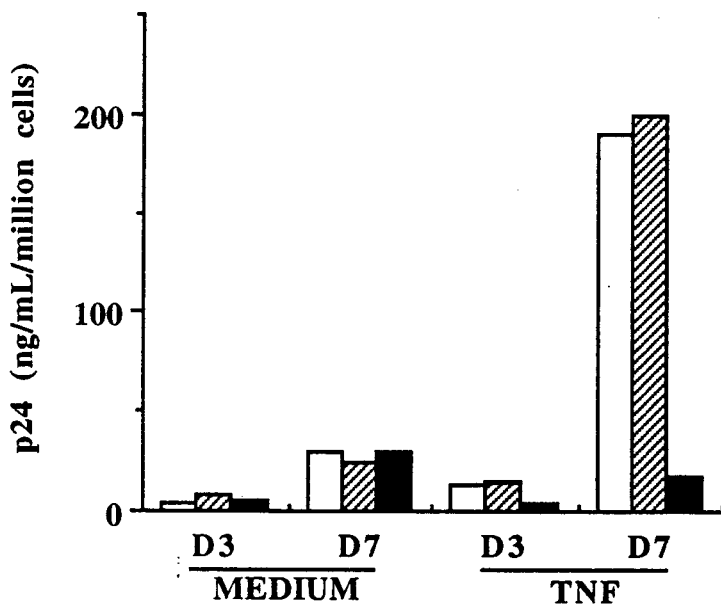
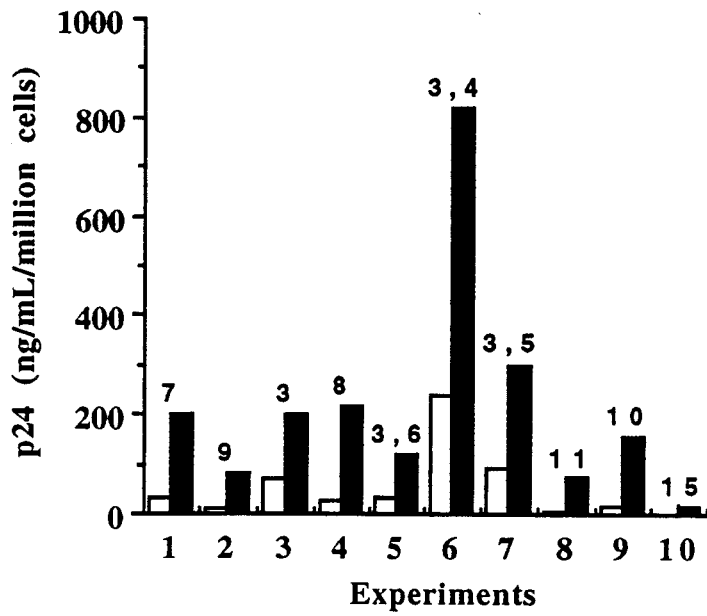


Figure 5.A et 5.B

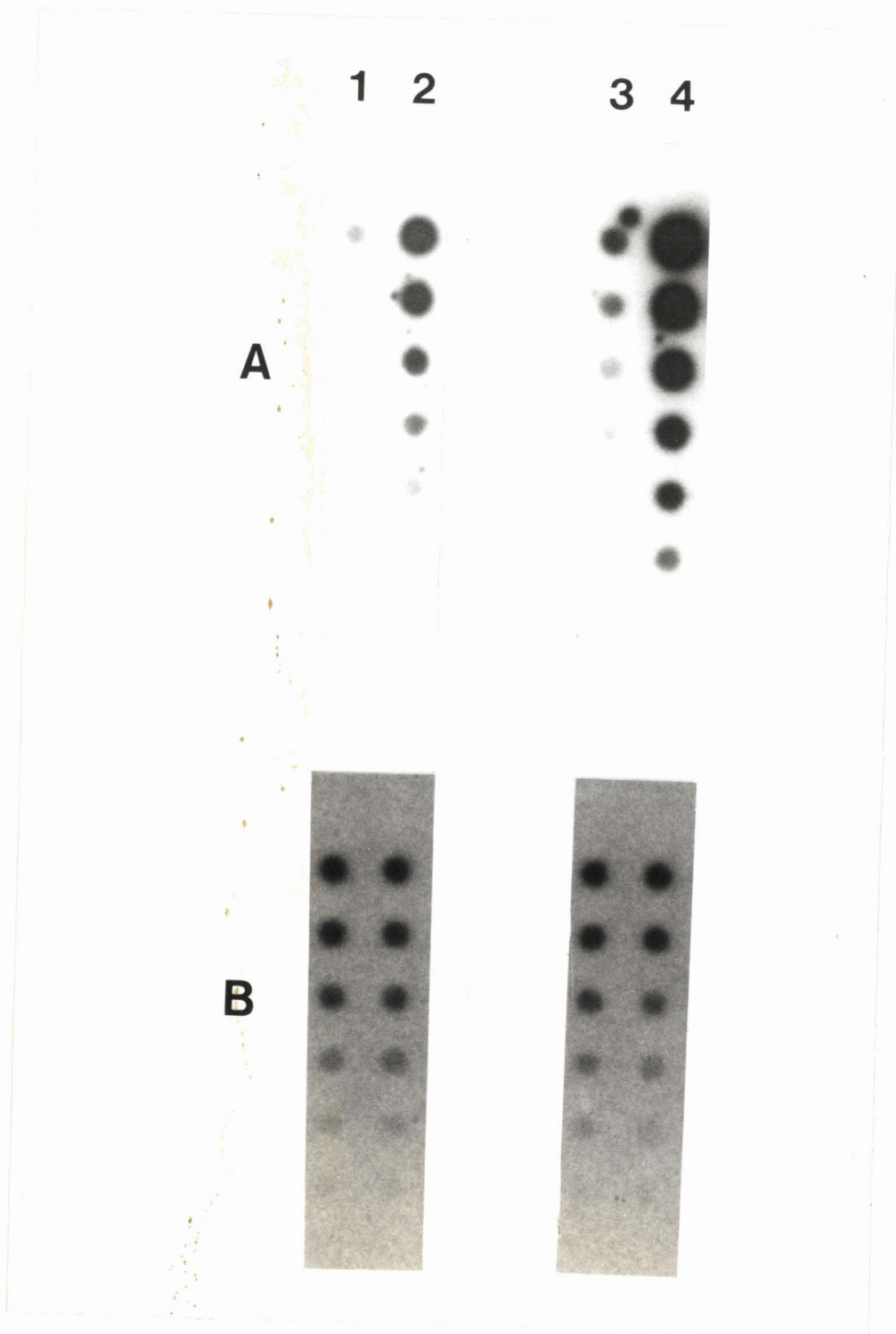
**Figure 5.C**

TABLE 1

	POSITIVE CELLS %		
	CD4	GP IIIa	p24
MOLT4	85	UND	UND
CEM	92	UND	UND
U937	95	UND	UND
NON-INFECTED DAMI CELLS	UND	95	UND
INFECTED DAMI CELLS 1	UND	98	20
INFECTED DAMI CELLS 2	UND	89	45
INFECTED DAMI CELLS 3	UND	96	60

Table 1: CD4, CD61(GP IIIa) and HIV-1 p24 expression.

Surface expression of CD4 and CD61 (GP IIIa), and of intracellular HIV-1 p24 was investigated in uninfected and infected Dami cells as well as in T cell-line (Molt-4, CEM) and in a monocytic cell line (U937). The results are expressed as % of positive cells over the control labelling by using purified mouse IgG1. p24 expression was determined after cell permeabilization. Dami cells 1, 2 and 3 were infected with 50,000 cpm inoculum since 1, 2 or 4 months (p24 level; 90, 220 and 320 ng/mL/million cells respectively). UND (undetected)

TABLE 2

DAYS	p24 LEVEL AFTER TREATMENT WITH		
	MEDIUM	INTERFERONS	TNF- α
5	7.2	2.0	16.8
7	5.2	1.3	40.0
11	7.2	0.5	104.0

Table 2: Effect of interferons and TNF- α on HIV-1 p24 secretion.

HIV-1 infected Dami cells (50,000 cpm infection, day 21, p24 level of 3 ng/mL/10⁶ cells) were treated with interferon α and interferon γ (1000 U/mL each) or with TNF α (100 U/mL). p24 levels as well as cell numbers and viability were monitored at different intervals. Only treatment with interferons had an effect on cell proliferation (inhibition). The p24 level were expressed as ng/mL/10⁶ viable cells. (one representative experiment out of 4)

TABLE 3

CONSTRUCT	FOLD INCREASE UPON TREATMENT WITH		
	MEDIUM	TNF	PMA
LTR-Luc	1	3	14
LTR-Luc + LTR-Tat	1	13	22
Enhancer-Luc	1	6	10

Table 3: TNF mediated HIV-1 transactivation.

Dami cells were transiently transfected with different constructs of the HIV-1 promotor (LTR) (see materials and methods) and incubated with TNF- α (100 U/mL) or with PMA (2.5 ng/mL) for 18 hours. Cells were counted, viability assessed, and cells were then lyzed to permit luciferase activity determination. Results are expressed as fold increase in the luciferase activity over the non-treated cells, after normalization to same number of cells, and is representative of 7 experiments.

ARTICLE N°3

**SYNERGISTIC ENHANCING EFFECT OF TGF- β AND TNF- α ON HIV-1
PRODUCTION BY THE DAMI MEGAKARYOCYTIC CELL LINE:
REGULATION OF HIV-1 PRODUCTION THROUGH DIFFERENT PATHWAYS.**

By Didier Monté, Hervé Groux, Robert Lafyatis, Joelle Dewulf, Bénédicte Plouvier,
Claude Auriault, André Capron, Jean-Claude Ameisen.

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire

Unité mixte INSERM 167-CNRS 624

Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex (FRANCE)

This work was supported by INSERM, CNRS, ARC and ANRS. Didier Monté is a fellow of Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS).

ACKNOWLEDGMENTS: The authors thank Christian Drolez, Jean-Pierre Kusnierz and Françoise Cottrez for expert technical assistance. The secretarial assistance of C Colson is appreciated. We acknowledge the following investigators for their gifts:

Drs F Arenzana-Seisdedos and JL Virelizier for HIV-1-LTR constructs

Dr SM Greenberg for the Dami cell-line.

CORRESPONDENCE:

Address correspondence to Dr Didier Monté

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Unité mixte INSERM U167-
CNRS 624, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. A. Calmette, 59019 Lille Cedex
(FRANCE). Telefax: 20 87 78 88

ABSTRACT

We have previously described the infection of the human megakaryocytic Dami cells by the HTLV-III_B strain of HIV-1 and the modulation of virus production in these cells by TNF- α . We report here that TGF- β 1, as well as TNF- α , enhances levels of HIV viral proteins and RNAs in Dami cells, and that both cytokines strongly synergize to increase the production of virus. This effect did not involve TGF- β mediated autocrine secretion of TNF- α , IL6 or IL1. Transient and stable transfection experiments using uninfected or HIV infected megakaryocytic cells with the HIV-1BRU promoter (LTR) linked to the luciferase reporter gene indicated that, in contrast to the effect of TNF- α , the effect of TGF- β did not involve regulation of HIV-1 transcription via the 5' LTR. Therefore, the presence of part at least of the HIV-1 genome downstream from the 5' LTR seems to be required for the TGF- β 1 enhancing effect.

Previous work on monocytic and lymphocytic cells has shown early direct transcriptional (for TNF- α , IL1, PMA or mitogens) as well as late post-transcriptional (for IL6 or GM-CSF) regulation of HIV-1 production. Our results indicate that TGF- β acts on HIV production via a third pathway, involving HIV-1 RNA enhancement after initiation of transcription. These findings indicate that signals provided by the immune system may enhance, through different mechanisms, HIV-1 expression in cells of the megakaryocytic lineage.

INTRODUCTION

HIV-1 RNA has been detected in bone marrow megakaryocytes from AIDS patients.(1) We and others have described *in vitro* HIV-1 and HIV-2 productive infection of megakaryocytic cell lines. (2,3) We have also shown that HIV-1 expression in the megakaryocytic Dami cell line can be enhanced by TNF- α , and inhibited by IFNs. (2)

Recently, considerable interest has been focused on the involvement of transforming growth factor β (TGF- β) in the pathogenesis of AIDS. This factor may be responsible for some of the T and B cell defects noted in HIV-1 infected patients.(4,5) In addition, TGF- β appears to modulate HIV-1 production, although its reported effect has varied depending of the cell or cell line examined. Ladzins *et al* (6) and Peterson *et al* (7) have reported that TGF- β enhances HIV-1 production in monocytes and peripheral blood leukocytes (PBL) infected *in vivo* or *in vitro*. Poli *et al* (8) however have described an *in vitro* inhibitory effect of TGF- β on PMA-induced HIV-1 production in the chronically infected U1 monocytic cell line. Despite these reports showing regulation of virus production by TGF- β , to date, its enhancing effect on HIV-1 RNA expression and the mechanism involved in TGF- β modulation of HIV virus production have not been studied.

TGF- β is a potent pleiotropic cytokine well known as a bifunctional regulator of phenotype and proliferation in certain cell populations.(9) It is secreted in a latent form by a variety of cells including lymphocytes, monocytes and platelets.(9) On the other hand, after activation, this factor can potently suppress T cell, B cell and macrophage functions.(10-12) Furthermore, TGF- β modulates the synthesis and/or effects of several cytokines and growth factors directly and/or via modulation of their receptor expression.(13)

These findings led us to investigate whether TGF- β , a strong inhibitor of megakaryocytopoiesis,(13) could modulate HIV-1 production in cells from this lineage.

MATERIALS AND METHODS

Dami cell-line. Dami cells, originally described by Greenberg *et al.*,(14) were cultured in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) (Gibco-BRL, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% horse serum.

Virus. The HTLV III-B strain of HIV-1(15) was provided by Dr Cogniaux (Institut Pasteur du Brabant, Bruxelles, Belgium) and was obtained highly purified and titrated to HIV core protein p24/mL (10^9 pg/mL). The virus was propagated in the Molt-4 CD4 positive T cell-line; supernatants were harvested at the peak of virus production; and virus stocks were made after filtration and stored in aliquots at -80°C . Reverse transcriptase activity was then determined.

Infection of Dami cells. Cells (10^5 /mL) were infected as previously described.--) HIV-1 p24 antigen production was evaluated using a commercial enzyme immunoassay (Abott Laboratories, North Chicago, USA). Each determination was made from one aliquot at two different dilutions. When cells were cultured in the presence of cytokines (Genzyme, Cambridge, USA), cytokines were added at each passage (3 to 4 days) unless indicated otherwise.

Northern Blot analysis. Total RNA was prepared from 5×10^6 cells by the RNAzol procedure (Cinna-Biotech, Friendwood, USA) . 10 μg samples of total RNA were separated by electrophoresis on 1% agarose denaturing gels(16) and transferred to HYBOND-N filters (Amersham, Paris, France). Blots were hybridized for 16 to 24 hours at 42°C with oligolabeled (random primed) restriction fragments. Filters were then washed with 0.1 SSC, 0.1% SDS at 65°C and exposed to XAR-Film (Kodak, Marne la vallée, France) for autoradiography.

Dot Blot analysis of RNA . Various dilutions of total RNA extracted from 5.10^5 HIV-1 infected Dami cells were spotted on Hybond-N membrane as previously described.(17) Blots

were then hybridized with an HIV-1 probe and after stripping with a 28S oligonucleotide.

Cell transfection. Cells were transfected by the DEAE-dextran procedure as previously described (18) with a HIV-1BRU LTR-Luciferase (LTR-Luc) construct. For stable transfection 1/10 quantity of the PSV2Neo plasmid was cotransfected, and cells were then cultured in the presence of G418 (1.5 mg/ml) (GIBCO-BRL). After selection, positive cells were detected by Luc activity after treatment with TNF- α (100 U/ml) or PMA (5 ng/ml) for 48 hours. These cells were then pooled to obtain a representative Dami cell population.

RESULTS

TGF- β 1 modulation of HIV-1 expression in infected Dami cells.

HIV-1 infected Dami cells exposed to various amount of TGF- β 1 (from 0.001 to 2 ng/ml) for up to 12 days showed increased virus replication. As previously reported for TNF- α , (2) TGF- β 1 enhanced in a dose and time-dependent manner both HIV protein and RNA production (Figure 1.A and 1.B respectively). TGF- β 1 concentrations higher than 2 ng/ml did not result in a further increase of HIV production (not shown). Part A and B of this figure are two representative experiments out of five.

Effect of TGF- β 1 treatment on HIV-1 infection of the Dami cells.

To determine at what time TGF- β exerted its effect, we treated the cells with this factor before, during or after HIV-1 infection. As shown in Table 2, TGF- β treatment before, as well as at the time of infection, enhanced virus production 20 days after infection, as compared to untreated cells. Further addition of TGF- β in cell medium after the infection further enhanced virus production.

Treatment of infected cell with TGF- β during 2 days only, enhanced HIV production after 6 days (Table 1), but this effect was less important than when TGF- β was continuously added to the culture.

TGF- β 1 synergizes with TNF- α in the upregulation of HIV-1 expression in Dami cells.

Having established that TNF- α and TGF- β were individually able to augment HIV production in infected Dami cells, we investigated the possibility that simultaneous stimulation of the cells with these cytokines could result in a further increase in virus production. We observed that co-stimulation of these cells with a low dose of TNF- α (25 U/ml) and TGF- β 1 (0.25 ng/ml) resulted in a synergistic induction of HIV production (Figure 2). Incubation of the cells for 11 days in the presence of both cytokines resulted in a 30 fold stimulation (up to 45 fold in some experiments) of HIV p24 expression over the basal levels, whereas incubation of Dami cells with TNF- α only or TGF- β only led to approximately 5 and 3 fold p24 increase respectively. (Figure

2.A) This synergistic induction of viral production in infected Dami cells was associated with increased levels of steady-state HIV RNA. (Figure 2.B)

TGF- β 1 enhancement of HIV-1 protein and RNA production is not related to a direct effect on HIV-1 LTR activity.

To assess whether TGF- β may act on HIV-1 production, as TNF- α via direct transcriptional regulation, transfection experiments were performed. TGF- β 1 (up to 10 ng/ml) never enhanced Luc activity in cells transiently or stably transfected with the HIV-1 Bru LTR-Luciferase construct, even after a 10 day treatment or in the presence of LTR-Tat construct (not shown). To determine if TGF- β action occurred only upon HIV-1 infection of the cells, LTR-Luc stable transfected cells were infected with HIV-1 and stimulated with TGF- β 1 (1 ng/ml) or TNF- α (100 U/ml). Figure 3.A shows that TGF- β and TNF- α each increased p24 level in supernatants and cell extracts, whereas Luc activity was only enhanced by TNF- α .

In addition, we performed HIV-1 and Luciferase RNA detection in total RNA extracted from these cells. Figure 3.B shows a significant accumulation of HIV RNA upon treatment with TNF- α or TGF- β . In contrast, an enhanced production of Luc RNA occurred only after incubation with TNF- α . These experiments suggest that TGF- β 1, in contrast to TNF- α , does not directly stimulate the HIV-1 LTR in the Dami cells.

DISCUSSION

In the present study, we show that the cytokine TGF- β , which plays an important role in megakaryocytopoiesis regulation, as well as in inflammation, tissue repair and immunity, directly upregulates HIV production in HIV-1 infected megakaryocytic Dami cells. Like TNF- α , TGF- β enhanced both HIV protein production and RNA expression, and these two cytokines synergized, augmenting virus production (these same effects were also observed in infected U937 cells; unpublished observation). HIV-infected patients have higher levels of TNF- α in their sera than normal controls.(19) It has also been reported that peripheral blood leukocytes (PBL) from AIDS patients produce enhanced levels of TGF- β .(4) Therefore, such synergistic effects of TNF- α and TGF- β on *in vitro* HIV production might be important to *in vivo* viral production in HIV infected patients.

At the molecular level, we have previously shown that TNF- α induction of HIV production in infected Dami cells activates HIV promoter activity through its NF- κ B binding site.(2) Like TNF- α , TGF- β 1 induced expression of viral proteins and increased significantly the level of steady-state viral mRNA over the constitutive level. However, treatment of cells transfected with the HIV-1BRU LTR-Luc construct with TGF- β did not show any variation in HIV-1 promoter activity, in contrast to what was observed with TNF- α . Even when cells were costimulated with TNF- α and TGF- β , HIV-1 promoter activity was not increased over TNF- α stimulation alone.

Various hypotheses can account for the effect of TGF- β . First, TGF- β could stabilize the RNA polymerase complex during HIV-1 gene transcription. This phenomenon might require modification or *de novo* synthesis of cellular proteins and their interaction with HIV-1 specific DNA or RNA sequence. Such a mechanism has been previously described for Tat.(20) Second, TGF- β might enhance HIV-1 mRNA stability for example through HIV-1 specific RNase inhibition. A similar mechanism has been previously described for CD28 on IL2 mRNA accumulation in T lymphocytes.(21) Because HIV-1 mRNA half-life is long (≥ 9 hours), we have not been able to detect such an effect, but we can not exclude it (not shown). Third, TGF- β could interfere with some inhibitory factors of HIV-1 transcription or act on element not in the HIV LTR construct.

Previous work has described early direct transcriptional (for TNF, IL1, PMA or mitogens)

as well as post-transcriptional (for IL6 or GM-CSF) regulation of HIV-1 production.(22) Our results suggest a new level of transcription regulation of HIV-1 by cytokines.

BIBLIOGRAPHY

1. **Zucker-Franklin D , Cao Y:** Megakaryocytes of human immunodeficiency virus-infected individuals express viral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5595, 1989;
2. **Monté D, Groux H, Raharinivo B, Plouvier B, Dewulf J, Clavel T, Torpier G, Auriault C, Capron A, Ameisen JC:** TNF- α enhances HIV-1 infection of megakaryocytic cells. *Blood* 79:2670, 1992
3. **Sakagushi M, Sato T, Groopman JE:** Human immunodeficiency virus infection of megakaryocytic cells. *Blood* 77:481, 1991
4. **Kekow J, Wachsman W, McCuthan JA, Cronin M, Carson DA, Lotz M:** TGF- β and non-cytopathic mechanism of immunodeficiency in HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8321, 1990
6. **Ladzins JK, Klimkait T, Woods-Cook K, Walker M, Alteri E, Cox D, Cerletti N, Shipman R, Bilbe G, McMaster G:** In vitro effect of TGF- β on progression of HIV-1 infection in primary mononuclear phagocytes. *J Immunol* 147:1201, 1991
7. **Peterson PK, Gekker G, Chao CC, Schut R, Molitor TW, Balfour HH:** Cocaine potentiates HIV-1 replication in peripheral blood mononuclear cell cocultures. *J Immunol* 146:81, 1991
8. **Poli G, Kinter A, Justement JS, Bressler P, Kehrl JH, Fauci A:** TGF- β suppresses HIV expression and replication in infected cell of the monocyte/macrophage lineage. *J Exp Med* 173:589, 1991
9. **Roberts AB, Sporn MB:** TGF- β . *Adv Cancer Res* 51:107, 1988
10. **Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB, Sporn MB:** TGF type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:5788, 1987
11. **Wahl SM, Hunt DA, Wong S, Dougherty S, McCartney-Francis N, Wahl LM, Ellingsworth L, Schmitd JA, Hall G, Roberts AB, Sporn MB:** TGF- β is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1 dependent lymphocyte proliferation. *J Immunol* 140:3026, 1988
12. **Kerhl JH, Roberts AB, Wakefield LM, Jakowlew S, Sporn MB, Fauci AS:** TGF- β is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol* 137:3855, 1986
13. **Ruscetti FW, Jacobsen SE, Roberts M, Broxmeyer HE, Engelmann GL, Dubois C, Keller JR:** Role of TGF- β 1 in regulation of hematopoiesis. *Ann New York Acad Sci* :31, 1991
14. **Greenberg SM, Rosenthal DS, Greeley TA, Tantravahi R, Handin RI:** Characterization of a new megakaryocytic cell line: Dami cell. *Blood* 72:1968, 1988
15. **Gallo RC, Salahudin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Foster P, Markham PD:**

- Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500, 1984
16. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T:** Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989
 17. **White BA, Carter Bancroft F:** ytoplasmic dot hybrydization. *J Biol Chem* 257:8569, 1989
 18. **Bruno E, Miller ME, Hoffman R:** Interacting cytokines regulate *in vitro* human megakaryocytopoiesis. *Blood* 73:671, 1989
 19. **Reddy M, Sorell SJ, Lange M, Grieco MH:** Tumor necrosis factor and HIV p24 levels in serum of HIV-infected populations. *J AIDS* 1:436, 1988
 20. **Haseltine WA:** Molecular biology of HIV-1. *FASEB J* 5:2349, 1991
 21. **Lindsten T, June CH, Ledbetter JA, Stella G, Thompson CB:** Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a cell surface mediated T cell activation pathway. *Science* 244:339, 1989
 22. **Rosenberg ZF, Fauci AS:** The immunopathogenesis of HIV infection. *Adv Immunol* 47:375, 1989

LEGENDS

Figure 1. Effect of TGF- β 1 treatment on HIV-1 production by infected Dami cells. a) p24 level in culture supernatants from cells treated with medium (■), or with 0.001 (□), 0.01 (▨), 0.1 (▩) or 1 (▧) ng/ml TGF- β 1 for various times (4 to 11 days). b) Dot Blot analysis of total RNA extracted from infected Dami cells cultured with medium (1) or with 1 (2), 0.1 (3) or 0.01 ng/ml (4) TGF- β 1 for 6 (D6), 9 (D9) or 12 days (D12) with a radiolabeled HIV-1 cDNA probe.

Figure 2. Effect of TGF- β 1 and TNF- α association on HIV-1 production by infected Dami cells. a) Infected cells were treated with either medium (■), 25 U/ml of TNF- α (▧), 0.5 ng/ml TGF- β 1 (▩), or both (▨) for 4, 7 and 11 days before p24 detection in culture supernatants. b) Infected Dami cells were treated for 11 days with either medium (A), 25 U/ml of TNF- α (B), 0.5 ng/ml TGF- β 1 (C), or both (D) for 4, 7 and 11 days (D4, D7 and D11 respectively) before total RNA extraction and Dot Blot analysis for HIV-1 RNA expression.

Figure 3. Effect of TNF- α or TGF- β treatment on p24 production, Luc activity and HIV-1 RNA expression in infected Dami cells stably transfected with the HIV-1BRU LTR-Luc construct: Dami cells were stably transfected with the HIV-1BRU LTR-Luc construct. After selection they were infected with the HTLV-IIIIB strain of HIV-1. When infection was established the cells were cultured with either medium (A), 100 U/ml TNF- α (B) or 1 ng/ml TGF- β 1 (C) for 3, 7 or 11 days (D3, D7 and D11 respectively, before : a) p24 production determination in cell supernatant (□) and in cell lysates (■). b) Luciferase activity. c) Northern Blot showing HIV-1 RNA and luciferase RNA on the same blot after stripping.

TABLE 1

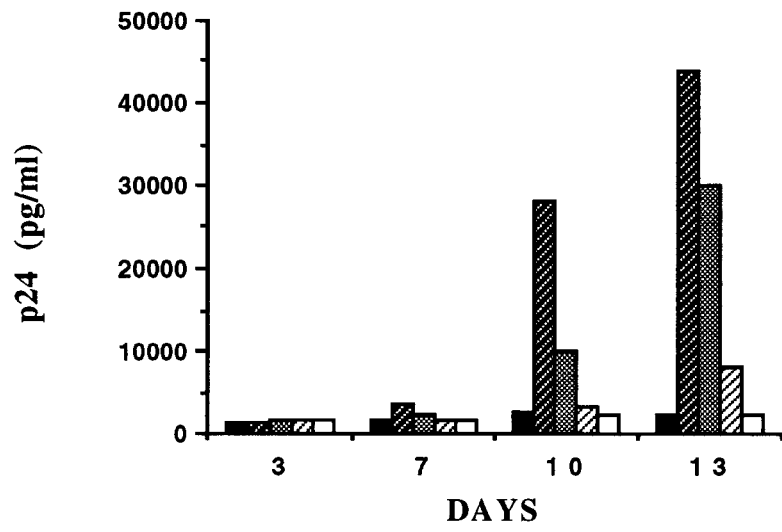
TIME OF TREATMENT WITH TGF (1 ng/ml)	p24 level (pg/ml) after			
	6 DAYS	9 DAYS	12 DAYS	17 DAYS
NO	3400	3800	5900	6000
2 DAYS	5200	16200	26200	30000
6 DAYS		37500	74000	80000
9 DAYS		50000	93000	120000
12 DAYS			90000	130000

Effect of TGF- β 1 treatment duration on HIV-1 p24 production: Infected Dami cells were treated with TGF- β 1 (1ng/ml) for various periods (6 to 17 days) before washing, and then cultured without TGF- β . p24 level was then determined in the cell supernatant.

TABLE 2

TIME OF TREATMENT WITH TGF (1 ng/ml)	p24 level (pg/ml) 20 days after infection
NO	<100
-7 TO 0	5700
-7 TO 20	>100000
-3 TO 0	8000
-3 TO 20	>100000
0 TO 3	2600
0 TO 20	>100000
3 TO 20	>100000

Effect of TGF- β 1 treatment onset on HIV-1 p24 production: Cells were treated before, during or after infection with the HTLV-IIIB strain of HIV-1. After three days, cells were washed three times and further treated or not with TGF- β . After 20 days p24 level was determined in culture medium.

**FIGURE 1.a**

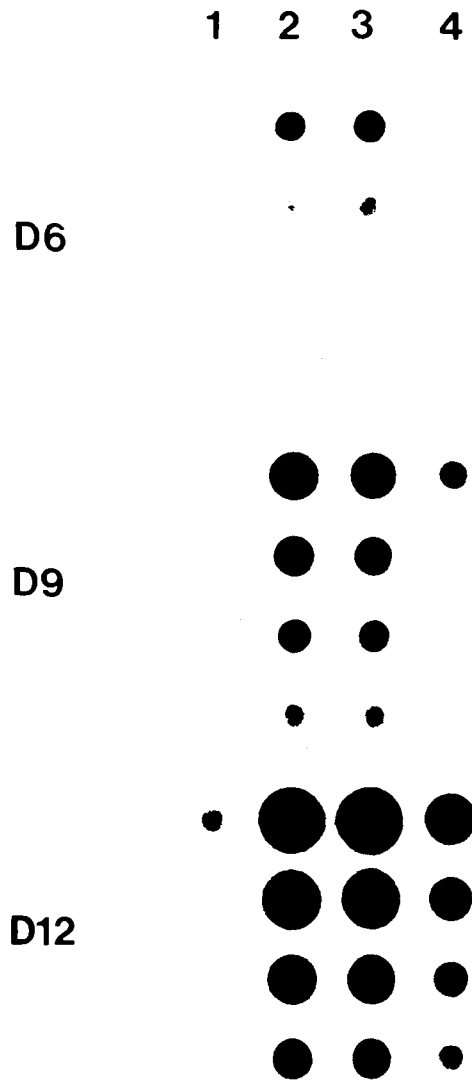
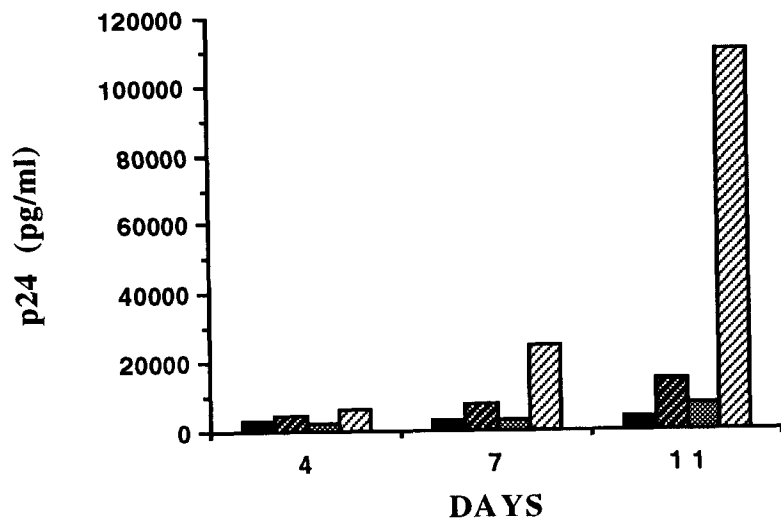


FIGURE 1.b

**FIGURE 2.a**

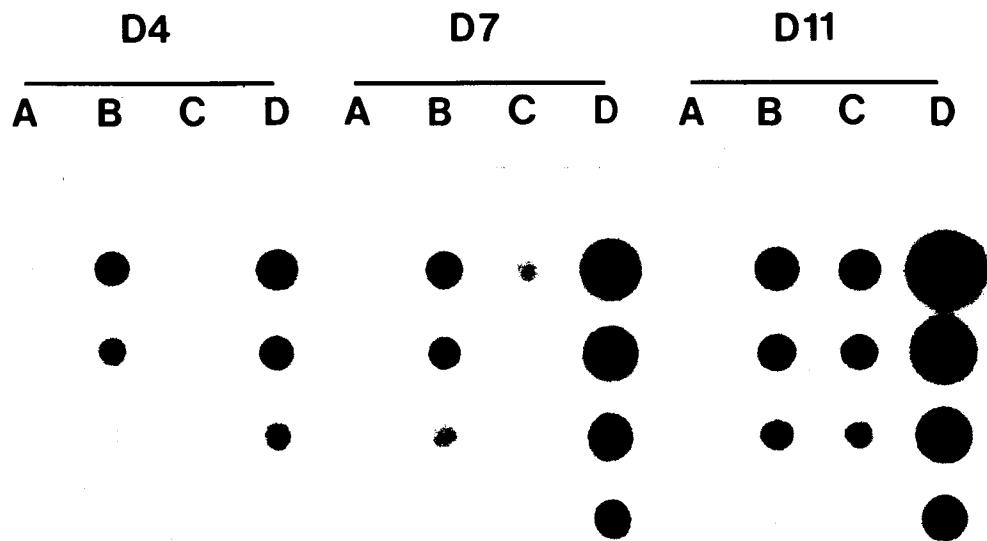


FIGURE 2. b

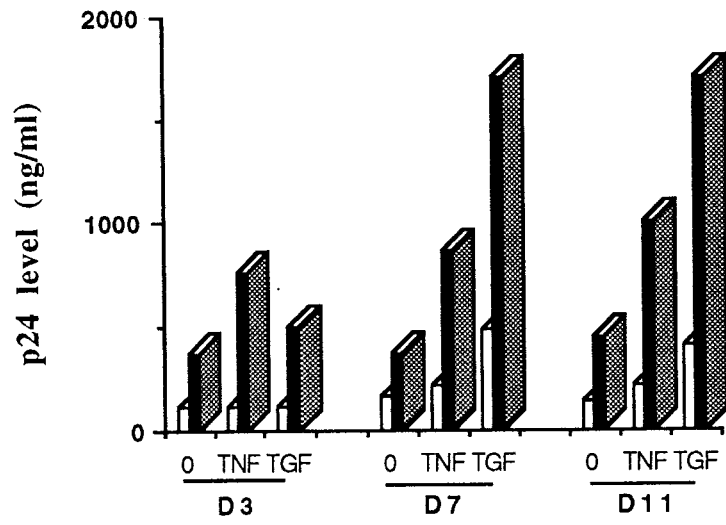


FIGURE 3.a

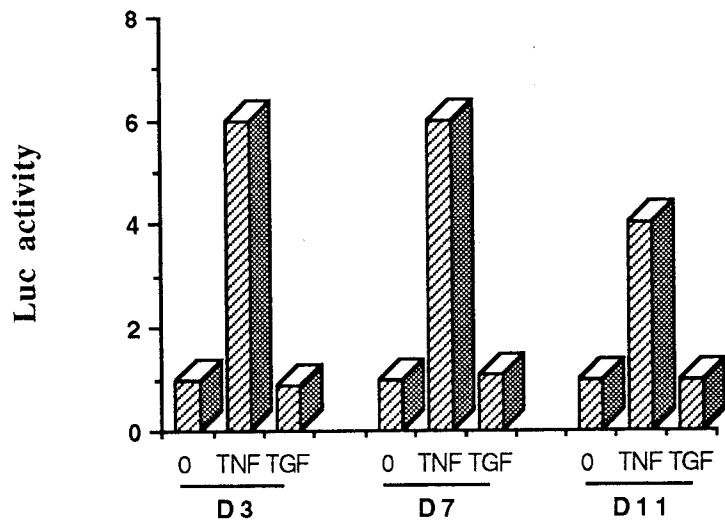


FIGURE 3.b

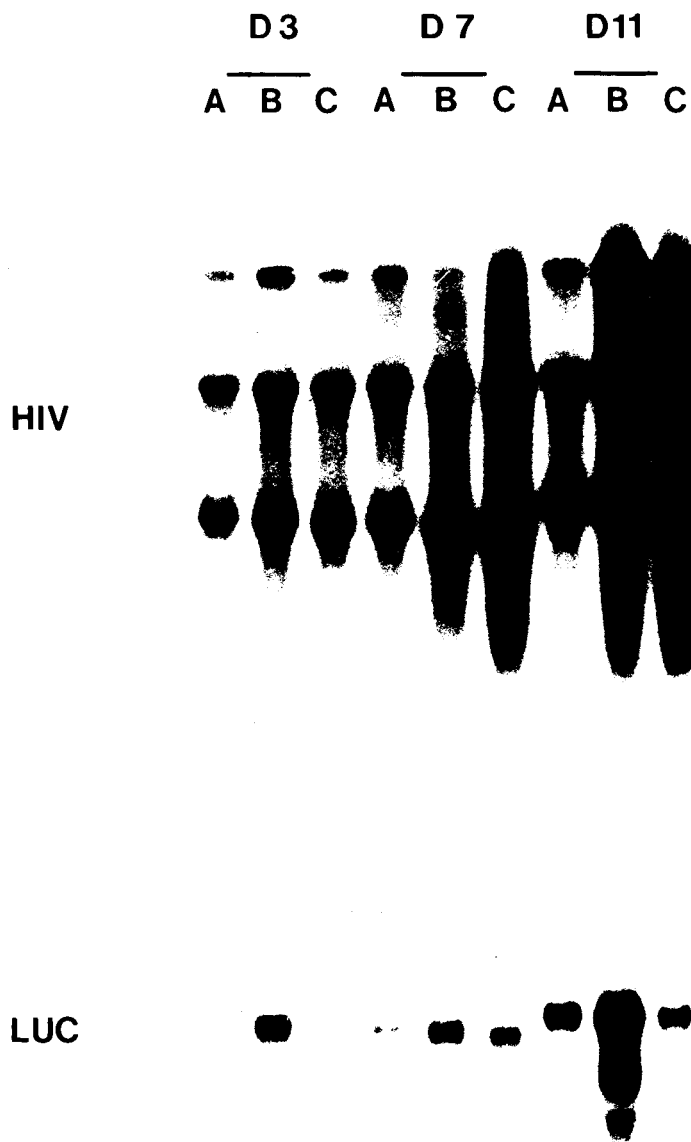


FIGURE 3.c

CONCLUSIONS

L'étude du rôle des plaquettes sanguines dans les mécanismes de défense antiparasitaire a mis à jour l'induction de leurs fonctions cytotoxiques par des cytokines, dont l'IFN- γ . Les plaquettes, dépourvues de noyau, possèdent des capacités de synthèse protéique extrêmement limitées. Il nous est donc apparu important d'étudier leurs progéniteurs: les mégacaryocytes.

Devant les difficultés inhérentes à l'utilisation de mégacaryocytes médullaires, nous avons eu recours à une lignée mégacaryocytaire, la lignée Dami.

La première partie de ce travail met en évidence l'existence sur les Dami du récepteur pour l'IFN- γ , déjà caractérisé sur de nombreuses cellules y compris sur les plaquettes. La fonctionnalité et la régulation de l'expression de ce récepteur dans les Dami sont identiques à celles observées sur les autres types cellulaires. Bien que ce récepteur soit fonctionnel sur les Dami (modification de l'expression des molécules du CMH), la suite de notre étude comme les données de la littérature, n'ont pas permis de mettre à jour un effet isolé de cette lymphokine sur les fonctions mégacaryocytaires. Par contre, il a été démontré que cette lymphokine potentialise la prolifération des progéniteurs médullaires et des cellules de la lignée mégacaryocytaire MO7 en réponse à l'IL3.

Ces données confirment l'existence d'un récepteur unique pour l'IFN- γ qui nécessite cependant l'intervention d'au moins une autre protéine (issue du chromosome 21) pour être fonctionnel et ceci quelque soit la cellule considérée. La régulation de l'expression du récepteur ainsi que les mécanismes déclenchant

les effets biologiques de l'IFN- γ sont à l'heure actuelle quasiment inconnus. Des réponses à ce niveau seront vraisemblablement apportées par le clonage du produit du chromosome 21 et du promoteur du récepteur. Par contre, dans le cadre de l'étude de l'infectabilité des mégacaryocytes par le VIH, nous avons constaté un effet direct de l'IFN- γ sur la production du virus par les Dami infectées.

La détection du VIH-1 dans les mégacaryocytes de patients atteints du SIDA et l'opportunité de disposer d'un modèle d'étude *in vitro* de ces cellules nous ont conduit à l'étude de l'infection de la lignée mégacaryocytaire Dami par ce rétrovirus.

Les Dami sont infectables par le VIH-1 et produisent une grande quantité de virus pendant plus d'une année sans modification notable de leur métabolisme. Des résultats similaires ont été obtenus par Sagakushi *et al* lors de l'infection de la lignée mégacaryocytaire CMK par le VIH-2. Cette absence d'effet cytopathogène du virus n'apporte pas de réponse quant à l'origine de la thrombopénie et des anomalies morphologiques des mégacaryocytes observables dans le SIDA. Ces données ne suffisent cependant pas pour exclure une intervention directe du virus. En effet, les cellules tumorales présentent des capacités de résistance et de prolifération différentes de celles des cellules normales. D'autre part, l'action destructrice du virus pourrait également s'opérer à un stade de différenciation des mégacaryocytes différent de celui des lignées. Enfin, l'intervention d'un cofacteur pourrait également avoir lieu *in vivo*.

La réplication du VIH-1 est particulièrement sensible aux cytokines dans les cellules T et les monocytes. Cette régulation dépend néanmoins du type cellulaire

infecté. Il nous est donc apparu intéressant de savoir si les cytokines avaient aussi un effet dans le cas de l'infection des Dami. Comme dans le cas des lymphocytes et des monocytes, nous avons constaté que les interférons inhibent la production de virus par les Dami, alors que le TNF- α et le TGF- β l'augmentent. On observe par ailleurs une synergie très importante entre ces 2 derniers facteurs, qui possèdent des modes d'action différents. En effet, le TNF- α induit la transcription du provirus via NF- κ B alors que le TGF- β en est incapable. Par la suite, nous avons pu situer l'action du TGF- β : en aval de l'initiation de la transcription mais en amont de la traduction des ARN viraux. Ce résultat constitue à notre connaissance la première mise en évidence d'un tel type de régulation dans le cadre du VIH.

Deux niveaux d'action sont envisageables pour le TGF- β :

- stabilisation des ARN viraux;
- amélioration du rendement de la transcription du génome viral directement ou en bloquant l'action d'un inhibiteur endogène de la transcription.

Des expériences de run-on permettront de faire la distinction entre ces 2 phénomènes. Par la suite, il sera nécessaire de déterminer la portion du génome viral, en aval du LTR5', qui est nécessaire à l'action du TGF- β . La caractérisation de cette séquence permettra de savoir si elle est spécifique du VIH ou si on la retrouve dans d'autres gènes cellulaires.

En conclusion, cette étude apporte un certain nombre de données nouvelles dans les domaines de concerne la biologie du récepteur de l'IFN- γ et de la régulation de l'expression du VIH-1 dans les cellules d'origine mégacaryocytaire. Elle contribue à souligner l'importance de l'action conjuguée des cytokines au

LISTE DE PUBLICATIONS

LISTE DE PUBLICATIONS

- 1992.1 H Groux, G Torpier, D. Monté, Y Mouton, A Capron, JC Ameisen: Activation-induced death by apoptosis in CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. J Exp Med 1992, 175:331
- 1992.2 D. Monté, H Groux, B Raharinivo, B Plouvier, J Dewulf, T Clavel, C Granette, G Torpier, C Auriault, A Capron JC Ameisen: Productive HIV-1 infection of megakaryocytic cells is enhanced by TNF- α . Blood 1992, 79:2670
- 1992.3 H Groux, D. Monté, B Plouvier, A Capron, JC Ameisen: IFN- γ gene expression in the absence of IL2 gene expression: a mechanism involved in CD3 mediated apoptosis of human mature thymocytes and mature activated peripheral T cells. Soumis dans Journal of Immunology
- 1992.4 D. Monté, H Groux, R Lafyatis, J Dewulf, B Plouvier, C Auriault, A Capron, JC Ameisen: Synergistic enhancing effect of TGF- β 1 and TNF- α on HIV-1 production by the Dami megakaryocytic cell line: Regulation of HIV-1 production through different pathways. En preparation pour soumission à Journal of Virology
- 1991.1 H Groux, D. Monté, JM Bourrez, A Capron, JC Ameisen: L'activation des lymphocytes T CD4⁺ de sujets asymptomatiques infectés par le VIH entraîne le déclenchement d'un programme de mort lymphocytaire par apoptose. C R Acad Sci Paris 1991, 312(III): 599
- 1991.2 D. Monté, J Wietzerbin, V Pancré, G Merlin, SE Greenberg, JP Kusnierz, A Capron, C Auriault: Identification and characterization of a fonctionnal receptor for interferon- γ on a megakaryocytic cell line: Blood 1991, 78(8): 2062

- 1990.1 V Pancré, D Monté, A Delannoye, A Capron, C Auriault: IL6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in the killing of *S. mansoni* larvae. European Cytokine Network 1990, 1: 1
- 1990.2 M Dammeville, D Monté, A Capron, C Auriault: The neuropeptide substance p stimulates the effector functions of platelets. Clin Exp Immunol 1990, 81: 346
- 1990.3 C Bronner, V Cothenet, D Monté, M Joseph, Y Landry, A Capron: Role of PLA2 and G-Proteins in the IgE-dependent activation of mast cells and macrophages. Agents Actions 1990, 30: 1
- 1987 C Bronner, C Wiggins, D Monté, F Marki, A Capron, Y landry: Compound 48/80 is a potent inhibitor of PLC and a dual modulator of PLA2 from human platelets. BBA 1987, 901: 301

BIBLIOGRAPHIE

1. **Zipori D:** Regulation of hemopoiesis by cytokines that restricted options for growth and differentiation. *Cancer cells* 2:205, 1990
2. **Bruno E, Miller ME, Hoffman R:** Interacting cytokines regulate *in vitro* human megakaryocytopoiesis. *Blood* 73:671, 1989
3. **Greenberg SM, Rosenthal DS, Greeley TA, Tantravahi R, Handin RI:** Characterization of a new megakaryocytic cell line: Dami cell. *Blood* 72:1968, 1988
4. **Ogura M, Morishima Y, Ohno R, Kato Y, Hirabayashi N, Nagura H, Saito H:** Establishment of a novel megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01 with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 66:1384, 1985
6. **Greenberg SM, Chandrasekhar C, Golan DE, Handin RI:** Transforming growth factor β inhibits endomitosis in the Dami human megakaryocytic cell-line. *Blood* 76:533, 1990
7. **Greenberg SM, Chandrasekhar C:** Hematopoietic factor-induced synthesis of von Willebrand factor by the Dami human megakaryocytic cell-line and by human megakaryocytes. *Exp Hematol* 19:53, 1991
8. **Zoon KC:** Human interferons: structure and function. *Interferon* 9:1, 1987
9. **Revel M, Chebath J:** Interferon-activated genes. *TIBS* 11:166, 1986
10. **Williams BRG:** Transcriptional regulation of interferon stimulated genes. *Eur J Biochem* 200:1, 1991
11. **Levy D, Darnell JE:** Interferon-dependent transcriptional activation: signal transduction without second messenger involvement. *The New Biologist* 2:923, 1990
12. **Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE:** Interferons and their actions. *Ann Rev Biochem* 56:727, 1987
13. **Orchansky P, Novick D, Fischer DG:** Type I and type II interferon receptors. *J Interferon Res* 4:275, 1984
14. **Uzé G, Lutfalla G, Gresser I:** Genetic transfer of a functional human interferon- α receptor into mouse cell: cloning and expression of its cDNA. *Cell* 60:225, 1990
15. **Bazan JF:** Shared architecture of hormone binding domains in type I and II interferon receptors. *Cell* 61:753, 1990
16. **Aguet M:** The interferon- γ receptor: a comparison with other cytokine receptors. *J Interferon Res* 10:551, 1990
17. **Aguet M, Dembic Z, Merlin G:** Molecular cloning and expression of the human interferon- γ receptor. *Cell* 55:273, 1988
18. **Bazan JF:** Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6934, 1990
19. **Young HA, Hardy KJ:** Interferon- γ : producer cells, activation stimuli, and molecular genetic regulation. *Pharmac Ther* 45:137, 1990

20. **Trinchieri G, Perussia B:** Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol Today* 6:131, 1985
21. **Laurence J:** Immunology of HIV infection, I: biology of the interferons. *AIDS Res Hum Retrovirus* 6:1149, 1990
22. **Samuel CE:** Antiviral actions of interferon, interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology* 183:1, 1991
23. **Rosa F, Fellous M:** The effect of gamma interferon on MHC antigens. *Immunol Today* 5:261, 1984
24. **Gastl G, Huber C:** The biology of interferon actions. *Blut* 56:193, 1988
25. **Romeo G, Fiorucci G, Rossi GB:** Interferons in cell growth and development. *TIG* 5:22, 1989
26. **Ellis TM, McKenzie RS, Simms PE, Helfrich BA, Fischer RI:** Induction of human LAK cells by IFN- α and IFN- γ . *J Immunol* 143:4282, 1989
27. **Pancré V, Joseph M, Mazingue C, Wietzerbin J, Capron A, Auriault C:** Induction of platelet cytotoxic functions by lymphokines: role of interferon gamma. *J Immunol* 138:4490, 1987
28. **Cassatella MA, Bazzoni F, Flynn RM, Dusi S, Trinchieri G, Rossi F:** Molecular basis of interferon- γ and LPS enhancement of phagocyte respiratory burst. *J Biol Chem* 265:20241, 1990
29. **James SL, Hibbs JB:** The role of nitrogen oxides as effector molecules of parasite killing. *Parasitol Today* 6:303, 1990
30. **Adams LB, Hibbs JB:** Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 144:2725, 1990
31. **Playfair JHL:** Non specific killing mechanism effective against blood stage malaria. *Immunol Lett* 25:173, 1990
32. **Dealtry GB, Naylor MS, Fiers W, Blkwil:** DNA fragmentation and cytotoxicity caused by TNF is enhanced by IFN- γ . *Eur J Immunol* 17:689, 1987
33. **Collart MA, Belin D, Vassali JD, Kossodo S, Vassali P:** γ -interferon enhances macrophage transcription of TNF, IL1 and urokinases genes which are controlled by short-lived repressors. *J Exp Med* 164:2113, 1986
34. **Sanceau J, Beranger F, Gaudalet C, Wietzerbin J:** IFN- γ is an essential cosignal for triggering IL6 gene expression in human monocytic cell lines. *Ann New York Acad Sci* 557:130, 1989
35. **Farber JM:** A macrophage mRNA selectively induced by γ -interferon encodes a member of the platelet factor 4 family of cytokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5253, 1990
36. **Ruggiero V, Tavernier J, Fiers W, Bagglioni C:** Induction of the synthesis of TNF receptors by interferon- γ . *J Immunol* 136:2445, 1986
37. **Sanceau J, Wijdenes J, Revel M, Wietzerbin J:** IL6 and IL6 receptor modulation by IFN- γ and TNF- α in human monocytic cell line (THP1). *J Immunol* 147:2630, 1991

38. **Herrmann F, Mertelsmann R:** Polypeptides controlling hematopoietic cell development and activation. In vitro results. *Blut* 58:117, 1989
39. **Ganser A, Carlo-Stella C, Greher J, Volkens B, Hoelzer D:** Effect of recombinant interferons alpha and gamma on bone marrow-derived megakaryocytic progenitor cell. *Blood* 70:1173, 1987
40. **Neuman HA, Fauser AA:** Effect of interferon on pluripotent hemopoietic progenitors (CFU-GEMM) derived from human bone marrow. *Exp Hematol* 10:587, 1982
41. **Broxmeyer HE, Lu L, Platzer E, Feit C, Juliano L, Rubin BY:** Comparative analysis of the influence of human gamma, alpha, and beta interferons on human multipotential (CFU-GEMM), erythroid (BFU-E) and granulocyte-macrophage (CFU-GM) progenitor cells. *J Immunol* 131:1300, 1983
42. **Carlo-stella C, Cazzola M, Ganser A, Barosi G, Dezza L, Meloni F, Pedrazzoli P, Hoelzer D, Ascari E:** Effects of recombinant alpha and gamma interferons on the in vitro growth of circulating hematopoietic progenitor cells (CFU-GEMM, CFU-Mk, BFU-E, and CFU-GM) from patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 70:1014, 1987
43. **Kawao Y, Takaue Y, Hirao A, Abe T, Saito SI, Matsunaga K, Watanabe T, Hirose M, Ninomiya T, Kuroda Y, Yokobayashi A, Asano S:** Synergistic effect of recombinant interferon- γ and IL3 on the growth of immature human hematopoietic progenitors. *Blood* 77:2118, 1991
44. **Hosoi T, Ozawa K, Ohta M, Okabe T, Urabe A, Takaku F:** Recombinant immune interferon inhibits leukemic cell growth by a monocyte-macrophage-mediated mechanism. *Exp Hematol* 13:597, 1985
45. **Saito T, Berens ME, Welander CE:** Direct and indirect effects of human recombinant gamma-interferon on tumor cells in a clonogenic assay. *Cancer Res* 46:1142, 1986
46. **Nedwin GE, Svedersky LP, Bringham TS, Palladino MA, Goeddel DV:** Effect of interleukin 2, interferon gamma and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta. *J Immunol* 135:2492, 1985
47. **Broxmeyer HE, Williams DE, Lu L, Cooper S, Anderson S, Beyer GS, Hoffman R, Rubin BY:** The suppressive influences of human tumor necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donors and patients with leukemia: synergism of tumor necrosis factor and interferon gamma. *J Immunol* 136:4487, 1986
48. **Tsujimoto M, Yip YK, Uilcek J:** Interferon gamma enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. *J Immunol* 136:2441, 1986
49. **Broxmeyer HE, Piacibello W, Juliano L, Platzer E, Berman E:** Gamma interferon induces colony-forming cells of the human monoblastic cell line U937 to respond to inhibition by lactoferrin, transferin, and acidic isoferritins. *Exp hematol* 14:35, 1986

51. **Anderson PS, Moore RN, Johnson HM, Oppenheim JJ:** Specific binding of ^{125}I -human interferon- γ to high affinity receptors on human fibroblasts. *J Biol Chem* 257:11301, 1982
52. **Littman SJ, Faltynek CR, Baglioni C:** Binding of recombinant ^{125}I -Interferon- γ to receptors on human cells. *J Cell Biochem* 260:1191, 1985
53. **Molinas F, Wietzerbin J, Falcoff E:** Human platelets possess receptors for a lymphokine: demonstration of high specific receptors for HuIFN- γ . *J Immunol* 138:802, 1987
54. **Der Stepiani L, Stefanos S, Lando D, Falcoff E, Wietzerbin J:** Interferon gamma is active on human lymphoblastoid Namalva cells without inducing an antiviral state. *Biochem Pharmacol* 37: 3271, 1988
55. **Monté D, Wietzerbin J, Pancré V, Merlin G, Greenberg SM, Kusnierz JP, Capron A, Auriault C:** Identification and characterization of a functional receptor for interferon- γ on a megacaryocytic cell line. *Blood* 78:2062, 1991
56. **Hemmi S, Peghini P, Metzler M, Merlin G, Dembic Z, Aguet M:** Cloning of murine interferon- γ receptor cDNA: expression in human cells mediates high-affinity binding but is not sufficient to confer sensitivity to murine interferon γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9901, 1989
57. **Mao C, Merlin G, Aguet M:** Differential regulation of the human IFN- γ receptor expression in Raji and IM9 lymphoblastoid cells versus THP-1 monocytic cells by IFN- γ and PMA. *J Immunol* 144:4688, 1990
58. **Finbloom DS, Hoover DL, Wahl LM:** The characteristics of binding of human recombinant IFN- γ to its receptor on human monocytes and human monocyte-like cell lines. *J Immunol* 135:300, 1985
59. **Fischer DG, Novick D, Orchansky P, Rubinstein M:** Two molecular forms of the human interferon- γ receptor. *J Biol Chem* 263:2632, 1988
60. **Fountoulakis M, Kania M, Ozmen L, Loetscher HR, Garotta G, Vanloon APMG:** Structure and membrane topology of the High-affinity receptor for human IFN- γ : requirements for binding of IFN- γ . *J Immunol* 143:3266, 1989
61. **Fisher T, Thoma B, Scheurisch P, Pfizenmaier K:** Glycosylation of the human interferon- γ receptor. *J Biol Chem* 265:1710, 1990
62. **Mao C, Aguet M, Merlin G:** Molecular characterization of the human interferon gamma receptor : analysis of polymorphism and glycosylation. *J Interferon Res* 9:659, 1989
63. **Jung V, Rashidbaigi A, Jones C, Tischfeld JA, Sows TB, Pestka S:** Human chromosome 6 and 21 are required for sensitivity to human IFN- γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4151, 1987
64. **Fisher T, Rehm A, Aguet M, Pfizenmaier K:** Human chromosome 21 is necessary and sufficient to confer human IFN- γ responsiveness to somatic cell hybrids expressing the cloned IFN- γ receptor gene. *Cytokine* 2:157, 1990

65. **Hibino Y, Mariano TM, Kumar CS, Kozak Ca, Pestka S:** Expression and reconstitution of a biologically active interferon- γ receptor in hamster cells. *J Biol Chem* 266:6948, 1991
66. **Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Tanigushi T, Hirano T, Kishimoto T:** IL6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer. *Cell* 58:573, 1989
67. **Honjo T:** Shared partners in receptors. *Current opinion in biology* 1:201, 1991
68. **Gibbs VC, Williams SR, Gray PW, Schreiber RD, Pennica D, Rice G, Goeddel DV:** the extracellular domain of the human interferon gamma receptor interacts with a species-specific signal transducer. *Mol Cellular Biol* 11:5860, 1991
69. **Finbloom DS, Wahl LM, Winestock KD:** The receptor for interferon- γ on human peripheral blood monocytes consists of multiple distinct subunits. *J Biol Chem* 266:22545, 1991
70. **Branca AA, Faltynek CR, D'Alessandro SB, Baglioni C:** Interaction of interferon with cellular receptors. Internalization and degradation of cell-bound interferon. *J Biol Chem* 257:13291, 1982
71. **Wietzerbin J, Gaudalet C, Aguet M, Falcoff E:** Binding and croos-linking of recombinant mouse interferon- γ to receptors in mouse leukemic L1210 cells. *J Immunol* 136:2451, 1986
72. **Kushnaryov VM, MacDonald HS, Sedmak JJ, Grossberg SE:** The cellular internalization of recombinant gamma interferon differs from that of natural interferon gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 30:109, 1988
73. **Monté D** résultats non-publiés
74. **Grossberg SE, Taylor JL, Kushnaryov VM:** Interferons receptors and their role in interferon action. *Experientia* 45:508, 1989
75. **Mao C, Merlin G, Ballotti R, Metzler M, Aguet M:** Rapid increase of the human IFN- γ receptor phosphorylation in response to human IFN- γ and PMA. *J Immunol* 145:4257, 1990
76. **MacDonald HS, Kushnaryov VM, Sedmak JJ, Grossberg SE:** Transport of γ -interferon into the nucleus may be mediated by nuclear membrane receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 138:254, 1986
77. **Sanceau J, Sondermeyer P, Beranger F Falcoff R, Vaquero C:** Intracellular human γ -interferon triggers an antiviral state in transformed murine L cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:2906, 1987
78. **Tanaka M, Kimura K, Yoshida S:** Inhibition of mammalian DNA polymerases by recombinant α -interferon and γ -interferon. *Cancer res* 47:5971, 1987
79. **Celada A, Allen R, Esparza I, Gray PW, Schreiber RD:** Demonstration and partial characterization of the IFN- γ receptor on human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 76:2196, 1985

80. **Kikkawa U, Nishizuka Y:** The role of PKC in transmembrane signalling. *Ann Rev Cell Biol* 2:149, 1986
81. **Raitano AB, Scuderi P, Korc M:** Upregulation of IFN- γ binding by TNF and LT: disparate potencies of the cytokines and modulation of their effects by phorbol ester. *J Interf Res* 11:61, 1991
82. **Raitano AB, Korc M:** TNF upregulates gamma interferon binding in a human carcinoma cell line. *J Biol Chem* 265:10466, 1990
83. **Alpha MJ, Jay FT:** Distinct domains of recombinant human IFN-gamma responsible for anti-viral effector function. *J Immunol* 146:2474, 1988
84. **Crobitt G, Bailey AS, William G:** HIV infection Manchester, 1959. *Lancet* 1:51, 1990
85. **Blattner WA:** HIV epidemiology: past, present, and future. *FASEB J* 5:2340, 1991
86. **Poiesz BJ, Ruscetti ,Lazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC:** Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7415, 1980
87. **Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauget C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L:** Isolation of a T-Lymphotropic retrovirus from a patient at risk from AIDS. *Science* 220:868
88. **Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Foster P, Markham PD:** Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500, 1984
89. **Levy JA, Hoffman AD, Kramer SL, Shimabukoro J, Oshiro LS:** Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Fransisco patients with AIDS. *Science* 1984 225:840, 1984
90. **Clavel F, Guétard D, Brun-Vézinet, et al:** Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 223:343, 1986
91. **Daniel MD, Letvin NL, King NW, Kannagi M, Sehgal PK, Hunnt RD, Kanki PJ, Essex M, Desrosiers RC:** Isolation of T-cell tropic HTLV-III like retrovirus from macaques. *Science* 228:1201, 1985
92. **Kanki PJ, Alroy J, Essex M:** Isolation of T-lymphocytic retroviruses from wild-caught African Green Monkeys. *Science* 230:951, 1985
93. **H Schellekens, Horzinek MC:** Animal models in AIDS. Elsevier Amsterdam 1990
94. **Bendinelli M, Ceccherini-Nelly L:** Mechanisms of retrovirus pathogenicity. *Clin Immunol* 9:57, 1988
95. **Poiesz BJ, Ruscetti FW, Mier JW, Woods AM, Gallo RC:** Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:6815, 1980
96. **Gelmann EP, Franchini G, Manzari V, WonStaal F, Gallo RC:** Molecular cloning

- of a unique T cell leukemia virus (HTLVII). Proc Natl Acad Sci USA 81:993, 1984
97. **Maurer B, Flugel RM:** Genomic organization of the human spumaretrovirus and its relatedness to AIDS and other retroviruses. AIDS Res Hum Retrovir 4:467, 1988
 98. **Varmus H:** Retroviruses. Science 240:1427, 1988
 99. **Rosenberg ZF, Fauci AS:** The immunopathogenesis of HIV infection. Adv Immunol 47:375, 1989
 100. **Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, Davis LJ, Heimbach JC, Dixon RA, Scolnick EM, Sigal IS:** Active HIV protease is required for viral infectivity. Proc Natl Acad Sci USA 85:4686, 1988
 101. **Rabson AB, Martin MA:** Molecular organization of the AIDS retrovirus. Cell 40:477, 1985
 102. **Haseltine WA:** Molecular biology of HIV-1. FASEB J 5:2349, 1991
 103. **Rosen CA:** Regulation of HIV gene expression by RNA-protein interactions. TIG 7:9, 1991
 104. **Garrett E, Tiley L, Cullen B:** Rev activates expression of the HIV-1 *vif* and *vpr* gene products. J Virol 65:1653, 1991
 105. **Sodoroski J, Goh WC, Rosen C, Tartar A, Portelle D, Burney A, Haseltine WA:** Replication and cythopatic potential of HTLV-III/LAV with *src* gene deletions. Science 231:1549, 1986
 106. **Strebel K, Daugherty D, Clouse K, Cohen D, Folks T, Martin M:** The HIV'A' gene products is essential for virus infectivity. Nature 328:728, 1987
 107. **Guatelli JC, Gingeras TR, Richman DD:** Alternative splice acceptor utilization during HIV 1 infection of cultured cells. J Virol 64:4093, 1990
 108. **Ahmad N, Venkatesan S:** Nef protein HIV-1 is a transcriptionnal repressor of HIV-1 LTR. Science 241:1481, 1988
 109. **Cheng-Mayer C, Lanello P, Shaw K, Luciw PA, Levy JA:** Differential effects of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host. Science 246:1629, 1989
 110. **Kim S, Ikeuchi R, Byrn R, Groopman J, Baltimore D:** Lack of a negative influence on viral growth by the nef gene of HIV-1. Proc Natl Acad Sci USA 86:9544, 1989
 111. **Kestler HW, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, Desrosiers RC:** Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. Cell 65:651, 1991
 112. **Cohen EA, Terwilliger EF, Sodoroski JG, Haseltine WA:** HIV vpr product is a virion-associated regulatory protein. J Virol 64:3097, 1990
 113. **Yu XF, Matsuda Z, Matsuda M, Essex M, Lee TH:** Open reading frame vpr of SIV encodes a virion-associated protein. J Virol 64:5688, 1990
 114. **Strebel K, Klimhait T, Martin M:** A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16 kd product. Science 241:1221, 1988
 115. **Terwilliger EF, Cohen EA, Lu Y, Sodoroski JG, Haseltine WA:** Functional

role of HIV-1 vpu. Proc Natl Acad Sci USA 86:5163, 1989

116. **Gallo R, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Parker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Foster P, Markham PD:** Frequent detection and isolation of cythopathic retroviruses (HTLVIII) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science 224:550, 1984
117. **Klatzmann D, Barré-Sinoussi F, Nuguyere MT, Danquet C, Vilmer E, Griscelli C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Gluckman JC, Cherman JC, Montagnier L:** Selective tropism of LAV for helper-inducer T lymphocyte. Science 225:59, 1984
118. **Sattentau OJ, Weiss RA:** The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. Cell 52:231, 1988
119. **Basch RS, Kouri YH, Karpatkin S:** Expression of CD4 by human megakaryocytes. Proc Natl Acad Sci USA 87:8085, 1990
120. **Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Schlossman S:** Separation of functionnal subsets of human T cells by a monoclonal antibody. Proc Natl Acad Sci 76:4061, 1979
121. **Stein BS, Gowda SD, Lifson JD, Penhallow RC, Bensch KG, Engleman EG:** pH independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. Cell 49:659, 1987
122. **Takeda A, Tuazon CU, Ennis FA:** Antibody-enhanced infection by HIV-1 via Fc receptor mediated entry. Science 242:580, 1988
123. **Boyer V, Desgranges C, Traubaud MA, Fisher E, Kazatchkine MD:** Complement mediates HIV-1 infection of the human T cell line in a CD4 and antibody independent fashion. J Exp Med 173:1151, 1991
124. **Mann DL, Read-Connole E, Arthur LO, Robey WG, Wernet P, Schnider EM, Blattner WA, Popovic M:** HLA-DR is involved in the HIV-1 binding site on cells expressing MHC Class II antigens. J Immunol 141:1131, 1988
125. **Clapham PR, Weber L, Whitby D, McIntosh K, Dalgleish A, Maddon P, Deen K, Sweet R, Weiss R:** Soluble CD4 blocks the infectivity of diverse strains of HIV and SIV for T cells and monocytes but not for brain and muscle cells. Nature 337:368, 1989
126. **Zucker-Franklin D, Termin CS, Cooper MC:** Structural changes in the megakaryocytes of patients infected with HIV-1. Am J Pathol 134:1295, 1989
127. **Parganihan A, Fiore D:** Odered interstrand and intrastrand DNA transfer during reverse transcription. Science 241:1064, 1988
128. **Kim SY, Byrn R, Groopman J, Baltimore D:** Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human HIV infection; evidence for differential gene expression. J Virol 63:3708, 1989
129. **Farnet C, Haseltine WA:** Integration of HIV-1 DNA in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 87:4164, 1990

130. **Bushman F, Craigie R:** Activities of HIV integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA. *Science* 249:1555, 1991
131. **Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP, Lamonica CA:** HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J* 9:1551, 1990
132. **Ho DD, Pomerantz RJ, Kaplan JC:** Pathogenesis of infection with HIV. *N Engl J Med* 317:278, 1987
133. **Berkhout B, Jeang KT:** Functional roles for the TATA promoter and enhancers in basal and Tat-induced expression of the HIV-1 LTR. *J Virol* 66:139, 1990
134. **Nabel G, Rice SA, Knipe DM, Baltimore D:** Alternative mechanism for activation of HIV enhancer in T cells. *Science* 239:1299, 1988
135. **Jones KA, Kadonga JT, Luciw PA, Tjian R:** Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor Sp1. *Science* 323:755, 1986
136. **Ross EK, Buckler-White AJ, Rabson AB, Englund G, Martin M:** Contribution of NF- κ B and Sp1 binding motifs to the replicative capacity of HIV-1: Distinct patterns of viral growth are determined by T-cell types. *J Virol* 65:4350, 1991
137. **Rosen CA, Sodoroski JG, Haseltine WA:** The location of *cis* acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III LTR. *Cell* 41:813, 1985
138. **Nabel G, Baltimore D:** An inducible transcription factor activates expression of HIV in T cells. *Nature* 326:711, 1987
139. **Libermann TA, Baltimore D:** Activation of IL6 gene expression through the NF- κ B transcription factor. *Mol Cell Biol* 10:2327, 1990
140. **Gilmore TD:** NF- κ B, KBF1, dorsal and related matters. *Cell* 62:841, 1990
141. **Cullen BR:** Regulation of HIV-1 gene expression. *FASEB J* 5:2361, 1991
142. **Kaufman JD, Valandra G, Rodriguez G, Busher G, Giri C, Norcross MA:** Phorbol ester enhances HIV-promoted gene expression and acts on a 10-base-pair functional enhancer element. *Mol Cell Biol* 7:3759, 1987
143. **Tong-Starksen S, Luciw PA, Peterlin BM:** The HIV-LTR responds to T-cell activation signals. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:6845, 1987
144. **Siekevitz M, Josephs SF, Dukovich M, Peffer N, Wong-Staal, Greene WC:** Activation of the HIV-1 LTR by T cell mitogens and the trans-activator protein of HTLV-1. *Science* 238:1575, 1987
145. **Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmer EA, Crabtree DR:** Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science* 241:202, 1988
146. **Garcia JA, Wu FK, Mitsuyasu R, Gaynor RB:** Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. *EMBO J* 6:3671, 1987
147. **Cross SL, Feinberg MB, Wolf JB, Holbrook NJ:** Regulation of the human interleukin 2 receptor α chain promoter by the transactivation gene of HTLV-1. *Cell* 49:47, 1987

148. **Lowenthal JW, Bohnlein E, Ballard DW, Grene WC:** Regulation of IL2 receptor gene expression: binding of inducible nuclear proteins to discrete promoter sequences correlate with transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci USA 85:4468, 1988
149. **Smith MR, Greene WC:** IL2-Rc alpha chain gene expression is negatively regulated by a 50kd transcriptional silencer. Proc Natl Acad Sci USA 86:8526, 1989
150. **Schwartz S, Felber BK, Pavlakis GN:** Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic HIV-1 mRNAs. Mol Cell Biol 12:207, 1992
151. **Hauber J, Perkins A, Heimer EP, Cullen BR:** Trans-activation of HIV gene expression is mediated by nuclear events. Proc Natl Acad Sci USA 84:6364, 1987
152. **Jacobovits A, Smith DA, Jacobovitz EB, Capon DJ:** A discrete element 3' of HIV-1 and HIV-2 mRNA initiation site mediates transcriptional activation by an HIV transactivator. Mol Cell Biol 8:2555, 1988
153. **Sheline CT, Milocco LH, Jones KA:** Two distinct nuclear transcription factors recognize loop and bulge residues of the HIV-1 TAR RNA hairpin. Genes Dvpt 5:2508, 1991
154. **Jones KA, Luciw PA, Durance N:** Structural arrangements of transcription control domains within the 5'-untranslated leader regions of the HIV-1 and HIV-2 promoters. Genes and development 2:1101, 1988
155. **Southgate CD, Green MR:** The HIV-1 Tat protein activates transcription from an upstream DNA-binding site: implications for Tat function. Genes Dvpt 5:2496, 1991
156. **Dayton A, Sodoroski JG, Rosen RC, Goh WC, Haseltine WA:** The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. Cell 49:941, 1986
157. **Pomerantz RJ, Seshamma T, Trono D:** Efficient replication of HIV type 1 requires a threshold level of rev: potential implications for latency. J Virol 66:1809, 1992
158. **Malim MH, Tiley LS, McCarn DF, Rushe JR, Hauber J, Cullen BR:** HIV-1 structural gene expression requires binding of the rev trans-activator to its RNA target sequence. Cell 60:675, 1990
159. **Vaishnav Y, Vaishnav M, Wong-Staal F:** Identification and characterization of a nuclear factor that specifically binds to the rev response element (RRE) of HIV-1. New Biol 3:142, 1991
160. **Chang DD, Sharp PA:** Regulation by HIV rev depends upon recognition of splice sites. Cell 59:789, 1989
161. **Felber BK, Hadzopoulou-Cladaras M, Cladaras C, Copeland T, Pavlakis GN:** Rev protein of human HIV-1 affects the stability and transport of the viral mRNA. Proc Natl Acad Sci USA 86:1495, 1989
162. **Arrigo SJ, Chen ISY:** Rev is necessary for the translation but not the cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. Genes Dvpt 5:808, 1991
163. **Feinberg MB, Jareet RF, Aldovini A, Gallo RC, Wong-Staal F:** HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. Cell 46:807, 1986

164. **Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR:** The HIV rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 338:254, 1989
165. **Pomerantz RJ, Trono D, Feinberg MB, Baltimore D:** Cells non productively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency. *Cell* 61:1271, 1990
166. **Jacks T, Power MD, Mastarz FM, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE:** Characterization of ribosomal frameshift in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331:280, 1988
167. **Debouck C, Gormiak JG, Strickler JE, Merck TD, Metcalf BW, Rosenberg M:** HIV protease expressed in *E. coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the gag precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8903, 1987
168. **Allan JS, Colignan JE, Barim F, McLane MF, Sodoroski JG, Rosen CA, Haseltine WA, Lee TH, Essex M:** Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLVIII. *Science* 228:1091, 1985
169. **DiMarzo-Veronese F, Devico A, Copeland T, Orozlan S, Sangadharan MG:** Characterization of gp41 as the transmembrane protein encoded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* 229:1402, 1985
170. **Peltz G:** A role for CD4 T cell subsets producing a selective pattern of lymphokines in the pathogenesis of human chronic inflammatory and allergic diseases. *Immunol Rev* 123:23, 1991
171. **Folks TM, Clouse A, Justement J, Rabson A, Duh E, Kehrl JH, Fauci A:** TNF induces expression of human immunodeficiency virus in chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2365, 1989;
172. **Mellors JW, Griffith BP, Ortiz MA, Landry ML, Ryan JL:** TNF alpha enhances HIV-1 replication in primary macrophages. *J Infect Dis* 163:78, 1991;
173. **Monté D, Groux H, Raharinivo B, Plouvier B, Dewulf J, Clavel T, Torpier G, Auriault C, Capron A, Ameisen JC:** TNF- α enhances HIV-1 infection of megakaryocytic cells. *Blood* in press
174. **Merril JE, Chen ISY:** HIV-1, macrophages, glial cells, and cytokines in AIDS nervous system disease. *FASEB J* 5:2391, 1991
175. **Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ:** TNF and IL1 stimulate the HIV enhancer by activation of NF-KB. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2336, 1989
176. **Koyanagi Y, O'Brien WA, Zhao JQ, Golde DW, Gasson JC, Chen ISY:** Cytokines alter production of HIV-1 from primary mononuclear phagocytes. *Science* 241:1673, 1988;
177. **Poli G, Bressler P, Kinter A, Duh E, Timmer WC, Rabson A, Justement JS, Stanley S, Fauci A:** IL6 induces HIV expression in monocytic cell alone or in synergy with TNF- α by transcriptional and post-transcriptional mechanism. *J Exp Med* 172:151, 1990

178. **Poli G, Kinter A, Justement JS, Bressler P, Kehrl JH, Fauci A:** TGF- β suppress HIV expression and replication in infected cell of the monocyte/macrophage lineage. *J Exp Med* 173:589, 1991
179. **Ladzins JK, Klimkait T, Woods-Cook K, Walker M, Alteri E, Cox D, Cerletti N, Shipman R, Bilbe G, McMaster G:** In vitro effect of TGF- β on progression of HIV-1 infection in primary mononuclear phagocytes. *J Immunol* 147:1201, 1991
180. **Peterson PK, Gekker G, Chao CC, Schut R, Molitor TW, Balfour HH:** Cocaine potentiates HIV-1 replication in peripheral blood mononuclear cell cocultures. *J Immunol* 146:81, 1991
181. **Monté D, Groux H, Lafyatis R, Dewulf J, Plouvier B, Auriault C, Capron A, Ameisen JC:** Synergistic enhancing effect of TGF- β and TNF- α on HIV-1 production by the dami megakaryocytic cell line: regulation of HIV-1 production by different pathways. En préparation en vue de sa soumission dans *Journal of Virology*
182. **Kornbluth RS, Oh PS, Munis JR, Cleveland PH, Richman DD:** The role of interferons in the control of HIV replication in macrophages. *Clin Immunol Immunopathology* 54:200, 1990
183. **Poli G, Orenstein JM, Kinter A, Folks TM, Fauci A:** Interferon-alpha but not AZT suppresses HIV expression in chronically infected cell lines. *Science* 244:575, 1989
184. **Shirazi Y, Pitha PM:** Alpha interferon inhibits early stages of HIV-1 replication cycle. *J Virol* 66:1321, 1992
185. **Wells DE, Chatterjee S, Mulligan MJ, Compans RW:** Inhibition of HIV-1 induces cell fusion by recombinant human IFN. *J Virol* 65:6325, 1991
186. **Reddy M, Sorell SJ, Lange M, Grieco MH:** Tumor necrosis factor and HIV p24 levels in serum of HIV-infected populations. *J AIDS* 1:436, 1988
187. **Kekow J, Wachsman W, McCuthan JA, Cronin M, Carson DA, Lotz M:** TGF- β and non-cytopathic mechanism of immunodeficiency in HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8321, 1990
188. **Albrecht MA, De Luca NA, Byrn RA, Schaffer PA, Hammer SM:** Herpes simplex virus immediate early protein. ICP4, is required to potentiate replication of HIV in CD4 lymphocytes. *J Virol* 63:1861, 1989;
189. **Casareale D, Fiala M, Chang CM, Cone LA, Macarski ES :** CMV enhances lysis of HIV-infected T lymphoblasts. *Int J cancer* 44:124, 1989;
190. **Lusso P, Enoli B, Markham PD, Ablashi DV, Salahuddin SZ, Tschachler E, Wong-Staal F, Gallo RC:** Productive dual infection of human T cells by HIV-1 and HHV-6. *Nature* 337:370, 1989;
191. **Kucera LS, Leake E, Lyer N, Raben D, Myrvik QN:** HIV-1 and HSV-2 can coinfect and simultaneously replicate in the same CD4 cell: effect of coinfection on HSV-2 and HIV-1 replication. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6:641, 1990

192. **Nelson JA, Reynolds C, Oldstone MB, Wiley CA:** HIV and HCMV co-infect brain cells in patients with AIDS. *Virology* 165:286, 1988
193. **Chowdry IH, Munakata T, Kyonagi Y, Kobayashi S, Arai S, Yamamoto N:** Mycoplasma can enhance HIV replication in vitro: a possible cofactor responsible for the progression of AIDS. *Bioch Biophys Res Comm* 170:1365, 1990
194. **Pomerantz RJ, Feinberg MB, Trono D, Baltimore D:** LPS is a potent monocyte macrophage-specific stimulator of HIV-1 expression. *J Exp Med* 172:253, 1990
195. **Valerie M, Cavard C, Zider A, Vernet M, Bennoum M, Saragosti S, Grimber G, Briand P:** In vivo activation by UV of HIV-1 LTR. *J Clin Invest* 86:1369, 1990
196. **Geelen JL, Minnaar RP, Boom R, Van der Noordaa J, Goudsmit J:** Heat-shock induction of HIV LTR. *J Gen Virol* 145:1120, 1988
197. **Stein B, Kramer M, Rhamsdorf HJ, Ponta H, Herlich P:** UV induced transcription from HIV-1 LTR and UV induced secretion of a factor that induces HIV transcription. *J Virol* 63:4540, 1989
198. **Sodoroski J, Goh WC, Rosen C, Campbell K, Haseltine WA:** Role of the HTLVIII/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* 322:470, 1986
200. **Harper ME, Marselle LM, Gallo RC, Wong-Staal S:** detection of lymphocytes expressing HTLV-III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:772, 1986
201. **Schnittman SM, Psallidopoulos MC, Lane HC, Thompson L, Baseler M, Massari F, Fox CH, Salzmann NP, Fauci AS:** The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintain expression of CD4. *Science* 245:305, 1989
202. **Mc Elrath MJ, Steinman M, Cohn ZA:** Latent HIV-1 infection in enriched populations of blood monocytes and T cells from seropositive patients. *J Clin Invest* 87:27, 1991
203. **Lyerly HK, Matthews TJ, Langlois AJ, Bolognesi DP, Weinhold KJ:** human T cell lymphotropic virus III-B glycoprotein (GP120) bound to CD4 determinants on normal lymphocytes and expressed by infected cells serves as target for immune attack. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4601, 1987
204. **Zarling JM, Ledbetter JA, Sias J, Fultz P, Eichberg J, Gjerset G, Moran PA:** HIV-infected humans, but not chimpanzees, have circulating cytotoxic T cells that lyse uninfected CD4 cells. *J Immunol* 144:2992, 1990
205. **Ameisen JC, Capron A:** T-cell dysfunction and depletion in AIDS; the programmed cell death hypothesis. *Immunol Today* 4:102, 1991
206. **Groux H, Monté D, Bourrez JM, Capron A, Ameisen JC:** L'activation des lymphocytes CD4 de sujets asymptomatiques infectés par le VIH entraîne le déclenchement d'un programme de mort lymphocytaire par apoptose. *CRAS* 312:599, 1991
207. **Groux H, Torpier G, Monté D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC:** Activation-induced death by apoptosis in CD4 T cells from human HIV infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 175:331, 1992

208. **Imberti L, Sottini A, Bettinardi A, Puotti M, Primi D:** Selective depletion in HIV infection of T cells that bear specific T cell receptor Vbeta sequences. *Science* 254:860, 1991
209. **Stewart SJ, Fujimoto J, Levy J:** Human T lymphocytes and monocytes bear the same T4 antigen. *J Immunol* 136:3773, 1986
210. **Levy J, Shimabukuro J, McHugh T, Casavant C, Stites D, Oshiro L:** AIDS associated retroviruses (ARV) can productively infect other cells besides T cells. *Virology* 147:441, 1985
211. **Ho D, Rota TR, Hirsch MS:** Infection of monocyte/macrophages by HTLVIII. *J Clin Invest* 77:1712, 1986
212. **Salahuddin SZ, Rose RM, Groopman JE, Markham PD, Gallo RC:** HTLVIII infection of human alveolar macrophages. *Blood* 68:281, 1986
213. **Nicholson JK, Cross GD, Callaway CS, McDoughal JS:** In vitro infection of human monocytes with HTLVIII/LAV. *J Immunol* 137:223, 1986
214. **Poli G, Bottazzi B, Acero R, Bersani L, Rossi V, Introna M, Mantovani A:** Monocyte function in intravenous drug abusers with lymphadenopathy syndrome and AIDS: selective impairment of chemotaxis. *Clin Exp Immunol* 62:136, 1985
215. **Washburn RG, Tuazon CU, Bennett JE:** Phagocytic and fungicidal activity of monocytes from AIDS patients. *J Infect Dis* 151:565, 1985
216. **Murray HW, Scavuzzo D, Jacobs JL, Kaplan MH, Libby DM, Roberts RB:** Activation of tissue macrophage from AIDS patients: in vitro response of AIDS alveolar macrophages to lymphokines and IFN-gamma. *J Immunol* 135:2374, 1985
217. **Pommerantz RJ, Kuritzkes DR, de la Monte SM, Hirsch MS:** Infection of the retina by HIV-1. *New Engl J Med* 317:1643, 1987
218. **Tschalcher E, Groh V, Popovic M, Mann DL, Konrad K, Safai B, Eron L, diMarzo Veronese F, Wolff K, Stingl G:** Epidermal Langerhans cells- a target for HTLVIII/LAV infection. *J Clin Dermatol* 88:233, 1987
219. **Eales LJ, Farrant J, Helbert M, Pinching AJ:** Peripheral blood dendritic cells in persons with AIDS and ARC. *Clin Exp Immunol* 71:423, 1988
220. **Adachi A, Koenig S, Gendelman HE, Daugherty D, Gattoni S, Fauci A, Martin MA:** Productive, persistent infection of human colorectal cell lines with HIV. *J Virol* 61:209, 1987
221. **Dewhurst S, Sakai K, Bresser J, Stevenson M, Volsky DJ:** Persistent productive infection of human glial cells by HIV and by infectious molecular clones of HIV. *J Virol* 61:3774, 1987
222. **Sakagushi M, Sato T, Groopman JE:** Human immunodeficiency virus infection of megakaryocytic cells. *Blood* 77:481, 1991
223. **Scadden DT, Zon LI, Groopman JE:** Pathophysiology and management of HIV-associated hematologic disorders. *Blood* 74:1455, 1989
224. **Spivak JL, Bender BS, Quinn TC:** Hematological abnormalities in AIDS. *Am J Med* 77:224, 1984

225. **Ganser A**: Abnormalities of hematopoiesis in AIDS. *Blut* 56:49, 1988
226. **Zucker-Franklin D, Termin CS, Cooper MC**: Structural changes in the megakaryocytes of patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV-1). *Am J Pathol* 134:1295, 1989
227. **Pasternak J, Bolivar R**: Bone marrow examination and culture in the diagnosis of AIDS. *Arch Intern Med* 143:1495, 1983
228. **Von Laer D, Hufert FT, Fenner TE, Swander S, Dietrich M, Schmitz H, Kern P**: CD34⁺ hematopoietic progenitor cells are not a major reservoir of the human immunodeficiency virus. *Blood* 76:1281, 1990;
229. **Zucker-Franklin D, Cao Y**: Megakaryocytes of human immunodeficiency virus-infected individuals express viral RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:5595, 1989;
230. **Louache F, Bettaieb A, Henri A, Oksenhendler E, Farcet JP, Bierling P, Seligmann M, Vainchenker W**: Infection of megakaryocytes by HIV in seropositive patients with immune thrombocytopenic purpura. *Blood* 78:1697, 1991
231. **Folks A, Kitano K, Abboud CN, Ryan DH, Quan SG, Baldwin GC, Golde DW**: Macrophage-active colony stimulating factors enhance human HIV-1 infection in bone marrow stem cells. *Blood* 77:1699, 1991
232. **Stella CC, Ganser A, Hoelzer D**: Defective in vitro growth of the hemopoietic progenitor cells in AIDS. *J Clin Invest* 80:286, 1987
233. **Donahue RE, Johnson MM, Zon LI, Clark SC, Groopman JE**: Suppression of in vitro haematopoiesis following human immunodeficiency virus infection. *Nature* 326:200, 1987
234. **Re MC, Zauli G, Furlini G, Giovanni M, La Placa M**: HIV-1 infection and hematologic picture. *Microbiologica* 14:165, 1991
235. **Ruscetti FW, Jacobsen SE, Roberts M, Broxmeyer HE, Engelmann GL, Dubois C, Keller JR**: Role of TGF- β 1 in regulation of hematopoiesis. *Ann New York Acad Sci* :31, 1991
236. **Scadden DT, Zeira M, Woon A, Wang Z, Schieve L, Ikeuchi K, Lim K, Groopman JE**: HIV infection of human bone marrow stromal fibroblasts. *Blood* 76:317, 1990
237. **Groopman JE, Mitsuyasu T, Deleo MJ, Oette DH, Golde DW**: Effect of GM-CSF on myelopoiesis in AIDS. *N Engl J Med* 317:593, 1987
238. **Oksenhendler E, Seligman M**: HIV-related thrombocytopenia. *Immunodeficiency Review* 2:221, 1990

