

50376
1993
308

Université des Sciences et Techniques de Lille I

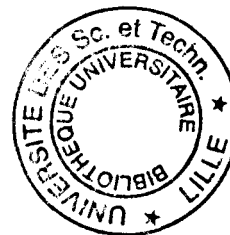
50376
1993
308

N° d'ordre 1172

THESE DE DOCTORAT
pour le titre de Docteur en Sciences de la Vie et de la Santé
Option : Immunologie

LE ROLE DE LA PROTEINE VIRALE NEF DANS LE DYSFONCTIONNEMENT DU
SYSTEME IMMUNITAIRE INDUIT PAR LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE
HUMAINE

Roxanne CARREER



Présentée le 6 octobre 1993 devant la commission d'examen :

Président: Pr Maurice PORCHET
Rapporteurs: Pr Arsène BURNY
Dr Jean CHAUDIERE
Examineurs: Pr André CAPRON
Dr Jean-Claude AMEISEN

Laboratoire d'accueil:

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire, Institut Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, Lille. Directeur: Pr André Capron

"Mais alors, osais-je commenter, vous êtes encore loin de la solution...

- J'en suis très près, dit Guillaume, mais je ne sais pas de laquelle.
- Donc, vous n'avez pas qu'une seule réponse à vos questions?
- Adso, si tel ,était le cas, j'enseignerais la théologie à Paris."

Umberto Eco, *Le nom de la rose*

Je remercie très chaleureusement:

- Monsieur le Professeur André CAPRON pour m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche. Que ce mémoire soit le témoignage de mon respect et de ma sincère reconnaissance.

- Monsieur le Professeur Maurice PORCHET, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse, veuillez accepter mes sincères remerciements.

- Monsieur le Docteur Jean-Claude AMEISEN, pour la qualité de son encadrement, son dynamisme partagé, ses nombreux conseils et son enthousiasme de tous les jours. Merci de m'avoir fait partager votre passion pour la recherche. Qu'il me soit permis, en cette occasion, de vous exprimer ma plus profonde reconnaissance.

- Monsieur le Professeur Arsène BURNY, pour avoir accepté de juger l'ensemble de ce travail.

- Monsieur le Docteur Jean CHAUDIERE, pour vos conseils avisés, votre gentillesse et pour avoir accepté de juger l'ensemble de ce travail.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ce travail ou qui m'ont accordé leur amitié.

TABLE DES MATIERES

A. INTRODUCTION	7
1. LES RETROVIRUS	7
1.1. Les oncovirus	7
1.2. Les spumavirus	8
1.3. Les lentivirus	8
2. CYCLE DE REPLICATION VIRAL DU VIH-1	9
2.1. Structure des particules virales	9
2.2. Absorption et pénétration	10
2.3. Synthèse du provirus et intégration	10
2.4. Organisation génomique	12
2.4.1. Structure du LTR	12
2.4.2. Gènes codés par le génome du VIH-1	17
2.5. Transcription et traduction	17
2.6. Encapsidation et libération	18
3. PROTEINES DE REGULATION	18
3.1. Tat (Trans-activator gene)	19
3.2. Rev (regulator of virion expression)	22
3.3. Vif (virus infectivity factor)	25
3.4. Vpu (viral protein U)	26
3.5. Vpr (viral protein R)	28
3.6. Nef (Negative factor)	29
3.6.1. Caractéristiques structurales et biochimiques	29
3.6.2. Réponse immune anti-Nef	30
3.6.3. Rôle de Nef dans la pathologie de l'infection	32
3.6.4. Tableau résumé	36
4. CARACTERISTIQUES DE L'INFECTION PAR LE VIH	36
5. LES MECANISMES IMMUNOPATHOLOGIQUES DE L'INFECTION PAR LE VIH	40
5.1. Les effets cytopathogènes du VIH	40

5.2. Dysfonctionnement des cellules T CD4 ⁺	42
B. OBJECTIFS	43
C. ARTICLE 1	45
1. ARTICLE	46
2. DISCUSSION	59
D. ARTICLE 2	62
1. ARTICLE 2	63
2. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	85
2.1. Introduction	85
2.2. Matériels et méthodes	85
2.3. Résultats	86
3. DISCUSSION	88
E. LES FORMES ACTIVEES DE L'OXYGENE ET L'INFECTION PAR HIV	91
1. INTRODUCTION	91
2. APERCU THEORIQUE	91
2.1. Définition des formes activées de l'oxygène	91
2.2. Origines des FAO	97
2.2.1. Les mitochondries	97
2.2.2. Activation de la NADPH oxydase	97
2.2.3. Formation des formes radicalaires oxygénées par voie exogène	99
2.3. Mécanismes de protection cellulaire	99
2.3.1. Les superoxydes dismutases (SOD)	100
2.3.2. La catalase	100
2.3.3. Les glutathion peroxydases et réductases	100
2.3.4. La vitamines E	101
2.3.5. Les groupements thiols	101
2.4. ROLES DES FAO	103

2.4.1. Défense non spécifique	103
2.4.2. Dans l'activation cellulaire	104
2.4.3. Messagers extracellulaires	105
3. ROLE DES FAO DANS L'IMMUNOPATHOLOGIE INDUITE PAR LE VIH	106
3.1. Poussée respiratoire des phagocytes et infection par le VIH	106
3.2. Niveau en glutathion chez les individus infectés	107
4. LE ROLE DE NEF DANS LE METABOLISME OXYDATIF	108
4.1. Résultats et discussion	108
4.1.1. Mesure de la poussée respiratoire	108
4.1.2. Dosage des groupements thiols en présence de Nef	112
4.1.3. Mesure de l'activation du LTR et de la prolifération lymphocytaire	113
4.2. Matériels et méthodes	115
4.2.1. Culture cellulaire et transfection	115
4.2.2. Marqueurs phénotypiques	116
4.2.3. Mesure de la poussée respiratoire	116
4.2.4. Mesure de l'activité piègeurs des radicaux libres de Nef	117
4.2.5. Mesure du rapport NADPH / NADP ⁺	117
4.2.6. Mesure des thiols	117
4.2.7. Détermination du glutathion intracellulaire	118
4.2.8. Titrage de la superoxyde dismutase	119
4.2.9. Mesure de la prolifération antigène dépendante et de la MLR	120
4.2.10 Activation du LTR du VIH-1	121
F. CONCLUSIONS / PERSPECTIVES	121
G. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125

LISTE DES ABREVIATIONS

BLV	Bovine leukemia virus
B-EBV	Lymphocytes B transformés par le virus d'Epstein Barr
CAEV	Caprine Infectious Encephalitis Virus
CAT	Cloramphenicol Acetyl Transferase
CFD	Cellules Folliculaires Dendritiques
CL	Chimiluminescence
EIAV	Equine Infectious Anemia Virus
FAO	Formes Activées de l'Oxygène
FeLV	Feline Leukemia Virus
GSH	Glutathion
HTLV-1	Human T cell Leukemia Virus-1
LTR	Long Terminal Repeat
MLR	Mixed Lymphocytes Reaction
NAC	N-Acetyl-l-Cystéine
NADPH	β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NRE	Negative Regulatory Element
PBL	Pheripheral Blood Lymphocytes
PHA	Phytohemagglutinin
PKC	Protéine Kinase C
PKW	Pokeweed Mitogen
PR	Poussée respiratoire
RT PCR	Transcriptase Reverse Polymerase Chain Reaction
SEB	Enterotoxine Staphylococcique B
SIDA	Syndrome d'Immunodéficience acquise
SIV	Simian Immunodeficiency virus
SOD	Superoxide Dismutase
STLV	Simian T Leukemia Virus
TAR	Trans Activation Responsive domain
TK	Thymidine Kinase
VIH (HIV)	Virus de l'immunodéficience humaine

A. INTRODUCTION

1. LES RETROVIRUS

Pendant longtemps les rétrovirus sont apparus comme des virus essentiellement animaux, responsables de leucémies, de sarcomes ou d'infections à évolution lente comme le visna maedi du mouton ou encore l'anémie infectieuse des équidés. Ce n'est qu'en 1980, près de 70 ans après la découverte du virus aviaire du sarcome de Rous, qu'a été décrit par l'équipe de R.C.Gallo aux USA et celle de Y. Hinuma au Japon le premier rétrovirus humain, le HTLV-1 ("*human T cell leukemia/lymphoma virus*").

Trois ans plus tard, en 1983, F. Barre-Sinoussi à l'Institut Pasteur de Paris isole un nouveau rétrovirus humain à partir de cellules T d'un patient atteint du syndrome de lymphadénopathie (Barre-Sinoussi et al. 1983). Ce syndrome précède souvent celui de l'immunodéficience acquise ou SIDA. La famille des rétrovirus est définie par la présence de la transcriptase inverse permettant la transcription de l'ARN viral génomique en ADN permettant l'intégration dans le génome de la cellule infectée. Elle est actuellement subdivisée en trois sous-familles.

1.1. Les oncovirus

Ces virus sont responsables de tumeurs et de leucémies. Les HTLV appartiennent à ce groupe (Poiesz et al. 1980). Chez les animaux, des virus très proches comme le STLV (Simian T Leukemia Virus), le BLV (Bovine Leukemia Virus) et le FeLV (Feline Leukemia Virus) ont été identifiés.

1.2. Les spumavirus

Détectés pour la première fois dans des cellules de singes qui dégénéraient en formant des syncytia, ils n'ont pas de pathogénicité connue pour l'homme et sont présents chez de nombreux mammifères (Maurer et al. 1988).

1.3. Les lentivirus

Ils sont caractérisés par leur importante complexité et variabilité génomique, par leur capacité à établir une infection persistante, à échapper aux moyens de défense du système immunitaire et à présenter une longue période de latence précédant le développement des symptômes cliniques (Haase 1986).

Les lentivirus sont associés à certaines maladies chroniques (pneumonies, arthrites, atteintes neurologiques et maintenant SIDA). Les VIH (virus de l'immunodéficience humaine), agent étiologique du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), appartient à ce groupe. Récemment, des lentivirus ont été mis en évidence chez les chats (FIV), les bovins (BIV) et les singes (SIV). Le SIV présente de nombreuses analogies avec le VIH et est responsable d'une maladie similaire au SIDA humain chez les macaques en captivité. Il ne semble cependant pas être pathogène chez son hôte habituel, le singe vert d'Afrique (Garndner et al. 1989). Les lentivirus humains et simiens connus présente un tropisme préférentiel pour les lymphocytes T CD4 (Haase 1986). Les VIH sont maintenant subdivisés en deux familles, VIH-1 et VIH-2, ce dernier a été isolé à partir de patients vivant en Afrique de l'ouest présentant un SIDA analogue à celui induit par VIH-1.

Tableau 1: les principaux lentivirus

Hôte	Nom	Pathologie associée
Mouton	Visna virus	encéphalite, pneumonie interstitielle
Chèvre	CAEV	encéphalite, arthrite
Cheval	EIAV (Schellekens et al. 1990)	anémie infectieuse
Bovin	BIV (Schellekens et al. 1990)	lymphocytose bovine immunodéficience (?)
Chat	FIV (Schellekens et al. 1990)	immunodéficience
Singe macaque	SIV _{mac} (Daniel et al. 1985)	immunodéficience
Singe vert africain	SIV _{agm}	-
Mangabey	SIV _{smn}	-
Homme	HIV (Barre-Sinoussi et al. 1983)	immunodéficience

2. CYCLE DE REPLICATION VIRAL DU VIH-1

2.1. Structure des particules virales

Le génome viral est constitué de deux molécules d'ARN simple-brin, de même polarité que les ARN messagers, soit (+). Ces ARN, associés de façon non covalente servent de matrice pour la synthèse de l'ADN viral. A ces deux molécules sont associées les enzymes virales (transcriptase inverse, intégrase, endonucléase) à l'intérieur d'une capsidie protéique constituée par les protéines virales (gag). Cette capsidie est elle-même entourée d'une enveloppe formée à partir de la membrane cellulaire de la cellule infectée avec laquelle interagissent les protéines d'enveloppe gp120 et gp41 (Varmus 1988) (Fig. 1).

2.2. Absorption et pénétration

Le VIH présente un tropisme préférentiel pour les cellules exprimant la molécule CD4⁺, récepteur du VIH avec lequel la gp120 présente une forte affinité (Gallo et al. 1984; Klatzmann et al. 1984).

La fixation de la gp120 sur son récepteur entraîne un changement de conformation du complexe gp120 et gp41, permettant la pénétration de la partie N-terminale de la gp41 déstabilisant la double couche lipidique cellulaire et déclenchant ainsi une fusion entre les membranes plasmiques et l'enveloppe du virus (Stein et al. 1987; Haseltine 1991).

L'interaction CD4/gp120 constitue la voie d'infection préférentielle mais d'autres modes de pénétration, CD4 indépendant, existent. La particule virale recouverte d'anticorps (Takeda et al. 1988) ou de protéines du complément pénètre dans la cellule par l'intermédiaire de la fixation de ces molécules sur leurs récepteurs respectifs (Mann et al. 1988; Zucker-Franklin et al. 1989). L'expression de la galactosylcéramide à la surface de certaines cellules, notamment les cellules épithéliales intestinales pourraient être aussi un récepteur potentiel alternatif de la gp120 (Fantini et al. 1993). L'expression membranaire de CD4 est généralement réduite suite à la réplication virale, bien que des exceptions aient été observées avec certaines souches (Levy et al. 1987; Cheng-Mayer et al. 1989).

2.3. Synthèse du provirus et intégration

Après pénétration de la particule virale, l'ARN viral est libéré et ensuite transcrit en ADN double brin à l'aide de la transcriptase inverse présente dans le virion. Cette réaction se passe dans le cytoplasme endéans les 6 heures (probablement plus *in vivo*) (Bukrinsky et al. 1991) suivant l'infection et est génératrice de mutations, l'enzyme ne présentant pas de système de

correction des erreurs (erreur de $1/10^4$ nucléotides) (Parganihan et al. 1988; Kim et al. 1989; Farnet et al. 1990).

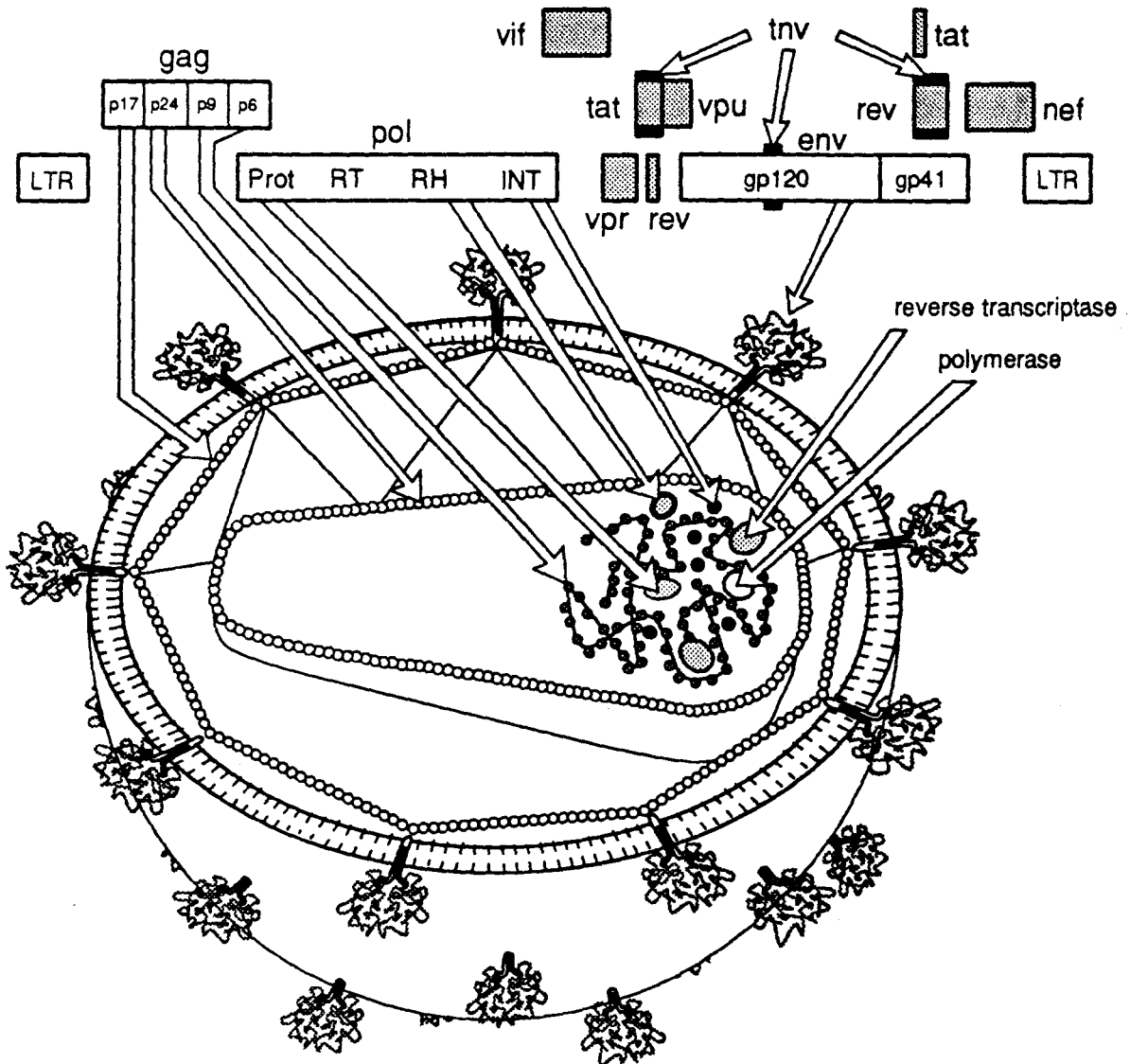


Fig 1: schéma de la particule virale et du génome du VIH-1. Les gènes de régulation sont ombrés. La localisation dans le virion est indiquée par des flèches (Haseltine 1991).

L'intégration de l'ADN viral circulaire dans le génome humain met en jeu l'intégrase, enzyme virale présente également dans le virion (Bushman et al. 1991). Cette intégration nécessite l'activation lymphocytaire. Cependant, contrairement à la plupart des autres rétrovirus étudiés, l'infection par le VIH s'accompagne de l'accumulation d'une quantité importante d'ADN viral non intégré dans la cellule infectée (Stevenson et al. 1990).

2.4. Organisation génomique

2.4.1. Structure du LTR

Le génome du VIH est constitué d'une séquence de 10 kb (Wain-Hobson et al. 1985) dont les deux extrémités sont formées par les séquences LTR (long terminal repeat) qui fournissent non seulement les extrémités permettant l'intégration, mais également des signaux de régulation transcriptionnelle (Fig. 2). La transcription s'effectue à partir d'un promoteur unique, situé dans la région U3 du LTR et doit répondre à deux nécessités:

- l'une est la synthèse d'ARN de longueur complète (génomique) qui sera associé aux protéines internes du virion et incorporé dans les particules virales;
- l'autre est la synthèse d'ARN messagers spécifiques de chaque groupe de protéines virales (de structure et de régulation).

Le LTR du VIH contient plusieurs séquences reconnues par des protéines de régulation cellulaires. Certains de ces facteurs sont présents dans toutes les cellules, tandis que d'autres, ne sont présents que dans certains types cellulaires différenciés. Certains de ces facteurs ne se lient au LTR qu'après une activation cellulaire spécifique (Jones et al. 1986; Nabel et al. 1987; Tong-Starksen et al. 1987; Shaw et al. 1988; Clouse et al. 1989; Folks et al. 1989; Langhoff et al. 1991).

Facteurs de transcription cellulaires et séquences reconnues au niveau du LTR:

TFIID: facteur reconnaissant la séquence TATA indispensable à l'initiation de la transcription (Nabel et al. 1988; Berkhout et al. 1990).

Sp1: facteur de transcription reconnaissant trois sites adjacents entre les nucléotides -77 et -46 du LTR. La mutation de ces séquences entraîne une perte progressive de l'activité du LTR *in vitro* (Jones et al. 1986; Ross et al. 1991).

NF-kB: la famille des facteurs de transcription NF-kB/rel interagit avec une séquence d'ADN de 10 nucléotides (consensus 5'-GGGRNNYYCC-3') au niveau du LTR (-104 et -81). Des séquences kb similaires ont été décrites dans la région régulatrice de nombreux autres gènes exprimés lors de l'activation cellulaire, tel que IL2, IL2-R α , IL6, GM-CSF et TNF- β (Rosen et al. 1985; Nabel et al. 1987; Libermann et al. 1990; Haseltine 1991). La modification ou la mutation de tout ou d'une partie des sites kb et Sp1 entraînent une perte importante dans la capacité du virus à se répliquer *in vitro*.

NF-kB forme un complexe cytoplasmique de trois sous-unités: deux protéines de 48 à 55 kDa (p50) et de 65 à 68 kDa (p65) qui se lient à l'ADN. La troisième sous-unité appelée I κ B interagit spécifiquement avec p65 et est responsable de la localisation du complexe NF-kB inactif dans le cytoplasme; la phosphorylation de I κ B induit une dissociation de I κ B du couple p50-p65 et une translocation nucléaire rapide de NF-kB (Gilmore 1990). Le clonage moléculaire des composants p50 et p65 de NF-kB a montré que l'extrémité N terminale de ces protéines présente une forte homologie de séquence avec le proto-oncogène c-rel (p85) (Kieran et al. 1990) (Fig. 3).

Considérant le nombre de stimuli capables d'induire la translocation de NF-kB, il est très probable qu'il existe plusieurs voies d'activation du complexe protéique en fonction du type cellulaire. Récemment, des études ont montré que certains agents - tels que le peroxyde

d'hydrogène, qui accroît la concentration de radicaux oxygène dans la cellule - peuvent aussi induire la fixation de NF-kB à l'ADN de façon importante. L'augmentation temporaire de la concentration en radicaux libres (formes activées de l'oxygène) résultant d'une gamme de stimuli physiologiques pourrait, éventuellement, représenter le carrefour des diverses voies utilisées par ces différents agents pour relayer l'activation de NF-kB (Schreck et al. 1991).

NRE ("*negative regulatory elements*") : la délétion de la partie 5' du LTR du VIH (-360; -140) se traduit par une augmentation de son activité transcriptionnelle et de la réplication virale. Le groupe de Lu et al., ont mis en évidence deux séquences, NFAT-1 (-253; -213) et USF (-173; -159), qui contribuent à l'effet régulateur négatif (Lu et al. 1989; Lu et al. 1990; Lu et al. 1991):

- Le facteur NFAT-1 est synthétisé *de novo* lors de l'activation lymphocytaire T et reconnaît une séquence consensus au niveau des régions enhancers des promoteurs de l'IL2 et de l'IL2-R α . Une homologie de séquence entre le LTR du VIH-1 et le site de fixation de ce facteur a été mise en évidence .
- Une courte séquence (9 nucléotides sur 11) située dans la région NRE de l'IL2-R α est commune avec la séquence USF. Ces deux séquences sont reconnues par une protéine cellulaire de 50 kDa (Smith et al. 1989).

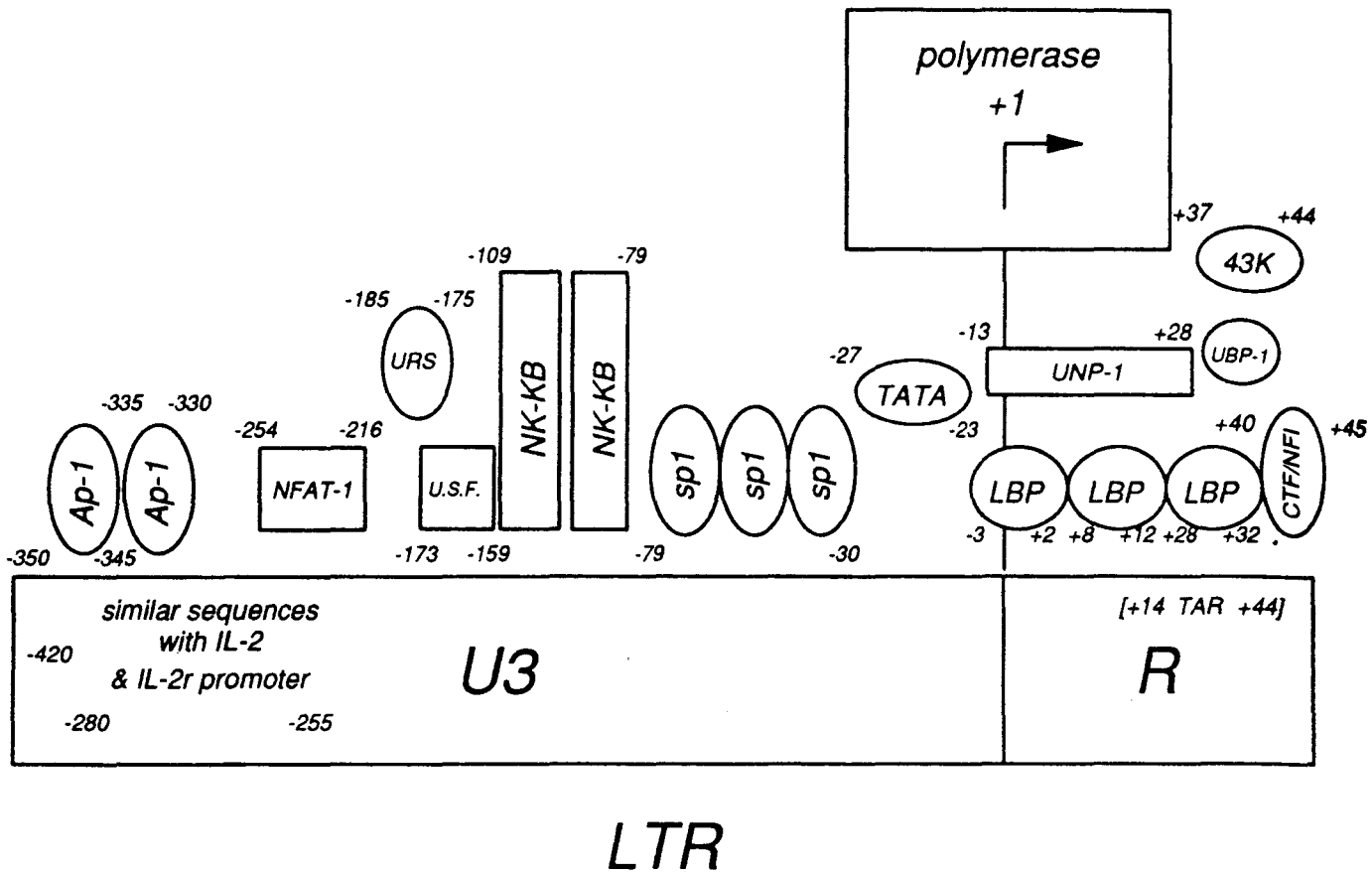


Fig. 2: Représentation du LTR du VIH et des différents sites reconnus par les facteurs de transcription cellulaires (Haseltine 1991).

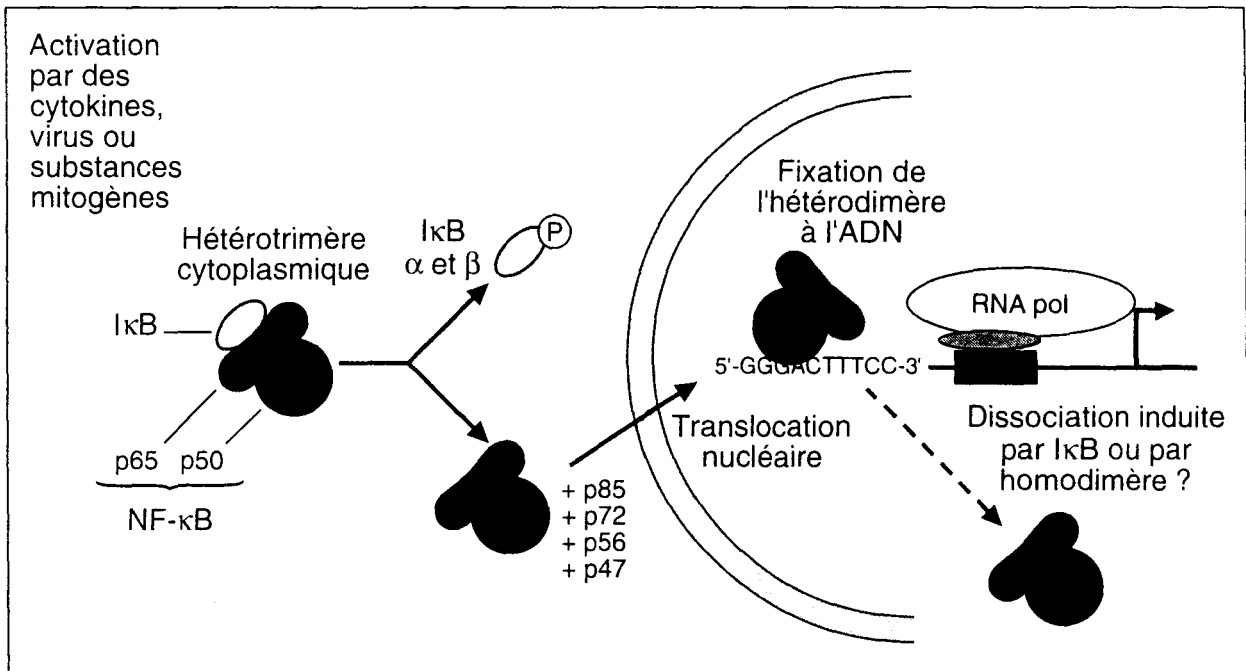


Fig. 3: Schéma illustrant l'induction du facteur de transcription NF-κB. A l'état latent, NF-κB est constitué d'un hétérotrimère cytoplasmique contenant les sous-unités p50 et p65 ainsi qu'un inhibiteur appelé IκB. D'autres sous-unités NF-κB existent cependant: p85 correspond au produit de l'oncogène cellulaire c-rel. p72 serait analogue à p65, et les sous-unités p56 et p47 seraient des dérivés de p50. Des signaux induits par des cytokines, virus ou substances mitogènes activent la phosphorylation de IκB, ce qui provoque sa dissociation du complexe NF-κB et la migration de ce dernier vers le noyau cellulaire. Dans le noyau, l'hétérodimère formé des sous-unités p50 et p65 se fixe à une séquence spécifique d'ADN (Hiscott et al. 1992).

2.4.2. Gènes codés par le génome de HIV-1

Comme tous les rétrovirus, le génome du VIH comporte les trois gènes structuraux gag, pol et env:

- gag: codant pour un précurseur protéique de 55 kDa clivé ultérieurement par la protéase du virus en p6 et p9 (protéines associées à l'ARN viral), en p17 (constituant la matrice protéique de la face interne de l'enveloppe lipidique) et p24 (constituant le "core" protéique interne) (Rabson et al. 1985; Kohl et al. 1988);
- pol: qui code pour la transcriptase inverse/RNase H (p68), la DNA polymérase, la protéase (p10) et l'endonucléase/intégrase (p34) (Rabson et al. 1985);
- env: la glycoprotéine d'enveloppe, gp160 clivée en gp120 et gp41 qui interagissent entre elles par des liaisons non-covalentes (Haseltine 1991).

Outre les gènes de structure, le VIH contient des séquences codantes pour des protéines de régulation Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr, Vpu. Ces molécules feront l'objet d'un chapitre à part.

2.5. Transcription et traduction

Une fois intégré, l'ADN proviral dépend donc pour son expression des mêmes mécanismes de régulation que les gènes cellulaires et des protéines de régulation virales. Il peut donc n'être exprimé que dans certaines phases d'activation et de différenciation cellulaire ou ne pas être transcrit et rester silencieux pendant une période plus ou moins longue. Parmi les facteurs susceptibles d'activer l'expression du virus, on retrouve les activateurs immunologiques $TNF\alpha$, IL-6, GM-CSF, IL-1 α . mais également les antigènes, les anticorps CD3, anti-TcR et les mitogènes. Cette interaction étroite entre la régulation virale et cellulaire est à la base du

caractère pathogénique de l'infection par le VIH. Le promoteur du VIH est un promoteur faible dans la plupart des types cellulaires étudiés et cela pour différentes raisons : il contient des séquences inhibant la transcription (NRE) (Rosen et al. 1985; Siekevitz et al. 1987; Lu et al. 1990), l'extrémité 5' de l'ARN viral présente une structure "dense" en boucle rendant la transcription peu efficace. L'ARN est rarement totalement transcrit dans des cellules T au repos (Laspia et al. 1990; Marciniak et al. 1990). Par contre l'activation cellulaire augmente de façon importante le taux de réplication virale (Haseltine 1991).

2.6. Encapsidation et libération

La formation de la nucléocapside hélicoïdale à partir de deux molécules d'ARN et des protéines basiques *gag* est suivie de la constitution du "core" ou nucléoïde. L'interaction entre le "core" et la membrane plasmique où sont insérées les glycoprotéines d'enveloppe aboutit au bourgeonnement et à la libération des particules virales (Gottlinger et al. 1989; Aldovini et al. 1990; Bryant et al. 1990).

3. PROTEINES DE REGULATION

Les protéines de régulation se subdivisent en deux groupes en fonction de leur localisation cellulaire, du moment où elles agissent dans le cycle viral et de leur mode d'action. Ainsi distingue-t-on:

1. Les protéines de régulation précoces (Tat et Rev). Elles sont:
 - les premières à être traduites,
 - localisées au niveau du noyau et se lient à l'ARN viral,
 - leur rôle sur la réplication virale est bien défini.

2. Les protéines de régulation tardives (Vif, Vpr, Vpu et Nef). Elles sont:
- localisées dans le cytoplasme,
 - Vif, Vpr et Vpu sont traduites après Tat, Rev et Nef,
 - non-essentiels à la réplication virale *in vitro* dans certain type cellulaire,
 - jouent un rôle dans la maturation, le processing et la libération des particules virales.

Tableau 2: gènes de régulation chez les lentivirus de primates

Gène	SIV _{agm}	SIV _{smn} SIV _{mac} HIV-2	SIV _{mnd}	HIV-1 SIV _{cpz}
Vif	+	+	+	+
Vpu	-	-	-	+
Vpr	+	+	+	+
Nef	+	+	+	+
Tat	+	+	+	+
Rev	+	+	+	+

3.1. Tat (Trans-activator gene)

Le gène Tat du VIH comprend 2 exons: le premier est situé dans la région centrale séparant pol et env et code pour l'essentiel de la protéine (72 acides aminés); le deuxième exon fournit les 14 derniers acides aminés et n'est pas indispensable à l'activité biologique connue de la protéine (Cullen 1986; Cullen 1991; Haseltine 1991).

Il s'agit d'une protéine nucléaire trans-activatrice essentielle à la réplication virale comprenant une région hautement conservée avec 7 cystéines et présentant une affinité pour les ions métalliques. Cette région formerait une structure du type "zinc finger" caractéristique des protéines de régulation transcriptionnelles (Frankel et al. 1988). L'extrémité COOH riche en lysines et en asparagines forme un deuxième domaine essentiel, très basique interagissant de

façon spécifique avec les ARN du VIH au niveau d'une séquence nommée TAR ("*trans-activation responsive*") (Hauber et al. 1987). Cette séquence est située au niveau de la région R du LTR du VIH (nucléotides 1 à 59) et présente une structure secondaire en forme de boucle dont l'orientation et la localisation sont essentielles (Hauber et al. 1987; Sheline et al. 1991). Tous les ARN viraux transcrits contiennent la région TAR à leur extrémité 5'.

La trans-activation du LTR par Tat nécessite également la liaison d'une protéine cellulaire de 68-kDa au site adjacent à l'extrémité du site TAR. D'autres protéines cellulaires interviennent également (Garcia et al. 1987). Il a été récemment suggéré que la transactivation par Tat nécessite l'activation de la protéine kinase C. Tat n'étant pas phosphorylée, il est possible que d'autres facteurs présents dans le cytoplasme sous forme inactive interviennent (Jakobovits et al. 1990; Cullen 1991; Haseltine 1991) (Fig. 4).

L'interaction de Tat avec TAR a pour effet d'amplifier la synthèse de tous les ARN viraux y compris ceux codants pour Tat, cet effet passant par une augmentation de la stabilité des mRNA permettant la synthèse de transcrits de longueur complète (Cullen 1986; Wright et al. 1986). Il a également été proposé que Tat agisse en augmentant le niveau transcriptionnel au lieu d'augmenter la stabilité des mRNA contenant TAR (Hauber et al. 1987), comme facteur d'anti-terminaison, c'est-à-dire en levant le blocage constitutif de l'élongation de l'ARN (Kao et al. 1987) ou encore comme facteur post-transcriptionnel (Rosen 1991; Southgate et al. 1991). Son mode d'action précis est encore discuté. Bien que Tat joue un rôle essentiel dans la transcription, il semble que ce ne soit pas son seul rôle. En effet, Tat pourrait également influencer la localisation cytoplasmique et donc la traduction des transcrits contenant la région TAR (Cullen 1991; Haseltine 1991).

D'autres activités biologiques ont été imputées à Tat. Lors de l'infection des lymphocytes T, elle est libérée dans le milieu de culture et pénètre dans les cellules voisines. Tat active le LTR du VIH (Frankel et al. 1988) et stimule la croissance des cellules "fuseau" dérivées des lésions

du sarcome de Kaposi (Ensoli et al. 1993). Viscidi *et al.*, ont également montré que la protéine Tat recombinante inhibe la prolifération antigénique des lymphocytes T (Viscidi et al. 1989).

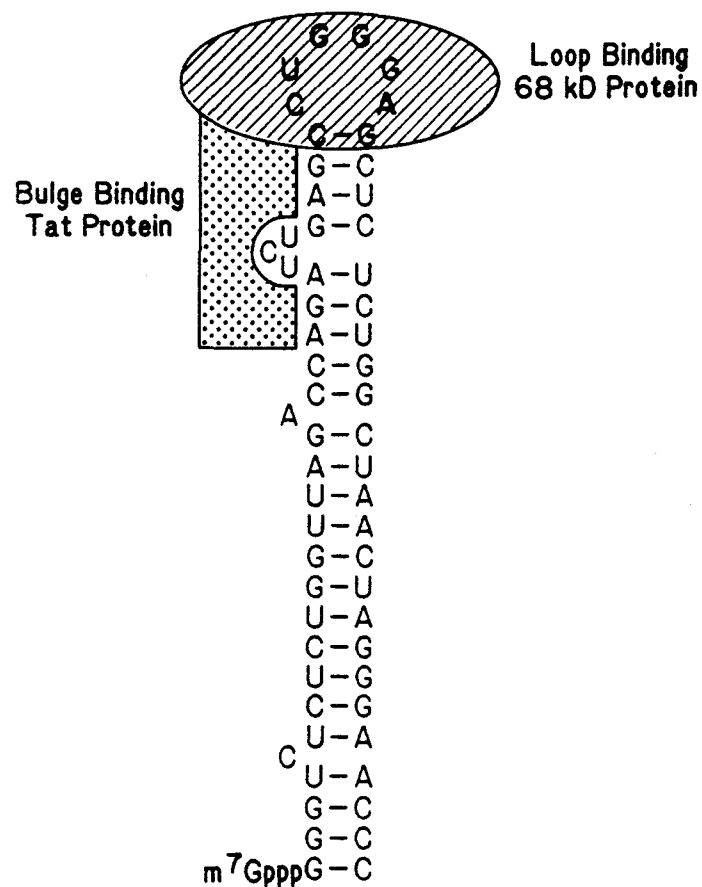


Fig 4: La séquence et la structure de la région TAR de 59 nucléotides sont montrés de même que les sites de fixation putatifs de Tat et de p68 (Cullen 1991).

3.2. Rev (regulator of virion expression)

Tandis que la protéine Tat favorise la synthèse de tous les transcrits (2, 4 et 9 kb), la protéine Rev assure une régulation plus sélective en permettant la traduction des longs transcrits de 4 et 9 kb. Rev est donc un régulateur négatif de sa propre synthèse, de Tat et de Nef (Felber et al. 1989; Malim et al. 1989).

Le gène Rev est constitué de 2 exons codant pour une protéine de 116 acides aminés. Il s'agit d'une protéine nucléaire, phosphorylée *in vivo* au niveau de 2 sérines. Néanmoins, cette phosphorylation n'est pas indispensable à son activité biologique connue (Felber et al. 1989; Malim et al. 1989; Cullen 1991; Haseltine 1991).

Deux domaines essentiels ont été identifiés. L'extrémité aminoterminal (40 premiers acides aminés) est une région riche en arginines, indispensable à la localisation nucléaire de Rev et interagissant spécifiquement avec l'ARN au niveau du site RRE ("*Rev responsive element*") situé dans la région codant pour la gp120. De part et d'autre de ce domaine, se situent des séquences facilitant la multimérisation de Rev essentielle à sa fonction *in vivo*. Le second domaine ("*activation domain*"), riche en leucines, n'intervient pas dans la liaison au site RRE ni dans la multimérisation de Rev. Il est probable que cette séquence interagisse avec un des composants du transport des ARN ou du système d'épissage (Malim et al. 1989; Olsen et al. 1990; Cullen 1991; Haseltine 1991; Malim et al. 1991) (Fig. 5).

En l'absence de Rev, seul les ARNm multiépissés de petite taille codant pour les protéines Tat, Rev et Nef sont traduits. Suite à sa synthèse, la protéine Rev s'accumule dans le noyau où elle se lie au niveau du site RRE de l'ARN (Pomerantz et al. 1990). Cette liaison est fonction de la séquence primaire et secondaire de l'ARN et permet le transport de transcrits non épissés (9 kb) ou épissés une fois (4 kb) vers le cytoplasme, réalisé lorsqu'une concentration critique de Rev est atteinte. Différentes protéines cellulaires se lient également à cette région (Fig. 6).

Bien que Rev soit indispensable à l'accumulation dans le cytoplasme de longs transcrits, elle ne modifie pas le profil des ARN transcrits au niveau du noyau, un nombre important d'ARN non épissés sont détectés dans le cytoplasme même en absence de Rev (Felber et al. 1989; Malim et al. 1989). Il est possible que les gènes gag, pol et env contiennent de multiples séquences cis répressives qui retiennent les ARN dans le noyau en absence de REV (Rosen et al. 1988). Une autre hypothèse possible serait que les sites d'épissage des ARN non entièrement épissés jouent le rôle de signal de rétention cellulaire (Chang et al. 1989; Malim et al. 1989). Rev agirait en activant le transport de ces ARN vers le cytoplasme soit en s'opposant à l'action des facteurs d'épissage soit en facilitant l'interaction avec un constituant de la voie de transport des ARN (Cullen 1991; Haseltine 1991). Constantoulakis et al., ont mis en évidence une famille de gènes interféron-inductibles codant pour des RNA binding protéines. En se fixant au niveau du site RRE, elles moduleraient l'action de Rev (Constantoulakis et al. 1993).

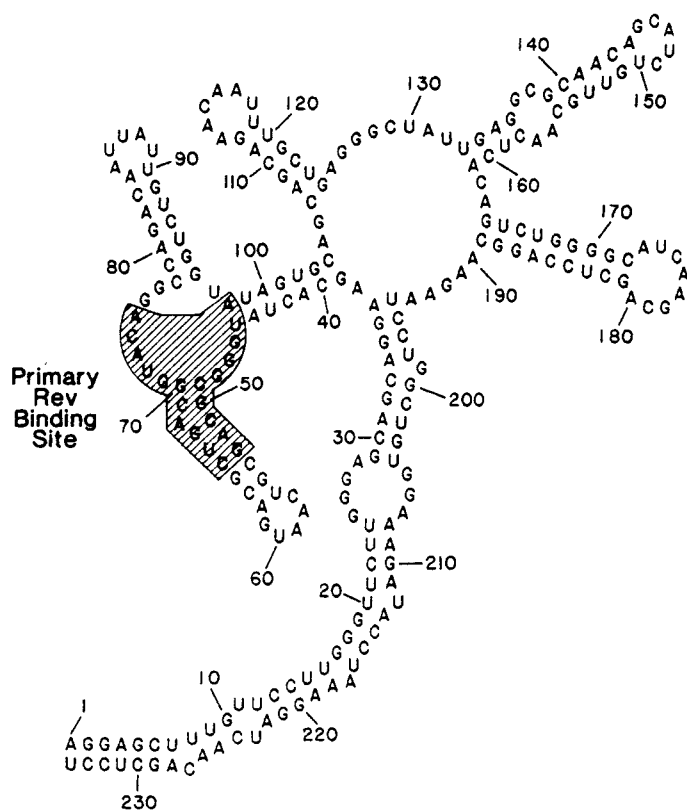


Fig. 5: Représentation schématique de l'interaction RRE/Rev (Cullen 1991)

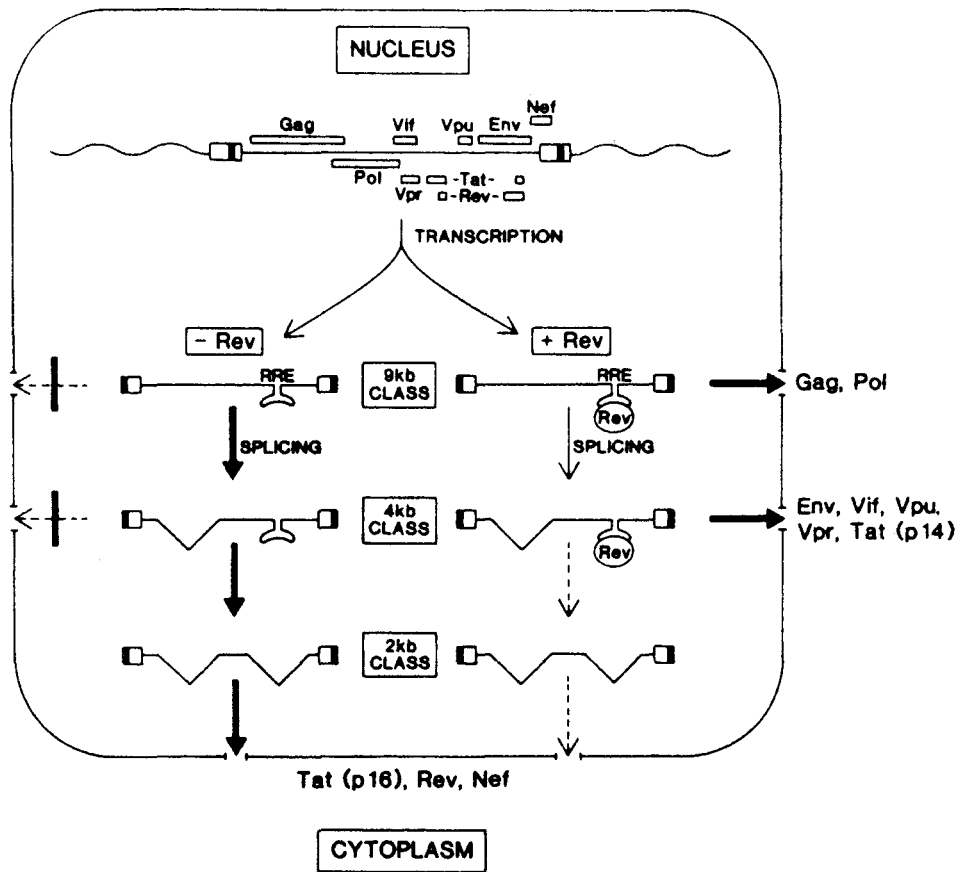


Fig. 6: Représentation schématique de l'expression des ARNm viraux en présence et absence de Rev (Cullen 1991).

3.3. Vif (virus infectivity factor)

Le gène vif est situé entre les gènes pol et env du génome du VIH, code pour une protéine de 24 kDa et est conservé parmi les lentivirus HIV-2, SIV et FIV. L'expression de Vif et Vpr est coordonnée par Rev. Vif joue un rôle essentiel dans la maturation des protéines d'enveloppe. En l'absence de Vif, l'incorporation de gp120 dans les particules virales est plus faible et les particules libérées sont peu infectieuses. Une diminution de l'infection de cellule à cellule est également observée (Luciw et al. 1987; Sakai et al. 1993).

Guy *et al.*, ont mis en évidence une activité cystéine protéase de Vif. En clivant l'extrémité carboxylique de la gp41, la maturation et la conformation de la gp120 sont modifiées avec pour conséquence une infectivité plus faible des particules virales défectives en Vif (Vif⁻) (Guy et al. 1991).

Selon Gabuzda et al., le rôle de Vif sur la réplication virale est fonction du type cellulaire étudié. En effet, Vif est indispensable à la réplication virale dans les lignées CD4⁺ T CEM et H9 ainsi que dans des PBL. Par contre, dans les lignées SupT1, C8166 et Jurkat, la présence de Vif n'est pas requise. La capacité du virus Vif⁻ à infecter les cellules est fonction de la lignée cellulaire dans laquelle le virus a été produit. Ces résultats suggèrent que la présence de Vif compense l'absence de certains facteurs cellulaires indispensables à la production de particules infectieuses.

La synthèse de l'ADN proviral ne s'effectuerait pas correctement lorsque le clone Vif⁻ est internalisé dans la cellule-cible (von Schwedler et al. 1993). L'effet de Vif n'est pas modifié par la délétion de l'extrémité carboxylique de la gp41, "cible" de Vif proposée par Guy *et al.*, (Gabuzda et al. 1992).

Tableau 3: Vif

◆ protéine conservée chez tous les lentivirus (Chakrabarti et al. 1987; Garvey et al. 1990).
◆ exprimée tardivement (Garrett et al. 1991; Schwartz et al. 1991).
◆ associée au Golgi et aux vésicules (Schwartz et al. 1992).
◆ influence le caractère infectieux des particules virales (Luciw et al. 1987; Strebel et al. 1987; Sakai et al. 1993).
◆ rôle sur la réplication virale fonction du type cellulaire (Gabuzda et al. 1992).
◆ interfère avec la synthèse de l'ADN proviral lors de l'internalisation des clones Vif dans la cellules-cible (von Schwedler et al. 1993).
◆ serait une cystéine protéase et agirait au niveau de l'extrémité carboxylique de la gp4 (Guy et al. 1991).

3.4. Vpu (viral protein U)

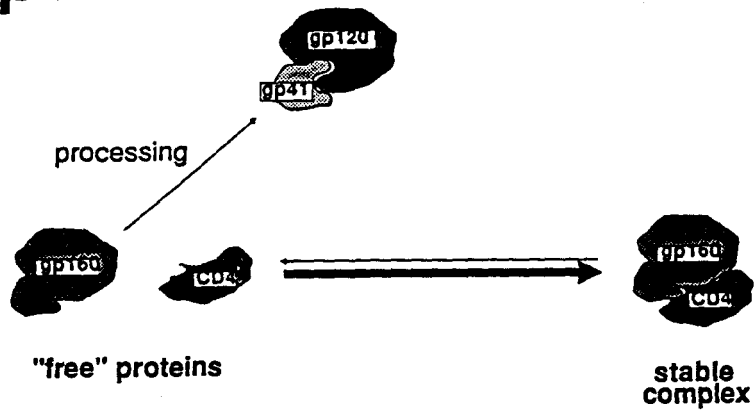
Vpu est une protéine phosphorylée de 16-kDa, non présente dans le virion et traduite à partir de l'ARNm bicistronique codant également pour la gp120 (Schwartz et al. 1990; Schwartz et al. 1992). En l'absence de Vpu, l'interaction gp160-CD4 se traduit par une dégradation de ce complexe et donc par une absence de maturation de la gp160, une expression de CD4 membranaire plus faible ainsi que par un nombre inférieur de particules virales libérées par la cellule (Strebel et al. 1988). Vpu diminue la formation de syncytia par les cellules T CD4⁺ infectées (Terwilliger et al. 1989; Klimkait et al. 1990).

D'après Willey et al., Vpu agirait au niveau de l'appareil de Golgi en activant la maturation de la gp160 et en favorisant la formation du complexe gp120-gp41 au détriment du complexe gp160-CD4 (Fig. 7). L'effet de Vpu serait dépendant des concentrations relatives de gp160, CD4 et Vpu. Vpu peut également agir en *trans* mais avec une efficacité réduite (Willey et al. 1992).

Ce même groupe a également montré que Vpu induit une rapide dégradation de la molécule CD4⁺ dans le réticulum endoplasmique (RE), la demi-vie de CD4⁺ passant de 6 heures à 12

minutes. La gp160 retiendrait CD4 dans le RE avec pour conséquence la dégradation rapide de celui-ci. Il reste à déterminer si l'effet de Vpu dans la formation de particules virales et la dégradation de CD4 sont deux rôles indépendants ou non (Willey et al. 1992).

- Vpu



+ Vpu

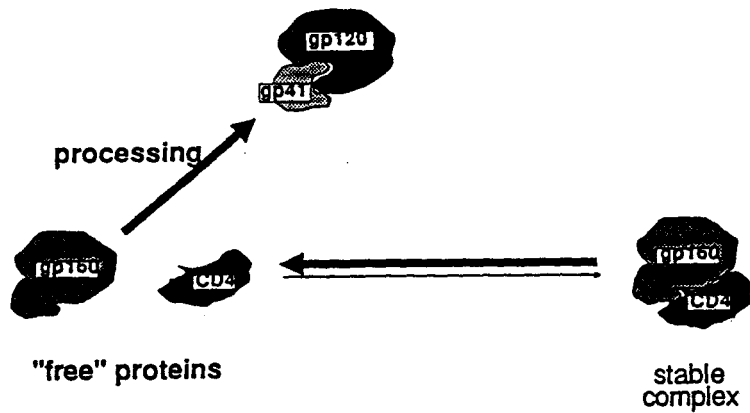


Fig. 7: Expressions coordonnées de Vpu et gp160 (Willey et al. 1992)

Tableau 4: *Vpu*

◆ présente chez HIV-1/SIV uniquement (Hirsch et al. 1987)
◆ localisation dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique, et faiblement dans le cytoplasme, co-localisation avec la gp120 (Yao et al. 1993)
◆ exprimée tardivement (Schwartz et al. 1990; Schwartz et al. 1992)
◆ augmente l'exportation de particules virales (Strebel et al. 1988)
◆ joue un rôle au niveau de la formation des complexes gp120-gp41 et gp160-CD4 (Willey et al. 1992)
◆ induit une dégradation rapide de CD4 (Willey et al. 1992)
◆ non détectée dans la particule virale (Terwilliger et al. 1989; Klimkait et al. 1990)
◆ phosphorylée et non glycosylée (Schwartz et al. 1990; Schwartz et al. 1992)

3.5. Vpr (viral protein R)

Cette protéine de 15kD est conservée chez les lentivirus. Il s'agit de la seule protéine de régulation présente dans les particules virales (100 copies / virus) (Cohen et al. 1990; Yuan et al. 1990). Vpr active également en trans un nombre élevé de promoteurs viraux (dont HIV) et cellulaires (Cohen et al. 1990). L'ensemble de ces observations permettent de penser que Vpr joue un rôle durant la phase précédant la synthèse des protéines virales, peut-être en accélérant la transcription initiale et/ou en interagissant avec l'environnement cellulaire.

L'expression du VIH dans des cellules tumorales musculaires humaines (rhabdosarcome) est caractérisée par l'inhibition de la prolifération et l'activation de la différenciation cellulaire. L'expression du seul gène Vpr reproduit ces observations (Levy et al. 1993).

Tableau 5: *Vpr*

◆ non essentielle à l'assemblage des particules (Cohen et al. 1990)
◆ associée au virion (environ 100 copies/virus) (Cohen et al. 1990)
◆ serait importante pour la réplication dans les monocytes/macrophages (Hattori et al. 1990)
◆ faible transactivateur de LTR (Cohen et al. 1990; Cohen et al. 1990; Levy et al. 1993)

3.6. Nef (Negative factor)

3.6.1. Caractéristiques structurales et biochimiques

Le gène Nef correspond à un cadre de lecture localisé à l'extrémité 3' du génome, en aval du gène env. La protéine est traduite en même temps que Tat et Rev à partir des petits ARNm multiépissés de 2kb (Robert-Guroff et al. 1990; Schwartz et al. 1992). Nef est conservée chez HIV-1, HIV-2 et SIV, suggérant son importance fonctionnelle (Unger et al. 1992).

Il s'agit d'une protéine cytoplasmique de 27 kDa, myristylée à son extrémité 5' (Guy et al. 1987) et non glycosylée, bien qu'il existe deux sites potentiels de N-glycosylation (Guy et al. 1990). Parallèlement, certaines propriétés biochimiques comparables à celles des protéines G ont été définies : capacité de fixation du guanosine 5'-triphosphate (GTP) associée à une activité GTPase, autophosphorylation et phosphorylation potentielle (thréonine en position 15) par la protéine kinase C, ainsi qu'une homologie des séquences de phosphorylation avec celles des proto-oncogènes src et ras (Guy et al. 1987; Samuel et al. 1987; Guy et al. 1990).

Ces études ont été réalisées à l'aide de protéine recombinante purifiée à partir d'extraits de *E.coli*. Les activités GTP binding et GTPase de Nef ont été remises en question par Kaminchik *et al.* qui n'ont pu reproduire ces résultats (Kaminchik et al. 1990). Il est plus que probable que ces deux activités décrites soient associées à la présence de protéines bactériennes contaminant la préparation de Nef produite par génie génétique. Ces résultats ont été confirmés par d'autres groupes (Harris *et al.* (Harris et al. 1992), Nebreda *et al.* (Nebreda et al. 1991; Nebreda et al. 1992) et Wolber et al. (Wolber et al. 1992)).

Après immunoprécipitation et migration sur gel d'acrylamide en conditions non réductrices, deux bandes de 27 et 24 kDa sont visibles. Ces deux bandes correspondent à différents appariements entre les 3 cystéines (cystéines 55-206 ou 55-142 pour la souche LAI et

cystéines 55-143 ou 55-170 ou 143-170 pour la souche ELI) donnant probablement lieu à des structures conformationnelles différentes (Zazopoulos et al. 1992).

3.6.2. Réponse immunitaire anti-Nef

Différentes techniques immunologiques ont mis en évidence des anticorps anti-Nef chez un nombre important de patients séropositifs. Par ailleurs, il semble n'exister aucune corrélation entre la présence d'anticorps et le stade clinique des sujets infectés. Généralement, le diagnostic de l'infection repose sur la détection sérologique des anticorps dirigés contre les protéines structurales (gag, pol, env), marqueurs de séroconversion.

Diverses études basées sur l'isolement du VIH par culture cellulaire ou sur la détection de l'ADN proviral des lymphocytes par la technique d'amplification génique (polymerase chain reaction) ont permis d'identifier la présence du VIH chez des patients séronégatifs. La période entre l'infection virale et la séroconversion est de durée très variable. Les travaux de Ameisen et al. (Ameisen et al. 1989; Ameisen et al. 1989) et Gombert et al. (Gombert et al. 1990), suggèrent l'apparition précoce des anticorps anti-Nef avant la phase de séroconversion des sujets infectés. Ces résultats sont en désaccord avec les travaux de Reiss et al. (Reiss et al. 1989), Gluckman et al. (Gluckman et al. 1989) et Bahroui et al. (Bahraoui et al. 1990) pour lesquels les anticorps anti-Nef sont détectés simultanément aux anticorps dirigés contre les protéines structurales, infirmant la validité des anticorps anti-Nef comme marqueur sérologique précoce de l'infection virale. Selon Ranki et al., il semble que la détection des anticorps anti-Nef ne soit pas systématiquement associée à une infection par VIH et pourrait résulter de l'existence d'une réaction croisée avec une protéine non identifiée d'origine cellulaire ou virale (Ranki et al. 1990).

Les études de l'antigénicité de la protéine Nef du VIH-1 à l'aide de peptides synthétiques ont montré l'immunodominance des extrémités N- et C-terminales et permis de localiser différents

déterminants B dont six sont non continus. Trois des épitopes étaient clairement linéaires. De façon intéressante, cinq de ces épitopes B reconnus par des séra humains sont également des épitopes T (Tahtinen et al. 1992).

Deux principaux déterminants antigéniques T ont été mis en évidence au niveau des régions 45-69 et 176-206. Ces deux derniers peptides induisent une prolifération lymphocytaire T CD4 *in vitro* à partir de cellules de chimpanzés, rats et souris immunisés avec la protéine Nef recombinante et sont reconnus par les anticorps spécifiques produits en réponse à Nef. Ces deux peptides sont également immunogéniques chez le rat et la souris et induisent une réponse cellulaire et humorale vis-à-vis des peptides mais également vis-à-vis de la protéine recombinante (Estaquier et al. 1992).

Selon différents algorithmes de prédiction d'épitopes B et T (mobilité, accessibilité, hydrophobicité), les régions 45-69 et 176-206 correspondent à des épitopes B et forment une structure secondaire de type α -hélices (Estaquier et al. 1992).

Une réponse T cytotoxique dirigée contre les protéines virales gag et Nef est fréquemment détectée durant la phase asymptomatique clinique. Les cellules T cytotoxiques (CTL) sont détectées dans le sang ainsi que dans le fluide alvéolaire (Chenciner et al. 1989; Autran et al. 1991). Une réponse CTL spécifique est obtenue chez les souris immunisées avec des virus de la vaccine recombinants gag et Nef (Chenciner et al. 1989). Les épitopes reconnus par les cellules T cytotoxiques sont localisés au niveau de la région centrale de Nef correspondant aux séquences 73-94, 113-128 et 132-147 et dans la région carboxyterminale de la protéine. Différentes épitopes dans la même région centrale de Nef sont reconnus par les CTL d'un même individu infecté. Le peptide 113-128 peut être présenté en association avec plusieurs molécules HLA de classe I différentes. Il est intéressant de remarquer que cette région est relativement bien conservée entre les différents isolats (Culmann et al. 1989; Culmann et al. 1991).

3.6.3. Rôle de Nef dans la pathologie de l'infection

1° Importance de Nef *in vivo*

La conservation de ce gène parmi les lentivirus suggère que son expression joue un rôle important dans la pathologie de l'infection. A cet égard, les expériences réalisées par Kestler *et al.*, sont d'un intérêt fondamental. Les similitudes existant entre SIV et VIH quant à l'organisation génomique et la pathologie induite permettent d'utiliser le SIV comme modèle d'étude (Letvin *et al.* 1985; Kestler *et al.* 1990; Cullen *et al.* 1992). La délétion de la séquence codant pour Nef ne modifie pas la capacité du virus SIV à se répliquer *in vitro*, mais modifie drastiquement le caractère infectieux de la souche *in vivo* (charge virale très faible, virus non pathogène). La réplication d'un clone contenant un codon stop au début de la phase de lecture du gène Nef (clone SIV MAC 239), est également identique *in vitro* à la souche non mutée. Néanmoins, *in vivo*, l'évolution de l'infection est différente. En effet, une réversion du codon stop (permettant la synthèse de Nef) devient rapidement dominant chez les singes rhésus qui présentent alors une virémie et une pathologie classiques. Ces expériences soulignent le caractère essentiel de Nef dans le maintien d'une charge virale importante et le caractère pathogène du virus (Kestler *et al.* 1991).

De plus, des singes inoculés avec le clone SIV Nef⁻ sont protégés lors d'une infection ultérieure par l'isolat pathogène correspondant SIV Nef⁺. Une stratégie vaccinale se basant sur l'utilisation de souches virales atténuées pourrait se révéler efficace (Muthiah *et al.* 1993).

2° Rôle de Nef sur la réplication virale

La protéine était initialement présumée exercer une inhibition de la transcription de l'ensemble des gènes viraux, participant ainsi à l'établissement et à la maintenance de la phase de latence

du VIH au sein des cellules infectées. En effet, le virus délété de la région 3' codant pour Nef se réplique plus rapidement en culture qu'un virus sauvage. L'expression en *cis* de Nef inhibant quant à elle, la réplication de cette même souche virale (Luciw et al. 1987; Ahmad et al. 1988; Maitra et al. 1991). D'autre part, l'expression du gène rapporteur CAT ("*chloramphenicol acetyltransferase*") sous le contrôle du LTR de HIV-1 est inhibée lorsque des lymphocytes ou des monocytes/macrophages expriment également la protéine Nef (Ahmad et al. 1988; Niederman et al. 1989).

Le rôle apparent de régulateur négatif a été controversé par plusieurs travaux. Des résultats contradictoires, montrant l'absence ou même, un effet légèrement positif de Nef sur la réplication virale (Hammes et al. 1989; Kim et al. 1989; de Ronde et al. 1992) ont été obtenus par d'autres groupes. Kim et al., ont montré que le niveau d'expression viral est identique en comparant 2 souches isogéniques Nef⁺ et Nef⁻ (ATG de départ supprimé par mutagenèse dirigée) (Kim et al. 1989).

Différentes explications ont été avancées pour expliquer ces divergences:

- Des différences au sein des lignées cellulaires mais également de variants du VIH pourraient être à l'origine de ces résultats discordants. En utilisant le provirus HXB2 dans lequel l'extrémité 3' est remplacée par les séquences correspondantes contenant la région codant pour Nef soit des souches IIB ou ELI du VIH, Terwilliger *et al.*, ont mis en évidence l'effet négatif (IIB) ou légèrement positif (ELI) de Nef sur la réplication virale (Terwilliger et al. 1991; Zazopoulos et al. 1992). Différents variants Nef isolés par PCR directement à partir de patients infectés montrent un effet positif sur la réplication virale (Zazopoulos et al. 1993).
- L'absence d'effet inhibiteur pourrait également être corrélée avec la progression de la maladie : des variants HIV-1, se répliquant plus rapidement et hautement cythopathogènes

isolés chez des patients en phase terminale de la maladie ne seraient plus sensibles à l'éventuel effet régulateur négatif de Nef (Cheng et al. 1989).

- La structure tridimensionnelle influence directement l'activité biologique de la protéine et des modifications de celle-ci (modifications dans l'appariement des cystéines) pourraient également expliquer les résultats contradictoires obtenus dans l'étude du rôle de Nef sur la réplication virale (Zazopoulos et al. 1993).

A la vue des résultats contradictoires obtenus, Nef pourrait agir de façon indirecte sur la réplication virale, en modifiant par exemple différents paramètres d'activation cellulaire.

3° Rôle de Nef sur l'expression de l'IL2

Plutôt que de se concentrer sur le rôle de Nef sur la réplication virale, Luria *et al.* ont étudié l'effet de la protéine sur les fonctions lymphocytaires. En utilisant la lignée lymphocytaire Jurkat, ils ont montré que l'expression de la protéine Nef-1 (alanine en position 15 au lieu de thréonine) avait pour conséquence d'inhiber la production de mRNA codant pour l'IL2 en réponse au PMA+PHA, PMA+anti-CD3 ou PMA+anti-TcR. De plus, une inhibition de l'expression du gène rapporteur chloramphenicol acetyltransférase (CAT) est observée lorsque ces cellules sont transfectées transitoirement par un vecteur d'expression du gène CAT sous le contrôle du promoteur de l'IL2. Par contre la protéine Nef-2 (thréonine en position 15) n'induit pas d'inhibition de l'expression de l'IL2.

Ces résultats suggèrent que Nef interfère avec les signaux cellulaires induits suite à l'activation du récepteur TcR induisant l'expression de l'IL2. Une expression normal du récepteur pour l'IL2 (IL2R α), en réponse aux mêmes stimuli, est observée dans tous les cas (Nef-1 et Nef-2). Les lymphocytes infectés pourraient continuer à proliférer en réponse à l'antigène tant que de l'IL2 est fournie par des cellules voisines saines (Luria et al. 1991).

4° Rôle de Nef sur l'expression de CD4

Récemment, Skowronski *et al.* ont montré que des souris transgéniques exprimant la protéine Nef (allèle NL43) sous le contrôle du promoteur CD3 présentent une perturbation importante dans la maturation et l'activation des lymphocytes T CD4⁺ au niveau du thymus avec pour corollaire, une diminution des lymphocytes T CD4⁺ circulants. L'expression de Nef est uniquement détectée dans le thymus et non dans les organes périphériques. Une prolifération plus importante des cellules thymiques de souris transgéniques Nef⁺ est également observée en réponse au PMA et aux anticorps CD3. Parallèlement, l'expression de CD4 est plus faible à la surface de cellules de la lignée T CEM après transfection stable d'un plasmide d'expression correspondant (Skowronski *et al.* 1993). L'effet négatif de Nef requière le domaine cytoplasmique de CD4 (conservé chez l'homme, la souris et le chimpanzé), a lieu au niveau post-transcriptionnelle et ne passe pas par la phosphorylation sérine dépendante de CD4 (Garcia *et al.* 1991; Garcia *et al.* 1993).

Un effet de Nef similaire (régulation négative de CD4) a également été mis en évidence chez des singes infectés par SIV en utilisant le même clone proviral mac239 que Kestler *et al.* (Benson *et al.* 1993).

Selon Schwartz *et al.*, Nef induit un niveau plus faible de gp120 à la surface des lymphocytes T. Nef ne modifie pas la maturation de la gp160 en gp41 et gp120. Par contre, l'expression membranaire d'un mutant gp120 ne se liant pas au CD4 n'est pas modulée par Nef, suggérant que ce phénomène est CD4 dépendant. L'accumulation intracellulaire de gp120 pourrait retarder l'effet cytopathogène de gp120 à la surface de la cellule et donner un avantage sélectif durant l'infection (Schwartz *et al.* 1993).

3.6.4. Tableau résumé

<i>Tableau 6: <u>Nef</u></i>	
◆ présente chez tous les lentivirus (Unger et al. 1992).	
◆ exprimée tôt lors de l'infection (Robert-Guroff et al. 1990; Schwartz et al. 1992).	
◆ myristillée (Guy et al. 1987).	
◆ phosphorylée (Guy et al. 1987).	
◆ activité GTP binding (Guy et al. 1987).	controversé
◆ activité GTPase (Guy et al. 1987).	controversé
◆ diminue l'expression membranaire de CD4 (Garcia et al. 1991; Garcia et al. 1993; Skowronski et al. 1993).	
◆ régulateur négatif de la réplication virale (Luciw et al. 1987; Ahmad et al. 1988; Niederman et al. 1989; Maitra et al. 1991).	controversé
◆ non essentielle à la réplication virale <i>in vitro</i> mais essentielle à la pathologie <i>in vivo</i> (Kestler et al. 1991).	
◆ des singes inoculés avec le clone SIV Nef ⁻ sont protégés lors d'une infection ultérieure par l'isolat pathogène correspondant SIV Nef ⁺ (Muthiah et al. 1993).	

4. CARACTERISTIQUES DE L'INFECTION PAR LE VIH

L'infection par le VIH peut être subdivisée en trois phases (Fig. 8):

- une phase aiguë qui dure en moyenne six semaines caractérisée par une réplication virale intense et la mise en place de la réponse immune;

- une période de séropositivité s'étalant sur plusieurs années sans anomalies cliniques. Aux premiers stades, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants est normal alors que le pourcentage de cellules infectées circulantes est faible, celui-ci augmente avec l'évolution de l'infection, de même que la virémie (Weiss 1993). Par contre, dès le début de l'infection, un nombre élevé de lymphocytes T CD4⁺ et de macrophages infectés sont présents dans les organes lymphoïdes (Embretson et al. 1993). Des particules virales sont également détectées à la surface des cellules folliculaires dendritiques (CFD). Les CFD jouent un rôle essentiel au cours de la réponse immune allant de la présentation antigénique à la maintenance des cellules mémoires B et T. La destruction progressive du réseau folliculaire et l'incapacité de ces cellules à piéger les particules virales aboutiraient à l'immunodépression observée. Il n'y a donc pas une phase de latence proprement dite, mais plutôt une évolution lente avec une détérioration progressive du réseau folliculaire (Pantaleo et al. 1993) (Fig. 10). La réplication virale serait induite dans ces cellules suite à l'activation des cytokines produites par les lymphocytes B dans les centres germinatifs des ganglions. Les lymphocytes sains seraient infectés lors de leur migration dans les centres germinatifs des ganglions (Pantaleo et al. 1993). Des particules virales sont également détectées dans le sang par RT PCR dans le sang et leur nombre augmente avec l'évolution de l'infection (Piatak et al. 1993).

- une période de longueur variable au cours de laquelle un effondrement du système immunitaire se manifeste avec pour corollaire, l'ensemble des pathologies bien connues (manifestations neurologiques, pneumonies à *P. carinii*, toxoplasmose, sarcome de Kaposi, lymphomes non hodgkiniens, infections à mycobactéries atypiques...). Au cours de cette période, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ circulants chute tandis que le taux d'anticorps p24 et la virémie augmentent (Fauci 1988).

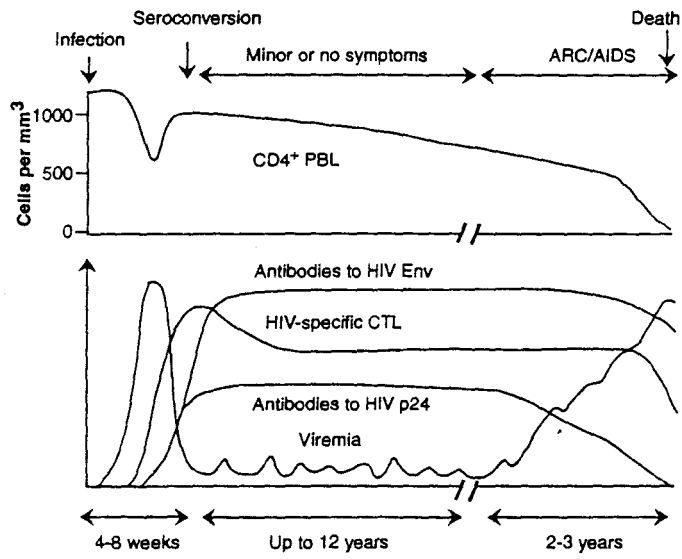


Fig. 8: Evolution de l'infection (Weiss 1993).

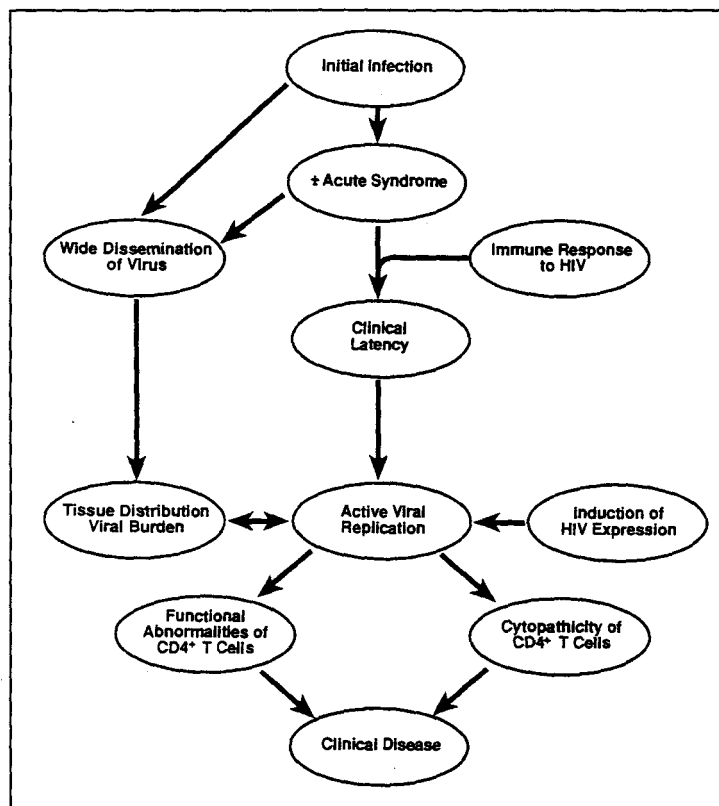


Fig. 9: Les différents stades de l'infection virale (Fauci 1992).

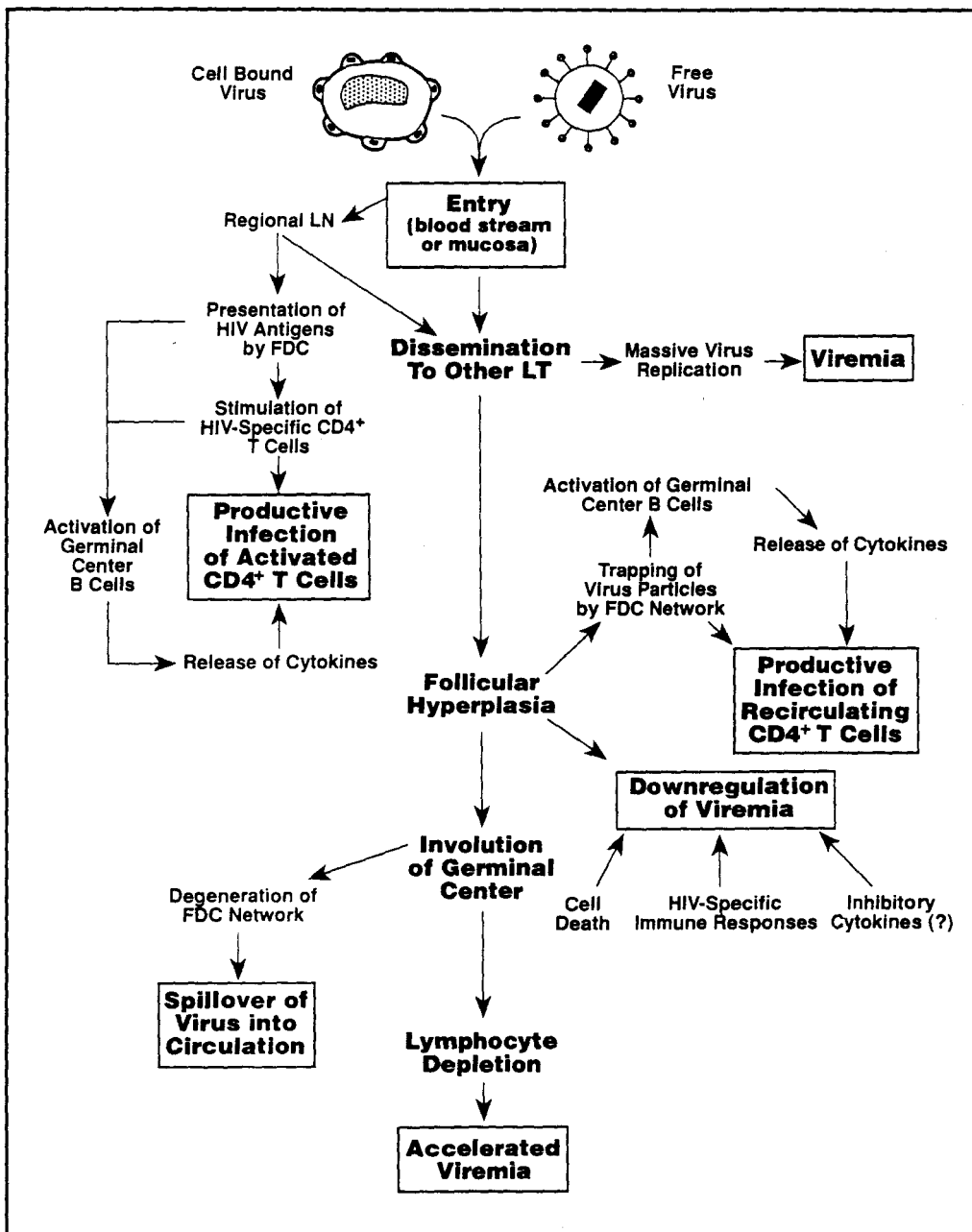


Fig. 10: Evolution de l'infection par le VIH selon Fauci et al., (Fauci 1992).

5. LES MECANISMES IMMUNOPATHOLOGIQUES DE L'INFECTION PAR LE VIH

5.1. Les effets cytopathogènes du VIH

La base de l'immunopathologie de l'infection par le VIH est la déplétion de la sous-population des cellules T CD4⁺ "helper" qui conduit à une immunodéficience profonde (Hemler et al. 1990). Bien qu'un grand nombre de dysfonctions du système immunitaire aient été décrites dans le SIDA, la plupart peuvent être expliquées par une atteinte de cette sous-population cellulaire.

De nombreuses explications ont été apportées pour expliquer l'effet cytopathogène du VIH:

- rôle direct du virus: accumulation d'ADN, perte de l'intégrité de la membrane plasmique au cours du bourgeonnement viral, formation de syncytia (Fauci 1988)... Seules les cellules T sont tuées suite à une réplication virale intense. Il semble de plus en plus évident que la présence d'une grande quantité de molécules CD4 à la surface de la cellule joue un rôle dans les effets cytopathogènes du VIH. En effet, les monocytes et les macrophages qui expriment moins de CD4 ne subissent pas cet effet cytopathogène et constituent un réservoir de virus (Talle et al. 1983).

- rôles indirects du virus: infections de cellules souches hématopoïétiques et de précurseurs thymiques (Fauci 1988; Schnittman et al. 1990), cytotoxicité dirigée contre les cellules CD4 non infectées ayant fixées en surface de la gp120 (Lyerly et al. 1987; Siliciano et al. 1988) et élimination par le système immunitaire (ADCC, CTL) (Lanzavecchia et al. 1988; Weinhold et al. 1988; Zarling et al. 1990).

5.2. Dysfonctionnement des cellules T CD4+

Même si la déplétion des cellules T CD4⁺ est le phénomène le plus patent dans la pathologie de l'infection, on constate également chez le patient infecté une atteinte fonctionnelle précoce de cette sous-population T CD4⁺ avant la réduction progressive du nombre de ces lymphocytes. Cette atteinte fonctionnelle est caractérisée par une perte sélective de la capacité des lymphocytes T CD4⁺ à proliférer en réponse au PWM, aux antigènes mémoires ou à la mobilisation du récepteur T, dépendante des molécules de classe II du CMH, et mise en évidence par les "superantigènes" comme l'entérotoxine staphylococcique B (SEB) (Gurley et al. 1989; Hofmann et al. 1989). Ce déficit de prolifération est corrélé à l'induction de la mort cellulaire des lymphocytes T CD4⁺ par apoptose (Ameisen et al. 1991; Gougeon et al. 1991; Groux et al. 1992). Par contre, les cellules T CD4⁺ conservent plus longtemps (jusqu'à la dernière année précédant le stade SIDA), la possibilité de répondre *in vitro* à des cellules allogéniques, à la PHA et à des anticorps CD3. Néanmoins, une perte de la réponse aux anticorps CD3 a été observée plus précocement (Gruters et al. 1990; Miedema et al. 1988; Miedema 1992). Au cours de la phase SIDA, les cellules ne prolifèrent plus à aucun mitogène.

D'autres modèles ont également été proposés pour expliquer ces dysfonctions lymphocytaires:

- augmentation des cellules T suppressives (Cunningham-Rundles et al. 1983; Hofmann et al. 1986);
- réponse auto-immune (Dorsett et al. 1985; Edelman et al. 1989);
- infection et destruction sélective des cellules mémoires (Miedema et al. 1990; Van Noesel et al. 1990);
- signaux inhibiteurs fournis par les protéines virales, (Shalaby et al. 1987; Viscidi et al. 1989), modulation de la signalisation cellulaire lors de la formation du complexe gp120-CD4-p56^{lck} (Crise et al. 1992);
- hyperactivation des cellules et donc incapacité du système immunitaire à répondre à une stimulation ultérieure (Kornfelt et al. 1988).

L'infection par le VIH est également caractérisée par une activation poly- et oligoclonale des lymphocytes B avec pour corollaire, une hypergammaglobulinémie.

L'infection persistente des macrophages suggèrent que ces cellules jouent le rôle de réservoir dans l'infection par le VIH. L'infection de ces derniers est particulièrement importante au niveau du système nerveux central et est associée à la démence fréquemment observée chez les patients. Une production anormalement élevée d'IL6, de TNF α et de TGF- β (transforming growth factor- β) par les monocytes/macrophages a également été montrée (Müller 1992). Des dysfonctionnements au niveau des cellules dendritiques (CD) ont également été démontrés lors de l'infection par le VIH. Les CD ont la capacité de présenter l'antigène aux cellules T CD4⁺ naïves et participent à l'expansion des cellules T CD4⁺ mémoires, ce qui pourrait expliquer l'induction de signaux incomplets conduisant à la déplétion T (Miedema et al. 1988; Petit et al. 1988; Macatonia et al. 1992).

B. OBJECTIFS

L'infection par le VIH aboutit à une perturbation profonde du système immunitaire et à une déplétion des lymphocytes T CD4⁺. Les mécanismes à la base de cette déplétion ainsi que l'identité des protéines virales y contribuant ne sont pas encore clairement expliqués. Néanmoins, de nombreuses hypothèses ont été avancées, comme la réémergence inappropriée dans la population lymphocytaire T CD4⁺ d'un programme de mort cellulaire en réponse à l'activation (apoptose), l'infection de cellules précurseurs, l'effet lytique du virus ou encore l'interaction de protéines virales comme la gp160 avec le récepteur CD4.

Le but de ce travail est d'étudier le rôle de la protéine virale Nef dans le dysfonctionnement du système immunitaire induit par le VIH. Des expériences conduites sur des singes rhésus infectés par différents clones de SIV recombinants soulignent l'importance de Nef dans deux aspects essentiels de l'infection: le maintien d'une charge virale élevée et le caractère pathogène du virus. De plus, une expression plus faible du CD4 membranaire de lignées lymphocytaires T exprimant la protéine Nef ainsi qu'une inhibition de l'expression de l'interleukine 2 ont été mis en évidence. Nef aurait donc la potentialité de modifier le fonctionnement normal des lymphocytes T.

La première partie de ce travail consistera à mettre en évidence la localisation de Nef par microscopie électronique dans différentes lignées lymphocytaires et monocytaires ainsi que dans les lymphocytes T CD4⁺ humains normaux, exprimant Nef après transfection d'un vecteur d'expression correspondant ou infection par le VIH.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous étudierons le rôle de Nef dans la réponse de lymphocytes T activés ainsi que son rôle dans la relation entre l'activation cellulaire et

l'activation du LTR du VIH. Les marqueurs d'activation classiques tels que l'expression d'interleukines, de récepteurs ou encore la translocation nucléaire des facteurs d'activation NF- κ B ou AP-1 seront examinés. La réponse antigène dépendante en présence de cellules présentatrices exprimant Nef sera également abordée.

Parmi les dysfonctions du système immunitaire observés chez les sujets infectés, différentes anomalies au niveau du métabolisme du glutathion et de la production des formes activées de l'oxygène (FAO) ont été décrites. Les FAO ne sont pas uniquement importantes dans les mécanismes de défense non spécifique du système immunitaire vis-à-vis des agents pathogènes mais jouent également un rôle lors de l'activation lymphocytaire et de la réplication virale. Vu l'importance de ces anomalies chez les patients infectés par le VIH et de l'intérêt potentiel des intermédiaires réactifs de l'oxygène dans l'activation cellulaire, nous terminerons ce travail par l'étude du rôle de Nef dans le métabolisme oxydatif.

C. ARTICLE 1

**1. ULTRASTRUCTURAL LOCALIZATION AND SECRETION OF NEF PROTEIN
IN HIV INFECTED AND NEF TRANSFECTED CELLS**

CARREER, R., SLOMIANNY, C., AMEISEN, J.C. and CAPRON, A.

submitted to Virology

ULTRASTRUCTURAL LOCALIZATION AND SECRETION OF HIV-1 NEF PROTEIN IN
HIV INFECTED AND NEF TRANSFECTED CELLS.

Running title : Ultrastructural localization of Nef

CARREER R.^{1*}, SLOMIANNY C.², AMEISEN J.C.¹ AND CAPRON A.¹

1. Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire - INSERM U167 - CNRS 624 - Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, 59000 Lille - FRANCE
2. Biologie et Biochimie Parasitaires et Fongiques - INSERM U42 - Domaine du CERTIA -BP 39 - 369 rue Jules Guesde - 59651 Villeneuve d'Ascq - Cedex - France

* Corresponding author

TEL : (33) 20.87.78.90

FAX : (33) 20.78.88

Address reprint requests to :

Roxanne CARREER
Institut Pasteur de Lille
Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
1, rue du Professeur Calmette
59000 Lille - France

ABSTRACT

Since the Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) Nef gene has been shown to be important in viral pathogenesis, we have undertaken to localize the Nef protein by electron microscopy in HIV-1 infected and transfected human lymphocytes and monocytes. In peripheral blood lymphocytes and EBV transformed B cells, Nef was shown to be diffusely present either in the cytoplasm, or in the endoplasmic reticulum and in the Golgi multivesicular bodies. Nef expression in the Golgi apparatus correlated with the presence of the Nef protein in cell supernatants and co-localized with gp120 in infected cells. In the Jurkat T lymphocytic and the THP1 monocytic cell lines, Nef was only present diffusely in the cytoplasm. This may have been due to a lower overall level of Nef expression. Taken together, these data suggest that localization of Nef in the Golgi apparatus may involve interaction between CD4 and/or gp120 and Nef. Moreover, the extracellular release of Nef by HIV infected lymphocytes may be important in the immune dysfunction induced by HIV-1.

The human immunodeficiency virus (HIV) genome codes for several non-structural proteins (Tat, Rev, Nef, Vif, Vpr, Vpu, Vpx) with identified or presumed regulatory functions [1]. Despite controversy regarding Nef function, the conservation of the gene throughout the primate lentiviruses implies that Nef plays an important role in the viral life cycle. In primate lentiviruses, expression of the Nef gene *in vivo* is required for both high viral load and disease induction in rhesus macaques infected with the Simian Immunodeficiency Virus (SIV) [2]. Furthermore, Rhesus monkeys vaccinated with SIV deleted of Nef are completely protected against challenge by an intravenous inoculate of live, pathogenic SIV [3]. Down-regulation of surface CD4 antigen [4-6] in established human T cell lines and in transgenic mice [7] that express the nef gene has also been reported. In view of the functional importance of Nef in

viral pathology, we have undertaken studies to determine ultrastructural localization of the Nef protein in HIV infected and in Nef transfected human lymphocytes and monocytes.

Peripheral blood lymphocytes (PBL) were isolated by centrifugation over Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals), stimulated for 3 days in culture medium supplemented with PHA (10 μ g/ml, Sigma), infected at day 3 with a stock supernatant of HIV-1 IIIB (LAI) for 2 hours, washed, and cultivated in medium supplemented with r-IL2 (10U/ml, Boehringer) for 8 days [8]. The Epstein-Barr virus transformed B-cell line (EBV⁺B) was derived from the blood of a healthy adult as described previously [9] and infected as described by Montagnier *et al.*[10]. The Jurkat T lymphocyte cell line was infected as described above [8]. Jurkat and THP1 monocytic cells were also stably transfected with the Nef expression vector pCMV-Nef. This vector consists of the HIV-1 (LAI-1-Bru strain) *Bam*H1-*Hind*III Nef fragment (nucleotides 8375 to 9209, the *Bam*H1 restriction site was create by directed mutagenesis, *Transgene*, France) linked to the human CMV immediate-early enhancer promoter (pRc/CMV-neo, provided by *In Vitrogen*, France). Another CMV-neo expression plasmid containing the EBV ORI-P sequence was used for stable episomal transfection of EBV⁺ B [11]. For transfection, 5.10⁶ exponentially growing cells (Jurkat, THP-1 or EBV⁺ B) were suspended in 250 μ l of culture medium and transfected with a total of 20 μ g of the corresponding plasmid by electroporation (single pulse, 250volts, 1200 μ F). After selection in culture medium supplemented with G418, Jurkat cells were screened for Nef expression by immunoprecipitation with a rabbit anti-Nef polyclonal serum as previously described [12]. The rabbit polyclonal was obtained by injection of the recombinant *E. coli* Nef protein (*Transgene*, France) purified to greater than 95% and was shown to be specific for Nef by ELISA and immunoprecipitation. Nef expressing cells (Nef⁺cells) were pooled to minimize cellular variability. For negative controls, Jurkat, THP1 and EBV⁺ B cells were transfected with the corresponding CMV-neo vector without the Nef gene, and similarly pooled after

selection (Nef⁻ cells). By electronic microscopy, no morphological differences were seen between Nef⁺ and Nef⁻ cells. The infected PBL cells appeared to be lymphocytes.

The cellular distribution of the Nef protein in infected and transfected cells was first examined by electron microscopy using the rabbit anti-Nef polyclonal serum. Our results are summarized in table 1. Light staining was seen diffusely in the cytoplasm in all type of cells studied. Preferential localization to the inside of the infected lymphocyte-membrane was not found. Surprisingly, in PBL and in EBV⁺ B infected cells, Nef was detected either diffusely in the cytoplasm (Fig. 1a), or in the endoplasmic reticulum (E.R.), and in the multivesicular bodies present at the extremity of the Golgi area (Fig. 1b). Some of these vesicles were distributed near the cell surface. In no case, was nuclear or nuclear membrane staining observed in either infected or transfected cells. As the gp120 protein from HIV-1 is also processed via the rough endoplasmic reticulum and the Golgi complex for glycosylation and interaction with CD4 (Fig. 1e) [13], we performed double labeling in HIV infected PBL. This demonstrated the co-localization of Nef and gp120 in the Golgi vesicles (Fig. 1c) and in the E.R.(Fig. 1d). In contrast to gp120, Nef is not a glycosylated protein, lacks a peptide signal secretion sequence and is myristylated. Nef and gp120 co-localization was also seen in EBV⁺ B cells transfected with Nef, but not in transfected or infected Jurkat or THP1 cells (results not shown). No staining was observed in non infected or Nef⁻ cells (Fig. 1f). Our observations are consistent with that of Schwartz *et al.*, showing that in the presence of Nef, the envelope glycoprotein accumulates in an intracellular compartment through a mechanism dependent on its binding to CD4 [6]. Since the mature form of the env gene product is sequestered, the accumulation could take place in a late golgi compartment. Co-localization of Nef in the Golgi apparatus confirms this hypothesis.

Differences in the localization of Nef between PBL, EBV⁺ B and Jurkat, THP-1 cells may be explained by difference in the level of Nef expression. Interestingly, PBL and EBV⁺ B were always more heavily labeled using electronic microscopy and immunofluorescence methods. We have used an episomal vector to expressed the Nef protein in EBV⁺ B cells. This vector is maintained at several copies in the cell and is not integrated in the

cellular DNA. Schwartz *et al.*, have reported that lower expression of Nef did not result in significant decrease of CD4 cell surface expression whereas 5- to 10- fold higher levels of Nef expression leads to an obvious effect on CD4 localization [6]. In accordance with this, no difference in CD4 surface expression was observed in Jurkat (98%) and THP-1 (50%) Nef⁺ or Nef⁻ cells. Cells were stained with IOT4-FITC monoclonal antibodies (Immunotech) and immunofluorescent staining was measured by fluorescence-activated cell sorter analysis. As very low CD4 expression was detected in Nef⁺ and Nef⁻ EBV⁺ B cells (4%), no Nef mediated downmodulation of CD4 could be seen. Since CD4 downmodulation has been shown in PBL cells infected by the whole virus, modification of CD4 expression could not be related only to Nef expression Jurkat.

The presence of Nef in the secretion pathways suggested that Nef might be secreted by these cells. For this reason, we investigated the presence of Nef in the supernatant of Nef⁺ cells. PBL at day four of infection were washed three times and labeled with {³⁵S} methionine for 4 hours. No cell lysis was detected by blue Trypan staining. The culture supernatants were then collected, filtered using 0,22- μ m-pore-size filter to prevent cell contamination. No lactate dehydrogenase activity was detected in supernatants (an enzyme specific for intracellular metabolism) [14]. Nef protein was immunoprecipitated as previously described [12]. Nef was detected in HIV infected cells, but also in the corresponding supernatants (Fig.2). Nef was still detected in the supernatants when cell-free supernatants were centrifuged for 10 min at 276,000xg to eliminate potential viral particles. The presence of Nef in the supernatant of EBV⁺ B Nef expressing cells also correlated with the presence of Nef in the Golgi apparatus. No Nef was detected in the supernatant of infected Jurkat cells or transfected Jurkat and THP-1 cells (results not shown).

These results show for the first time that Nef localization in the R.E. and the Gogi apparatus is followed by Nef secretion. As specific localization of Nef in the secretory pathway is shown in HIV infected T cells, this may be an important observation since these cells represent one of the predominant types infected *in vivo*. The secretion of Nef by HIV infected T cells

raises questions about the biological importance *in vivo* of extracellular Nef during the course of HIV-1 infection. Cellular release of Nef may contribute to the induction of immune dysfunction in HIV-1 infected individuals and possible immunomodulatory functions of Nef remain to be investigated. There is growing body of evidence demonstrating that exposure of lymphoid cells *in vitro* to various HIV-1 products (e.g., Tat and gp120) can result in functional alterations in the uninfected cells [15, 16].

Fig 1 : Immunolocalization of Nef (a,b) or gp120 and Nef (c and d).

(a) The labelling is seen in the cytosol of the PBLs, but not in mitochondries (M) or nucleus (N) (x24,000).

(b) PBL infected cells where some organelles are heavily labelled, multivesicular bodies (x41000);

(c and d): co-localization of gp120 (10-12nm) and Nef (5-6nm);

(c) Golgi stacks (x 44,500) and endoplasmic reticulum (x37,500) (d);

(e) HIV infected PBL were labelled with the mouse anti-gp120 monoclonal alone (*Hybridolab*, 110-B (157)) (x25,000) and Nef⁻ EBV⁺ B cells labelled with the same rabbit anti-Nef polyclonal serum (x25,000) (f).

Cell suspensions were fixed for immunoelectron microscopy with 4% paraformaldehyde, 0,1% glutaraldehyde in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 for 30 min. at 4°C. They were then washed, cryopreserved and cut according to Tokuyasu [17] as modified by Griffiths et al [18]. The cryosections were collected on nickel grids and blocked with a solution of PBSOG (PBS+ovalbumine 1% +gelatine 1%) then incubated for 1 h at 37° C with the rabbit anti-Nef polyclonal serum. They were washed again in PBSOG and the IgG were revealed with Protein A-gold 5-6 nm according to Gueuze et al. [19]. The grids were contrasted with uranyl acetate, coated with methylcellulose [18] and examined with a Hitachi H600 electron microscope. Antibody specificity was checked using Nef⁻ cells and non infected cells. Double labeling was performed as described above using the mouse anti-gp160 and the anti-Nef rabbit polyclonal serum. Sections were incubated with a mixture of the two primary antibodies, followed by incubation with goat anti-mouse colloidal gold (10-12nm, Jansen Auroprobe) and goat anti-rabbit colloidal gold (5-6nm, Jansen Auroprobe).

Fig 2 : Immunoprecipitation with anti-Nef polyclonal serum. Extracts from PBL non-infected cells labelled with [³⁵S] Methionine (lane 1) and corresponding supernatant (lane 3); PBL infected cells (lane 2) and corresponding supernatant (lane 4).

Nef localization and secretion in HIV infected and Nef transfected cells

Cellular distribution	PBL/ HIV	JKT/ HIV	JKT/ Nef	EBV+ B/ HIV	EBV+ B/ Nef	THP1/ Nef
cytoplasmic	+	+	+	+	+	+
end.reticul.	+	-	-	+	+	-
Golgi	+	-	-	+	+	-
multivesicular bodies	+	-	-	+	+	-
supernatant	+	-	-	+	+	-
gp120 co-localization	+	ND	ND	+	ND	ND

Table 1 : cellular distribution and secretion of Nef protein in infected PBL (PBL/HIV), infected Jurkat (JKT/HIV), transfected Jurkat cells (JKT/Nef), infected EBV⁺ B cells (EBV⁺ B/HIV), transfected EBV⁺ B cells (EBV⁺ B/Nef), and transfected THP-1 (THP1/Nef) cells. ND : Not Determined

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank R. Lafyatis for helpful discussion, P.J. Farrel for the gift of EBV⁺ B transfection vector, F. Traincard for the gift of anti-gp120 monoclonal antibody and B.Guy for the gifts of HIV-1 Lav Bru Nef plasmid (pTG 1147) and for the gift of recombinant protein. This work was supported by a fellowship of the European Community.

REFERENCES

1. Feinberg, M. and Greene, W.C.(1992). Molecular insight into human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *Curr. Opin. Immunol.* **4**, 466-474.
2. Kestler, H., Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, M.D. and Desrosiers, R.C.(1991). Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**, 651-62.
3. Muthiah, D.D., Kirchoff, F., Czajak, S.C., Sehgal, P.K. and Desrosiers, R.C.(1993). Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the Nef Gene. *Science* **258**, 1938-1941.
4. Garcia, J.V. and Miller, A.D.(1991). Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* **350**, 508-11.
5. Guy, B., Kieny, M.P., Riviere, Y., Le Peuch, C., Dott, K., Girard, M., Montagnier, L. and Lecocq, J.P.(1987). HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* **330**, 266-9.
6. Schwartz, O., Rivière, Y., Heard, J.-M. and Danos, O.(1993). Reduced cell surface expression of processed Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope glycoprotein in the presence of nef. *J.Virol.* **67**, 3274-3280.
7. Skowronski, J., Parks, D. and Mariani, R.(1993). Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene. *EMBO* **12**, 703-713.
8. Monte, D., Groux, H., Raharinivo, B., Plouvier, B., Dewulf, J., Clavel, T., Granette, C., Torpier, G., Auriault, C., Capron, A. and Ameisen, J.C.(1992). Productive Human

Immunodeficiency virus-1 infection of megakaryocytic cells is enhanced by tumor necrosis factor-alpha. *Blood* **79**, 2670-2679.

9. Colingan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W.(1991). Current protocols in immunology. *Greene publishing associates and Wiley-Intersciences*

10. Montagnier, L., Gruest, J., Chamaret, S., Dauguet, C., Axler, C., Guétard, D., Nugeyre, D., Barré-Sinoussi, F. and Chermann, J.-C.(1984). Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines. *Science* **225**, 63-66.

11. Gordon, J.A., Inman, G.J., Parker, B.P., Rowe, D.T. and Farrel, P.J.(1992). Cell growth effects of Epstein-Barr virus leader protein. *J. Gen. Virol.* **73**, 1547-1551.

12. Kim, S., Ikeuchi, K., Byrn, R., Groopman, J. and Baltimore, D.(1989). Lack of a negative influence on viral growth by the nef gene of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9544-8.

13. McKeating, J.A. and Willey, R.L.(1989). Structure and function of the HIV envelope. *AIDS* **3**, S35-S41.

14. Reeves, W.J. and Fimognari, G.M.(1963). An improved procedure for the preparation of crystalline lactic dehydrogenase from hog heart. *J.Biol.Chem.* **238**, 3853-3858.

15. Viscidi, R.P., Mayur, K., Lederman, H.M. and Frankel, A.D.(1989). Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by tat protein from HIV-1. *Science* **246**, 1606-1608.

16. Pantaleo, G., Graziosi, C. and Fauci, A.S.(1993). Mechanisms of disease. *N. Engl. J. Med.* **328**, 327-335.

17. Tokuyasu, K.T.(1973). A technique for ultracryotomy of cell suspension and tissues. *J.Cell.Biol.* **57**, 551-565.

18. Griffiths, G., Simmons, K., Warren, G. and Tokuyasu, K.T.(1983). Immunoelectron microscopy using thin, frozen sections : applications to studies of the intracellular transport of Semliki forest virus spike glycoproteins. *Methods in enzymol.* **96**, 435-450.

19. Gueuze, H.J., Slot, J.W., Scheffer, R.C.T. and Van Der Ley, P.A.(1981). Use of colloidal gold particles in double-labeling immunoelectron microscopy of ultrathin frozen tissue sections. *J.Cell.Biol.* **89**, 653-665.

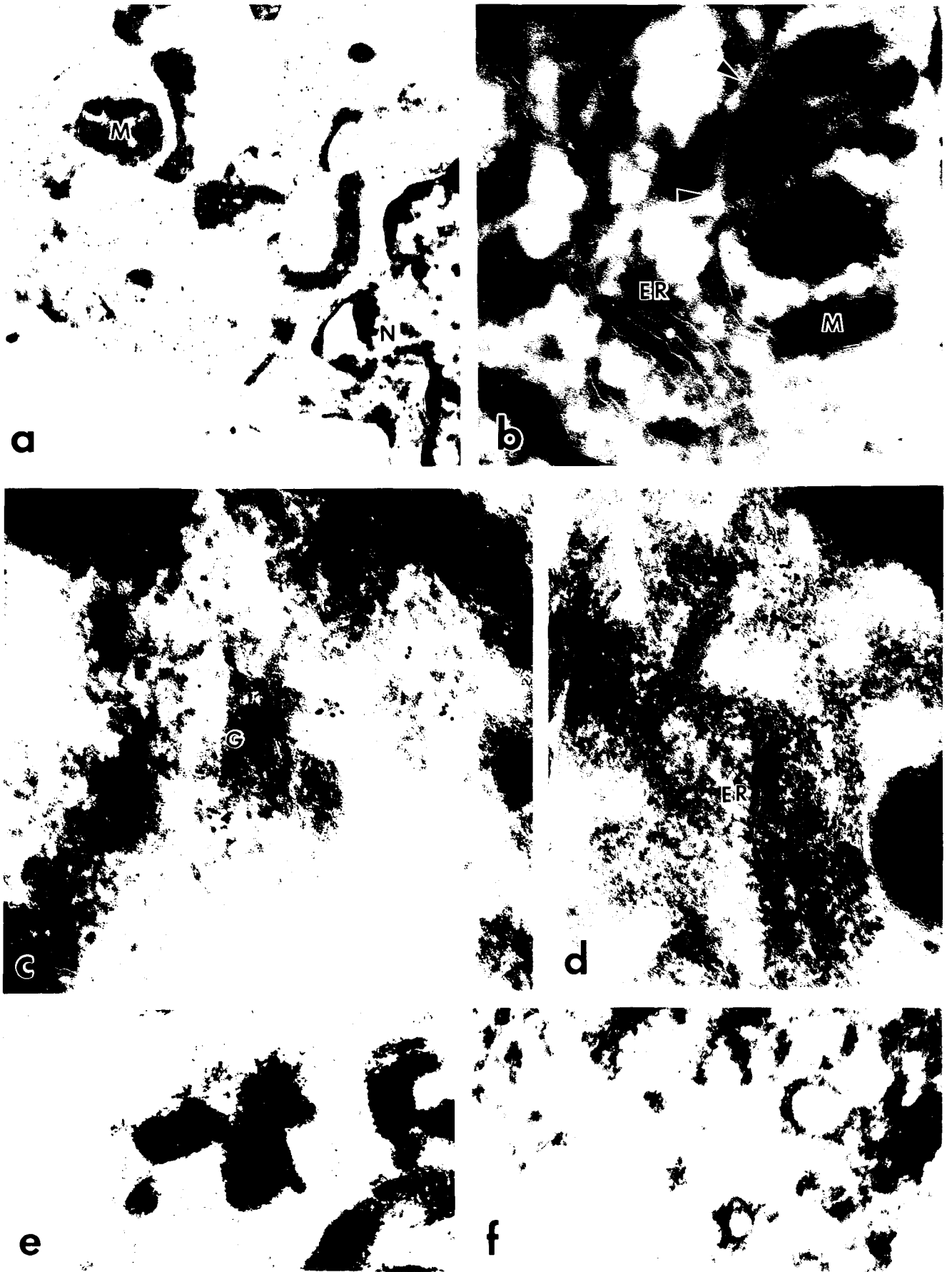


Fig 1: Localisation de Nef par microscopie électronique

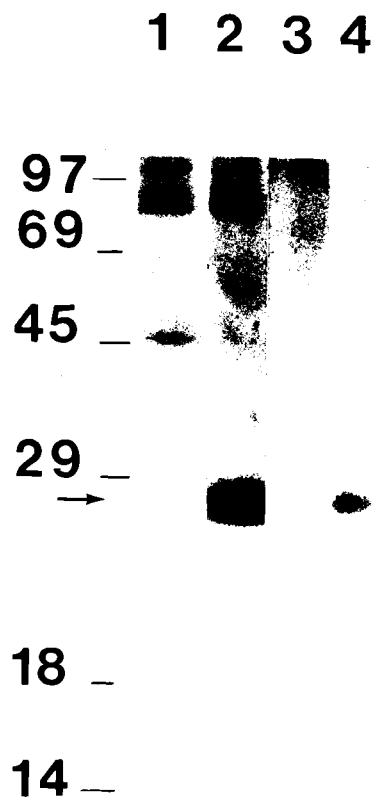


Fig 2: Mise en évidence de Nef dans le surnageant cellulaire

2. DISCUSSION

Par microscopie électronique, nous avons montré que Nef était localisée soit de façon diffuse dans le cytoplasme, soit dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi de lymphocytes T normaux infectés *in vitro* par le VIH et de lymphocytes B transformés par EBV et infectés *in vitro* par le VIH ou transfectés de façon stable par un vecteur d'expression de Nef (B-EBV-Nef⁺). La co-localisation de Nef et gp120 ainsi que la présence de Nef dans le surnageant cellulaire ont également été mises en évidence. Par contre, nous n'avons observé qu'une localisation cytoplasmique diffuse dans les lignées lymphocytaire T Jurkat et monocyttaire THP-1 infectées ou transfectées par un vecteur d'expression de Nef correspondant.

L'infection de lymphocytes T normaux par le VIH constitue le modèle cellulaire le plus proche de la situation *in vivo* et la mise en évidence de Nef dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi n'est certainement pas sans conséquence. Comme le récepteur CD4 transite également par cette voie, cette observation pourrait expliquer l'effet post-transcriptionnel négatif de Nef sur l'expression membranaire de CD4 observé par d'autres groupes (Guy et al. 1987; Garcia et al. 1991; Garcia et al. 1993; Schwartz et al. 1993). L'élimination de lymphocytes T CD4⁺ exprimant Nef dans les compartiments périphériques de souris transgéniques mise en évidence par Skowronski *et al.* suggère également que Nef joue un rôle direct dans la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ et le caractère pathogène du virus (Skowronski et al. 1993). De plus, la régulation par le VIH de son récepteur CD4 protégerait les cellules d'infections répétées et létales; ceci n'étant pas un cas sans précédent parmi les rétrovirus (Weiss 1991). En outre, le réticulum endoplasmique (RE) joue un rôle central dans l'établissement de la structure tridimensionnelle des protéines. Il est donc possible que la conformation tertiaire de Nef soit différente dans le RE et le cytoplasme (modification de l'appariement de S-S) avec pour conséquence, une activité biologique différente.

La co-localisation de Nef et gp120 appuie l'hypothèse de Schwartz *et al.* selon laquelle en présence de Nef, la gp120 s'accumule dans un compartiment cellulaire, probablement l'appareil

de Golgi, par un mécanisme dépendant de son interaction avec CD4 (Schwartz et al. 1993). L'expression précoce de Nef présenterait ainsi un avantage sélectif important: en diminuant l'expression membranaire de gp120, et donc l'effet cytopathogène du virus, il est possible que Nef contribue de cette façon au maintien d'une charge virale élevée (Orenstein et al. 1988; Kestler et al. 1991; Schwartz et al. 1993).

D'autres protéines de régulation virales n'agissent pas directement, ou pas uniquement, au niveau de la régulation transcriptionnelle mais à un stade ultérieur, au niveau de la maturation des particules virales. En effet, Vif joue un rôle essentiel dans la maturation des protéines d'enveloppe, Vpu active le processing de la gp160 et favoriserait la formation du complexe gp120-gp41 au détriment du complexe gp160-CD4.

La localisation uniquement cytoplasmique de Nef dans les lignées Jurkat et THP-1 infectées par le VIH ou transfectées par un vecteur d'expression de Nef correspondant, peut être expliquée par une différence de niveau d'expression de Nef. La détection de Nef par microscopie électronique était nettement plus importante dans les PBL et B-EBV que dans les Jurkat et THP1 infectées ou transfectées. Selon Schwartz *et al.*, l'effet inhibiteur de Nef sur le CD4 membranaire serait fonction du niveau d'expression de la protéine. Nef ne modifiait pas le niveau d'expression de CD4 dans une lignée lymphocytaire CEM lors d'une première étude (Schwartz et al. 1992). Par contre, en utilisant un vecteur rétroviral permettant une expression 5 à 10 fois plus élevée du même gène, une diminution du CD4 membranaire est observée. Il est difficile d'établir dans notre étude une corrélation entre le niveau d'expression de CD4 et la localisation de Nef. Par immunofluorescence (FACS), nous n'avons pas observé de différences entre le niveau d'expression de CD4 dans les lignées Jurkat et THP1 exprimant ou non Nef, ce qui semble logique. Les lymphocytes B-EBV expriment quant à eux peu de CD4 à leur surface. La modulation de l'expression membranaire de CD4 dans les PBL infectés par le virus entier ne peut être uniquement imputée à l'expression de Nef.

La présence de Nef dans l'appareil de Golgi est suivie de la mise en évidence de la protéine dans le surnageant. D'autres protéines virales comme Tat (Frankel et al. 1988; Viscidi et al. 1989; Ensoli et al. 1993) ainsi que la protéine Tax de HTLV-1 (Lindholm et al. 1992) sont présentes à l'extérieur des cellules infectées et modifient l'activation cellulaire. La protéine Tat recombinante inhibe la prolifération lymphocytaire T CD4⁺ (Viscidi et al. 1989). En nous basant sur le même protocole, nous n'avons pas pu montrer de modulation, par la protéine Nef recombinante, de la prolifération de lymphocytes T normaux en réponse aux antigènes mémoires, à l'activation CD3 dépendante ou à la PHA. La protéine recombinante utilisée est produite à partir d' *E. coli* et est pure à 95% (produite par Transgène, France). Les lymphocytes normaux sont isolés à partir d'individus sains par Ficoll et mis directement en culture en plaque 96 puits. La protéine recombinante est ajoutée à différentes concentrations (de 0,5 à 5 µg/ml) une heure avant l'addition des stimuli (antigène mémoire: toxine tétanique ou influenza, anti-CD3, PHA). La prolifération lymphocytaire est mesurée par incorporation de thymidine à 3 jours (PHA et anti-CD3) ou 5 jours (antigènes mémoires). Aucune différence de prolifération n'a été mesurée en présence et absence de Nef. Du surnageant de culture de B-EBV-Nef⁺ contenant de la protéine Nef a également été utilisé mais sans résultat. Il n'est évidemment pas certain que la protéine recombinante présente la même activité biologique que la protéine native ou que la protéine Nef présente dans le surnageant de B-EBV-Nef⁺ soit toujours fonctionnelle.

D. ARTICLE 2

**1. ROLE OF HIV-1 NEF EXPRESSION ON ACTIVATION PATHWAYS IN CD4+ T
CELLS**

CARREER R. , GROUX H., AMEISEN J.C. and CAPRON A.

submitted to AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES

ROLE OF HIV-1 NEF EXPRESSION ON ACTIVATION PATHWAYS IN CD4⁺ T CELLS

ROXANNE CARREER§, HERVE GROUX, JEAN-CLAUDE AMEISEN AND ANDRE
CAPRON

Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire - Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur
Calmette, 59000 Lille - FRANCE

§ Corresponding author

TEL : (33) 20.87.78.90

FAX : (33) 20.87.78.88

Address reprint requests to :

Roxanne CARREER
Institut Pasteur de Lille
Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire
1, rue du Professeur Calmette
59000 Lille - France

ABSTRACT

The role of the Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) Nef protein on T-cell activation pathways was investigated using a Jurkat CD4⁺ cell line stably transfected with a Nef expression vector. Secretion of IL2 and TNF- α , surface expression of IL2-R and DNA binding activity of NF-kB and AP-1 (Fos/Jun) complex in response to phorbol myristate acetate, TNF- α or immobilized antibodies to CD3 were monitored. These parameters were not modified by Nef expression in Jurkat cells, whereas stimulation with the same stimuli resulted in partial inhibition of LTR activation in Nef⁺ Jurkat cells. This inhibition was not mediated through Nef phosphorylation on threonine15 or GTP binding activity since mutations in critical sites did not alter this inhibition. Analysis of truncated LTRs confirmed that inhibition of LTR activation was not mediated through NF-kB binding activity but through the region containing the negative responding elements (NRE). These results suggest that Nef downmodulates LTR activation without significantly inhibiting the capacity of T cells to respond to immunological activation.

INTRODUCTION

The HIV-1 genome codes for several non-structural proteins (Vif, Tat, Rev, Nef, Vpr, Vpu, Vpx) [1]. The Nef gene product is an 27-KDa myristylated, cytoplasmic protein. Autophosphorylation in the presence of nucleoside triphosphates and PKC dependent phosphorylation have been described using recombinant protein or protein from recombinant vaccinia viruses [2, 3].

Despite controversy regarding Nef function, the conservation of the gene throughout the primate lentiviruses implies that Nef has an important role in the viral life cycle. In primate lentiviruses, expression of the Nef gene *in vivo* is required for both the establishment of persistent infection and the development of disease in rhesus macaques infected with the Simian Immunodeficiency Virus (SIV) [4]. Furthermore, Rhesus monkeys vaccinated with live SIV deleted of Nef were completely protected against challenge by intravenous inoculation of live, pathogenic SIV [5]. Lymphoid organs play a major role in the pathogenesis of HIV infection and represent the major reservoir of HIV in asymptomatic infected individuals. Factors that play a role in normal immunological responses may affect the level of virus expression and replication within the lymphoid tissues [6].

In this regard, an understanding of the role of Nef during the response of T- cells to immunological stimuli and of the relation between T-cell activation and viral gene expression may be more relevant to the *in vivo* situation and provide a better understanding of the function of Nef during disease evolution. For this purpose, we have stably transfected Jurkat cells with a Nef expression plasmid. Cellular activation parameters were monitored by measuring NF- κ B and AP-1 (Fos/Jun) binding activities, TNF and IL2 secretion, and IL2-R surface expression. The influence of activation parameters on LTR activation was monitored using deleted LTR reporter plasmids.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

The pCMV-Nef-2 vector used for stable transfection consisted of the HIV-1 (LAI strain) *Bam*H1-*Hind*III Nef fragment (nucleotides 8375 to 9209) linked to the human CMV immediate-early enhancer promoter (pRc/CMV-neo, provided by *In Vitrogen*, France). The BamH1 restriction site was created by site specific mutagenesis in front of the start codon (ggattt into ggatcc) (a gift from B. Guy, Transgene, France). The pCMV-Nef-1 is a Nef expression vector with an alanine at position 15 instead of threonine and pCMV-Nef-3 has an Asn at position 186 (WRFD tetrapeptide, putative site involved in GTP binding) instead of Asp (mutated Nef genes were gifts from Transgene). The luciferase reporter plasmids under the control of various HIV-LTR fragments or of the weak truncated herpes simplex promoter are described elsewhere [7, 8] (kindly provided by F. Arenzana Seisdedos, Institut Pasteur, Paris-France). Briefly, pLTR-Luc is a plasmid in which the HIV-LTR fragment {*Xho*I (-640)- *Hind*III (+78)} was cloned upstream the luciferase gene. A shorter fragment in which the NRE region was deleted {(-177)- (+78)} was cloned upstream of the luciferase gene generating pLTR Δ NRE. The pLTR Δ κ B plasmid was obtained by insertion into the pC-Luciferase plasmid of the κ B consensus motif-deleted *Xho*I -*Hind*III fragment of the HIV-1-LTR. The pEnh -TK luciferase construct contains three copies of the synthetic HIV-enhancer oligonucleotide NF- κ B cloned upstream of the TK promoter.

Cell transfection

The human Jurkat T cell line was maintained in exponential growth phase in RPMI 1640 with 10% fetal calf serum (FCS), glutamine (2mM), sodium pyruvate and gentamicin (80 μ g/ml) in 5% CO₂ and were tested for mycoplasma contamination. For transfection, 5.10⁶ exponentially growing T cells were suspended in 250 μ l of culture medium and transfected with a total of 20 μ g of the corresponding plasmid (pCMV-Nef-1, -2 or -3) by electroporation (single

pulse, 250volts, 1200 μ F). For transient transfection experiments, cells were activated 24 hours later by resuspension in fresh medium containing Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 20ng/ml; Sigma), phytohemagglutinin (PHA, 10 μ g/ml; Sigma) or tumor necrosis factor (TNF α , 500U/ml, Boeringher Mannheim). Anti-CD3 antibody (ascites fluid dilution, 1:1000) was coated on 96 wells plate for 4 hours at 37° in TRIS-HCl 0.1 M, pH 9. Luciferase activity was measured in cell lysates after 8 hours by chemiluminescence using a LKB chemiluminometer as previously described [9, 10]. For the production of stable transformants, G418 (GIBCO/BRL) was added 72 hours after transfection and cells were screened for Nef expression 3 weeks later by immunoprecipitation with a rabbit anti-Nef polyclonal serum as previously described [11]. Nef positive transfected cells were pooled to minimize cellular variability (Nef1⁺, Nef2⁺ or Nef3⁺). As shown by immunofluorescence, more than 80% of transfected cells expressed the Nef protein. Nef⁻ cells are Jurkat cells transfected with only the pRC/CMV-neo vector and pooled after selection.

Band- shift assay

For preparation of nuclear proteins, Nef2⁺ and Nef⁻ Jurkat cells were washed and deprived of FCS for 24 hr before stimulation. After incubation with the appropriated stimuli, nuclear extracts were prepared and tested as previously described [7, 10]. Protein concentration was determined with the Bradford reagent (Bio-Rad) and 1 μ g of nuclear protein was used in each assay. Double-stranded oligonucleotides corresponding to either AP-1 or NF-kB sequence were endlabeled with $\{\gamma\text{-}^{32}\text{P}\}$ ATP. Specific binding was controlled by competition with a 40-fold excess of unlabeled probe. Sequences of the oligonucleotides used are as follow : NF-kB, 5'-ACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGA-3'; AP-1, 5' CTAGTGATGAGTCAGCCGGATC -3'

Lymphokine assays and immunofluorescence analysis

Culture supernatants of activated Nef1⁺, Nef2⁺, Nef3⁺ and Nef⁻ Jurkat cells were titrated for IL2 and TNF production 16 hours after addition of the appropriate stimuli using CTLL and L929 cell lines respectively as described elsewhere [12]. 16 Hours after addition of PMA, Jurkat cells were stained with anti-Tac FITC monoclonal antibodies (α chain, Coultronics) and immunofluorescent staining was measured by fluorescence-activated cell sorter analysis.

RESULTS

Lymphokine secretion by Nef transfected cells

Jurkat activation was monitored by measuring the production of IL2, TNF α and surface expression of IL2-R following addition of PMA, PMA/PHA or anti-CD3. Similar secretion of TNF α , IL2 and surface expression of IL2-R was observed in both Nef²⁺ and Nef⁻ Jurkat (Table 1). Furthermore, Nef¹⁺ cells (Ala 15) or Nef³⁺ cells (Asn 186) were similarly activated.

Induction of NF- κ B and AP-1 binding activity in Nef transfected cells

NF- κ B and AP-1 are transcription factors important in regulating the expression of several proteins in response to T-cell activation which could in turn modify the pattern of LTR-binding proteins. Furthermore, transcriptional induction of the LTR is dependent upon the presence of κ B enhancer elements present in the LTR [13]. To study the induction of NF- κ B and AP-1 (Fos/Jun) DNA-binding activity in response to activation, gel-shift assays were performed with the nuclear extracts prepared from Nef²⁺ and Nef⁻ Jurkat cells stimulated with PMA, TNF α or anti-CD3 for 15 minutes. These activators stimulated identically AP-1 and NF- κ B DNA binding activity in Nef²⁺ and Nef⁻ Jurkat after 15 minutes of stimulation (Fig.1). Identical results were obtained after 1 and 3 hours of activation (results not shown). IL2 and IL2-R expression is also mediated by the host transcription factors NF- κ B and AP-1 and correct translocation of these factors are in accordance with normal level of IL2, TNF and IL2-R [14, 15].

Activation of HIV-LTR-1 in Jurkat Nef positive cells

In order to provide a basis for studying the role of Nef in the molecular mechanisms relating T-cell activation to LTR activation, we analyzed the level of Luciferase activity in resting and activated Nef²⁺ and Nef⁻ Jurkat cells transiently transfected with the pLTR-luc plasmid.

Basal luciferase expression was not modified by Nef expression in Jurkat cells (results not shown). Activation of Nef²⁺Jurkat cells with PMA resulted in a lower increase of Luciferase activity (3 fold activation) in comparison to Nef⁻ Jurkat cells (9 fold activation). Similar results were obtained after stimulation with TNF or anti-CD3 (Fig.2a). These results indicate that in our system, Nef does not influence basal LTR activity but inhibits LTR activation in response to the stimuli tested.

Importance of regions containing the NRE and the NF-κB LTR recognition sites

It has been recently reported that the Nef protein inhibits NF-κB DNA-binding activity in Jurkat cells [16]. We therefore transiently transfected Nef²⁺ and Nef⁻ Jurkat cells with the pLTRΔκB. Similar relative inhibition of promoter activation in Nef²⁺ and Nef⁻ cells upon stimulation with PMA, TNF or anti-CD3 was seen after transfection of this construct, showing that the inhibitory effect of Nef on the LTR activation can be obtained even in the absence of NF-κB binding activity and suggesting that, as mentioned above, Nef did not act by inhibiting NF-κB activation (Fig.2b). Consistent with this finding, transient transfection with pEnh-TK-Luc (contains three copies of the NF-κB oligonucleotide), followed by the addition of the same stimuli resulted in identical fold activation in Nef²⁺ and Nef⁻ cells (Fig.2c).

The NRE region of the HIV-1 LTR has been shown to have a negative effect on RNA transcription and several binding factors to the NRE region have been identified [17-19]. When transient transfections were performed with an HIV-LTR reporter plasmid deleted of the 5' region containing the NRE (pLTRΔNRE), the negative effect of Nef on activation of the HIV-LTR was no longer seen. Identical LTR activation in response to PMA was obtained in Nef²⁺ and Nef⁻ cells. TNFα and anti-CD3 only weakly activated this deleted HIV-LTR in Nef²⁺ and Nef⁻ Jurkat cells consistent with the importance of this region in TNF and anti-CD3 activation [20] (Fig.2d). Those results suggest that NF-κB mediated LTR transcription was not impaired in Nef expressing cells, whereas sequences located upstream of the nucleotide -177 are involved both in inhibition of PMA activation and are important for TNFα and anti-CD3 LTR activation.

Importance of potential Nef phosphorylation and GTP binding activity in LTR activation

To test the potential importance of intracellular phosphorylation by protein kinase C on Thr15 and Nef GTP binding activity, we transiently transfected Nef1+ (ala15) and Nef3+ (Asn 186) Jurkat cells with pLTR-Luc, pEnh-TK or pLTR Δ NRE plasmid. Identical patterns of inhibition after addition of PMA, TNF or anti-CD3 were observed when using either of these two mutated vectors indicating that these two sites are not responsible for the relative inhibition of LTR activation (Fig.2). These results suggest that modulation of HIV-LTR dependent transcription by Nef is not mediated through Thr phosphorylation or GTP binding activity of Nef.

DISCUSSION

The role of Nef during the response of T-cells to immunological stimuli and the relation between T-cell activation and viral gene expression was investigated using a Jurkat CD4⁺ cell line stably transfected with a Nef expression vector.

The presence of Nef protein in Jurkat cells did not modify the secretion of IL2, TNF and expression of the IL2-R chain in response to PMA, PMA/PHA or anti-CD3. These results are in accordance with a study of Schwartz *et al.*, showing that in an immunocompetent Nef expressing T cell clone, cell proliferation and lymphokine production in response to activation (IL2, alloantigens, PMA or anti-CD3,-4,-28...) remain unmodified by Nef expression [21]. This does not however exclude the possibility that other activation parameters could be modified. Using band-shift assay, identical NF- κ B and AP-1 translocation was observed in response to PMA, TNF α or anti-CD3 in Nef²⁺ and Nef⁻ Jurkat cells. Transient transfection with the pEnh-TK Luciferase expression vector also resulted in identical level of Luciferase expression in Nef⁺ (Nef1⁺, Nef2⁺ or Nef3⁺) and Nef⁻ cells confirming correct NF- κ B dependant activation in the presence of the Nef protein.

However, Niederman *et al.* have reported that Nef protein inhibits the recruitment of NF- κ B and AP-1 DNA-binding activity in Jurkat cells [16, 22]. Difference in the level of Nef expression and/or biological differences that exist between the Jurkat cell lines may account for these results. We have used a mixed population of cells expressing Nef at various levels to exclude the possibility that cloned selection may account for the effect of Nef. Different levels of Nef expression is also more likely close to the *in vivo* situation. On the other hand, Niederman *et al.*, have observed that Nef inhibition was more profound in Jurkat T-cell clones expressing higher level of Nef than in oligoclonal Jurkat cells.

In many respects, the HIV LTR functions like a T-cell activation gene and tight control of LTR expression during lymphocyte activation may be important for the pathogenic effect of HIV during natural infections. We show that the basal level of LTR activity was not noticeably affected by Nef expression, whereas LTR directed gene expression was inhibited after T cell activation by PMA, TNF or anti-CD3. This inhibition was still observed after deletion of the κ B

sequences. PMA is known to induce a wide repertoire of transcription factors which could functionally interact with other sequences within the LTR. Lu *et al.*, have shown that an increase in the LTR-directed gene expression occurs in response to both PMA and TNF α when the NF- κ B binding sites have been completely deleted [18, 19, 23, 24]. Luciferase detection is a highly sensitive method for measuring promoter activity. This might explain why Luciferase activity is still detected after deletion of these sequences. The region containing the NRE was involved both in Nef inhibition of PMA activation and was important for TNF α and anti-CD3 activation. We propose that Nef can downregulate LTR induced expression without modifying the capacity of T-cells to respond to mitogens or immunological stimuli. Since lymphoid tissues play a major role in immunological responses and represent a major reservoir of HIV, the role of Nef may be to tightly control the burst of viral transcription during immunological stimulation.

Mutations of Thr15 into Ala, which is the putative PKC recognition site, and mutation of Asp186 into Asn in a putative site involved in GTP binding activity did not modify inhibition of LTR activation. Apparently, neither of these two functions are needed in order to regulate LTR activity. It has been previously shown that the change of Thr into Ala, and mutation in the putative GTP binding site yield stable Nef proteins of parental phenotype (sensitivity to trypsin digestion and identical level of viral replication) [25]. Furthermore, no direct correlation is seen between spontaneous mutations within those two sites and selection of strains with different phenotype *in vitro* [26, 27].

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank R. Lafyatis for helpful discussion, B.Guy for the gifts of HIV-1 Lav Bru Nef plasmid (pTG 1147), for the two mutated Nef genes (pTG 1191 and pTG 4108) and for the gift of recombinant protein, F. Arenzana-Seisdedos for the gifts of Luciferase expression plasmids and J.P. Kusnierz for synthesising oligonucleotides.

REFERENCES

1. Feinberg, M. and Greene, W.C. : Molecular insight into human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *Curr. Opin. Immunol.* 1992; 4 : 466-474.
2. Guy, B., Kieny, M.P., Riviere, Y., Le Peuch, C., Dott, K., Girard, M., Montagnier, L. and Lecocq, J.P. : HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* 1987; 330 : 266-9.
3. Nebreda, A.R., Bryan, T., Segade, F., Wingfield, P., Venkatesan, S. and Santos, E. : Biochemical and biological comparison of HIV-1 NEF and ras gene products. *Virology* 1991; 183 : 151-9.
4. Kestler, H., Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, M.D. and Desrosiers, R.C. : Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 1991; 65 : 651-62.
5. Daniel, M.D., Kirchhoff, F., Czajak, S.C., Sehgal, P.K. and Desrosieers, R.C. : Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the Nef gene. *Science* 1993; 258 : 1938-1941.
6. Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J., Butini, L., Montroni, M., Fox, C.H., Orenstein, J.M., Kotler, D.P. and Fauci, A.S. : HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically stage of disease. *Nature* 1993; 362 : 355-362.
7. Hazan, U., Thomas, D., Alcamì, J., Bachelierie, F., Israël, N., Yssel, H., Virelizier, J.L. and Arenzana-Seisdedos, F. : Stimulation of a human T-cell clone with anti-CD3 or tumor necrosis factor induces NF-kB translocation but not human immunodeficiency virus 1 enhancer-dependant transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87 : 7861-7865.

8. Bachelierie, F., Alcamì, J., Arenzana-Seisdedos, F. and Virelizier, J.L. : HIV enhancer activity perpetuated by NF- κ B induction on infection of monocytes. *Nature* 1991; 350 : 709-712.
9. Schwartz, S., Felber, B.K., Benko, D.M., Fenyo, E.M. and Pavlakis, G.N. : Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1990; 64 : 2519-29.
10. Israël, N., Hazan, U., Alcamì, J., Munier, A., Arenzana-Seisdedos, F., Bachelierie, F., Israël, A. and Virelizier, J.L. : Tumor necrosis factor stimulates transcription of HIV-1 in human T lymphocytes. independently and synergistically with mitogens. *J. Immunol.* 1989; 143 : 3956-3960.
11. Kim, S., Ikeuchi, K., Byrn, R., Gropman, J. and Baltimore, D. : Lack of a negative influence on viral growth by the nef gene of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86 : 9544-8.
12. Carrel, S., Moretta, A., Pantaleo, G., Tambussi, G., Isler, P., Perussia, B. and Cerottini, J.C. : Stimulation and proliferation of CD4⁺ peripheral blood lymphocytes induced by an anti-CD4 monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 1988; 18 : 333-339.
13. Cullen, B. and Greene, W.C. : Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell* 1989; 58 : 423-427.
14. Lowenthal, J.W., Ballard, D.W., Böhnlein, E. and Greene, W.C. : Tumor necrosis factor alpha induces proteins that bind specifically to κ B-like enhancer elements and regulate interleukin 2 receptor alpha-chain gene expression in primary human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86 : 2331-2335.

15. Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, G.R. and Weiss, A. : Regulation of interleukin-2 enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 1991; 251 : 313-316.
16. Niederman, T.M., Garcia, V., Hastings, R.W., Luria, S. and Ratner, L. : Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein inhibits NF-kB induction in human T cells. *J. Virol.* 1992; 66 : 6213-6219.
17. Guy, B., Acres, B., Kieny, M.P. and Lecocq, J.P. : DNA binding factors that bind to the negative regulatory element of the human immunodeficiency virus-1: regulation by nef. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990; 3 : 797-809.
18. Lu, Y., Touzjian, N., Stenzel, M., Dorfman, T., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A. : The NF-kB independant cis-acting sequences in HIV-1 LTR responsive to T-Cell activation. *J. AIDS* 1991; 4 : 173-177.
19. Lu, Y., Touzjian, N., Stenzel, M., Dorfman, T., Sodroski, J. and Haseltine, W.A. : Identification of cis-acting repressive sequences within the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1990; 64 : 5226-5229.
20. Tong-Starksen, S.E., Luciw, P.A. and Peterlin, B.M. : Signaling through T lymphocytes surface proteins, TCR/CD3 and CD28, activates the HIV-1 replication. *J. Immunol.* 1989; 142 : 702-707.
21. Schwartz, O., Arenzana-Seisdedos, F., Heard, J.M. and Danos, O. : Activation pathways and human immunodeficiency virus type 1 replication are not altered in CD4+ T cells expressing the nef protein. *Aids Res. and Hum. Retrov.* 1992; 8 : 545-551.

22. Niederman, T.M.J., Hastings, W.R., Luria, S., Brandres, J. and Ratner, L. : HIV-1 Nef protein inhibits the recruitment of AP-1 DNA-binding activity in human T-cells. *Virology* 1993; 194 : 338-344.
23. Siekevitz, M., Josephs, S.F., Dukovich, M., Peffer, N., Wong-Staal, F. and Greene, W. : Activation of the HIV-1 LTR by T cell mitogens and the Trans-activator protein of HTLV-1. *Science* 1987; 238 : 1575-1578.
24. Harrich, D., Garcia, J., Mitsuyasu, R. and Gaynor, R. : Tar independent activation of the human immunodeficiency virus in phorbol ester stimulated T lymphocytes. *Embo* 1990; 9 : 4417-4423.
25. Zazopoulos, E. and Haseltine, W.A. : Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Nef function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89 : 6634-8.
26. Terwilliger, E.F., Langhoff, E., Gabuzda, D., Zazopoulos, E. and Haseltine, W.A. : Allelic variation in the effects of the nef gene on replication of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88 : 10971-5.
27. Delassus, S., Cheynier, R. and Wain Hobson, S. : Evolution of human immunodeficiency virus type 1 nef and long terminal repeat sequences over 4 years in vivo and in vitro. *J Virol* 1991; 65 : 225-31.

Table 1. IL2 receptor α chain expression, production of IL2 and TNF by Nef+ and Nef- Jurkat submitted to different stimuli

Expression of	IL2 (1)				TNF (2)				IL2-R (3)			
	Nef ⁻	Nef1 ⁺	Nef2 ⁺	Nef3 ⁺	Nef ⁻	Nef1 ⁺	Nef2 ⁺	Nef3 ⁺	Nef ⁻	Nef1 ⁺	Nef2 ⁺	Nef3 ⁺
unstimulated	<150	<150	<150	<150	<1	<1	<1	<1	8	8	8	8
PMA	6,470	7,542	8,938	6,950	4.02	4.54	4.68	4.29	46	53	62	61
PMA/PHA	33,024	32,589	41,462	40,542	13.66	13.49	14.42	12.89	ND	ND	ND	ND
anti-CD3	9,430	9,989	9,970	9,451	3.68	3.68	3.8	3.89	ND	ND	ND	ND

Nef-1⁺, -2⁺, 3⁺ and Nef⁻ Jurkat cells are cultivated in presence of stimulating agents for 16 hr. (1) CTLL proliferation was measured 72 hr after the addition of supernatants from the stimulated cells by $\{^3\text{H}\}$ thymidine incorporation. Results are expressed in cpm.

(2) Cellular viability of L929 was measured by MTT 16 hr after the addition of supernatants. Results are expressed in U/ml. (3) IL2-R expression is detected by flow cytometry and expressed in % of positive cells.

Culture conditions are described in the methods section.

ND : not determined

Fig. 1

Band-Shift assay using oligonucleotides probes NF- κ B and AP-1. Nef²⁺ and Nef⁻ Jurkat cells were either unstimulated (1) or stimulated with PMA (2), TNF (3) or anti-CD3 (4) for 15 min. and nuclear proteins extracted as previously described. Non-specific labeling was controlled by competition with a 40 fold excess of unlabeled probe (5).

Fig. 2

Nef-1⁺, -2⁺, -3⁺ and Nef⁻ Jurkat cells were transiently transfected with pLTR-HIV (a), pLTR Δ kB (b), pEnh-Tk (c) or pLTR Δ NRE (d) and stimulated as described in the methods section. Luciferase activity was measured in cell lysates made 8 hours after stimulation and is expressed as fold activation normalized to cellular viability and are results from one experiment representative of four.

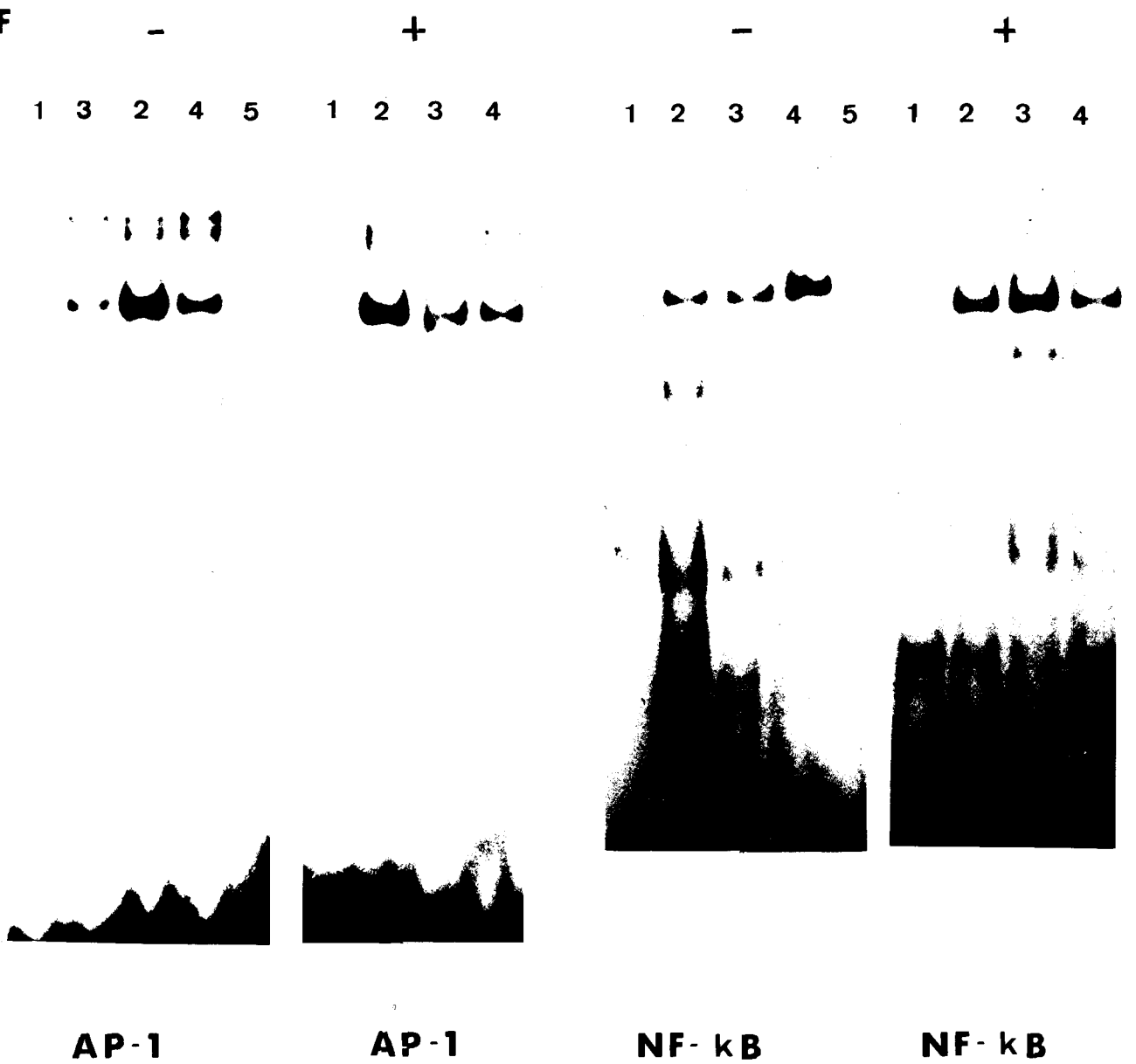


Fig. 1: Gel retard à l'aide des sondes AP-1 et NF-kB en présence d'extraits nucléaires de lymphocytes T CD4⁺ Jurkat exprimant ou non la protéine Nef.

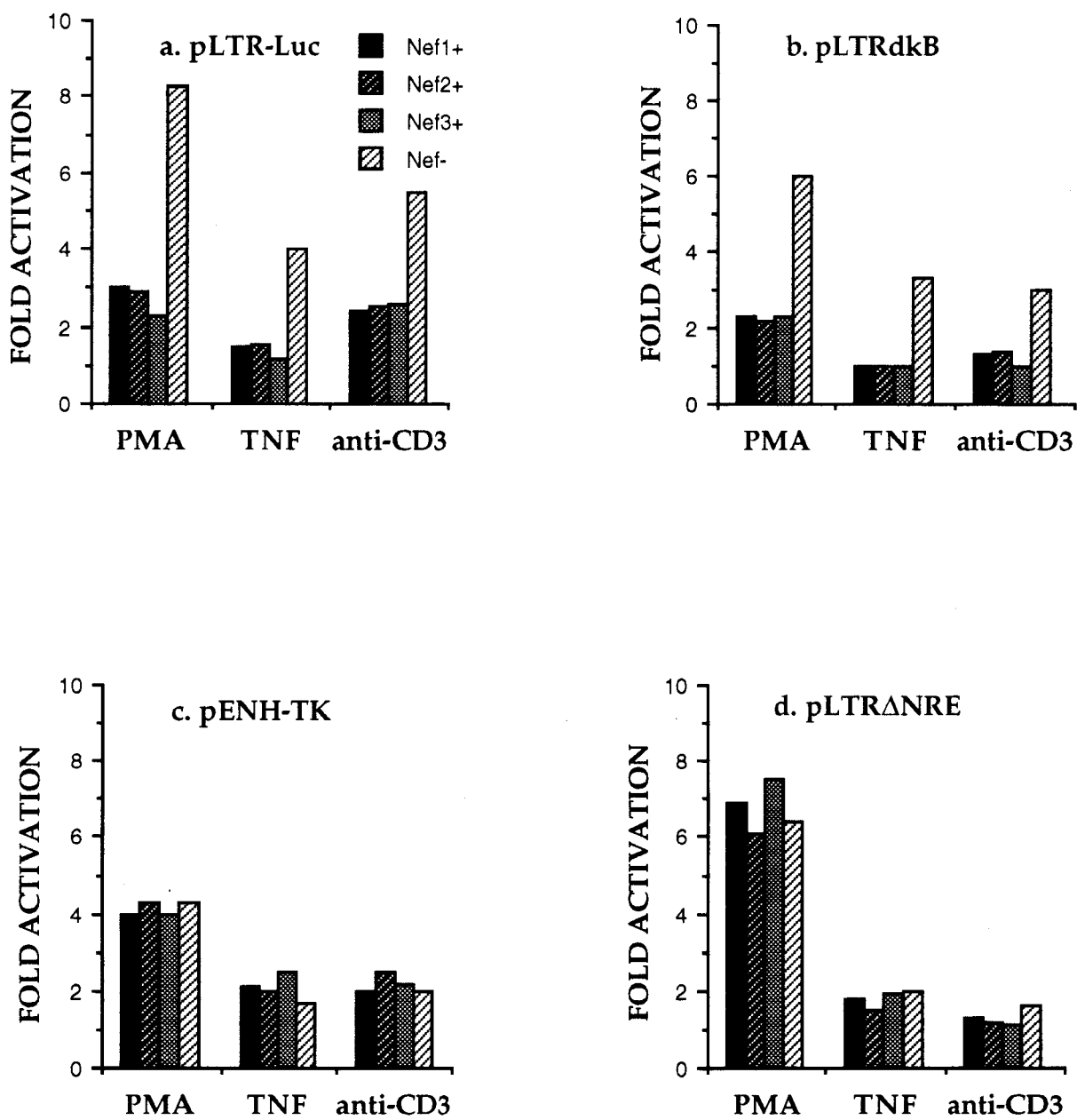


Fig. 2: Activation du LTR du VIH-1 en présence de Nef.

2. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

2.1. Introduction

Dans le but de mettre en évidence dans le contexte cellulaire l'activité GTP binding putative de Nef ainsi que la phosphorylation de la protéine en réponse à l'activation par la PKC, nous avons réalisé différents marquages métaboliques à l'aide de $^{32}\text{PO}_4$, $^{35}\text{Méthionine}$ ou $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -GTP. L'avantage de ces techniques est qu'elles permettent d'étudier les propriétés de Nef dans l'environnement cellulaire et d'éviter l'utilisation de protéine recombinante, jamais pure à 100%.

2.2. Matériels et méthodes

Pour l'étude de la phosphorylation de Nef, $5 \cdot 10^5$ cellules Nef⁺ Jurkat (lignée lymphocytaire exprimant Nef après transfection stable d'un vecteur correspondant) sont lavées deux fois dans du tampon Thyrode sans phosphates (MTB: NaCl 134mM; NaHCO₃ 12mM; KCL 2,9mM; MgCl₂ 1mM; glucose 5mM; Hepes 5mM; pH 7,4) et incubées dans ce tampon durant 1 heure à 37°C, 5%CO₂. Après lavage, les cellules sont incubées durant 30 minutes à 37°C dans le même tampon en présence de ^{32}P -acide orthoposphorique (NEN, 0.4mCi/mmol, 10 μl ^{32}P /ml de tampon). Le PMA (20 ng) est ensuite ajouté à différents temps et les cellules directement lysées en présence de tampon de lyse (1% NP40; 150mM NaCl; 10mM Tris-HCl; 1mM EDTA; 10 μl /ml d'aprotinin; 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride; 100 μM Sodium o-vanadate). Après lyse cellulaire, la protéine est immunoprécipitée à l'aide d'un polyclonal de lapin anti-Nef (protocole voir article 2). Pour chaque temps d'incubation avec le PMA (0, 2 et 5 minutes), un échantillon de protéines marquées est déposé sur gel d'acrylamide afin de vérifier la qualité du marquage et la phosphorylation en réponse au PMA. Les cellules Nef⁺ Jurkat marquées à la $^{35}\text{Méthionine}$ (marquage voir article 2) sont utilisées comme contrôle positif d'immunoprécipitation.

Pour tester l'activité GTP binding de Nef, les cellules Nef⁺Jurkat et la lignée NREJ-4 (contrôle positif de marquage, lignée NRK de rat transfectée de façon stable par un vecteur d'expression de l'oncogène EJ-Ha-ras-1, (Van Hille et al. 1989)) sont perméabilisées suivant la technique de Peter *et al.* et ensuite incubées en présence de α -³²P-GTP (Peter et al. 1992). La GTP binding protéine p21 ras est immunoprécipitée à l'aide de l'anticorps Y13-259 (Oncogène Science, Inc) et la protéine Nef est immunoprécipitée à l'aide du polyclonal de lapin anti-Nef (voir article 2).

2.3. Résultats

Aucune activité GTP binding ni de phosphorylation de Nef en présence et absence de PMA n'a été mise en évidence après marquage cellulaire et immunoprécipitation de Nef. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure que Nef soit phosphorylée *in vivo* en réponse à d'autres stimuli (Fig. 11).

- colonne 1: Nef⁺ Jurkat marquées à la ³⁵Méthionine. Nef est immunoprécipitée à l'aide du polyclonal de lapin anti-Nef.
- colonne 2: Nef⁻ Jurkat marquées à la ³⁵Méthionine.
- colonne 3: Nef⁺ Jurkat marquées au ³²PO₄. Temps d'incubation en présence de PMA: 0 min. Nef est immunoprécipitée à l'aide du polyclonal de lapin anti-Nef.
- colonne 4: Nef⁺ Jurkat marquées au ³²PO₄. Temps d'incubation en présence de PMA: 2 min.
- colonne 5: Nef⁺ Jurkat marquées au ³²PO₄. Temps d'incubation en présence de PMA: 5 min.
- colonne 6: la lignée NREJ-4 est marquée au α-³²P-GTP. La protéine p21 ras est immunoprécipitée avec l'anticorps Y13-259.
- colonne 7: Nef⁺ Jurkat marquées au α-³²P-GTP. Nef est immunoprécipitée à l'aide du polyclonal de lapin anti-Nef

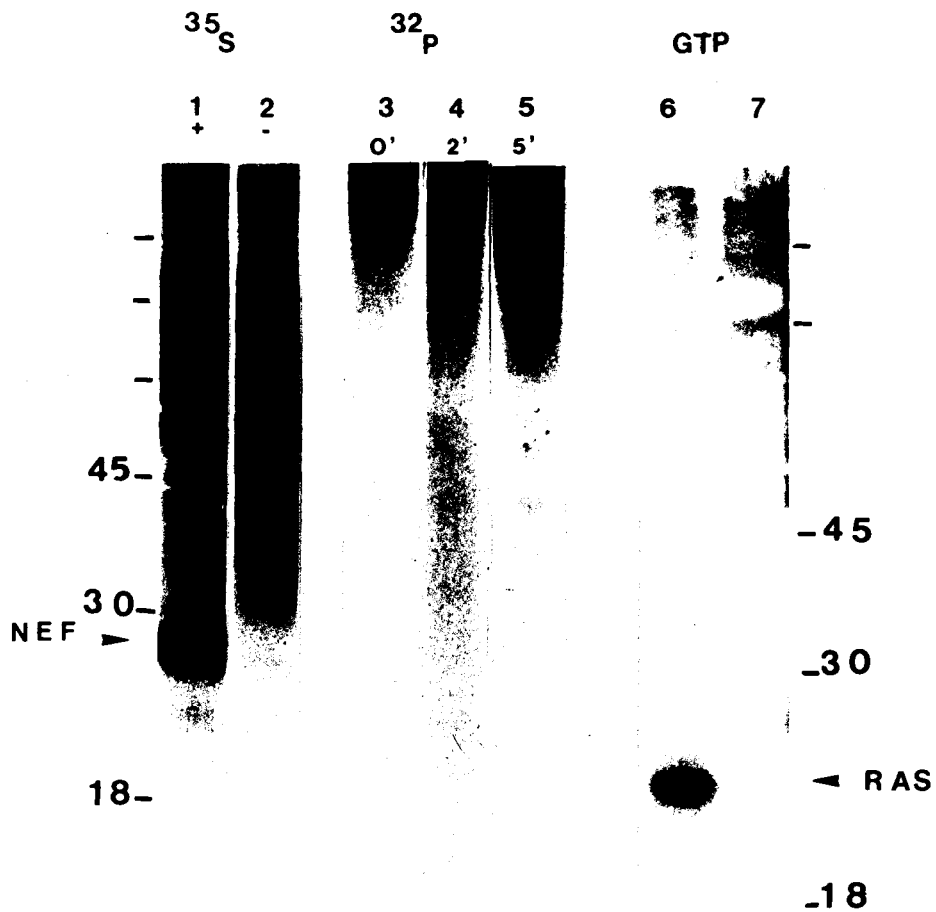


Fig. 11: marquages métaboliques des lignées Nef⁺ Jurkat et NREJ-4 au ³²PO₄, ³⁵Méthionine ou α-³²P-GTP

3. DISCUSSION

L'activation cellulaire est indispensable à l'intégration et à la réplication virale. De nombreux activateurs comme le PMA, l'IL1, l'IL6, le TNF α , les anticorps anti-TcR, CD3... augmentent l'expression du VIH. Selon Luria *et al.*, Nef aurait également la potentialité de modifier le fonctionnement normal des lymphocytes T en inhibant l'expression de l'IL2 (Luria et al. 1991). De plus, le nombre de lymphocytes infectés est particulièrement élevé au niveau des ganglions lymphatiques, siège de la réponse immune. Nous avons donc abordé l'étude du rôle de Nef dans la réponse de lymphocytes T CD4⁺ activés ainsi que son rôle dans la relation entre l'activation cellulaire et l'activation du LTR du VIH.

Nous avons montré que la translocation nucléaire des complexes AP1 et NF-kB en réponse au PMA, TNF α ou à l'activation CD3 dépendante n'est pas modifiée ainsi que la sécrétion d'IL2, TNF α et l'expression membranaire de l'IL2-R en réponse aux PMA, PMA/PHA ou aux anticorps CD3. L'expression basale du gène rapporteur luciférase sous le contrôle du LTR du VIH-1 n'est pas non plus modifiée par l'expression de Nef. Néanmoins suite à l'activation du LTR par les mêmes stimuli, une expression nettement plus faible du gène rapporteur est observée. L'utilisation de LTR délétés montre que cette inhibition n'est pas due à une modification de l'activité NF-kB binding et que la région contenant le domaine NRE est indispensable à l'inhibition de l'activation du LTR en réponse au PMA. Cette inhibition ne peut être expliquée par une activité GTP binding de Nef ou par la phosphorylation de Nef en réponse au PMA, deux caractéristiques imputées précédemment à Nef. En effet, l'utilisation de gènes Nef mutés codant pour une thréonine en position 15 (site potentiel de phosphorylation par la PKC) ou pour l'asparagine en position 187 (site important dans l'activité GTP binding) ne modifie pas l'ensemble des résultats obtenus. De plus, par marquage métabolique, nous avons montré que Nef n'est ni une GTP binding protéine et n'est ni phosphorylée en réponse à l'activation de la PKC.

Nos résultats ont depuis été confirmés par les travaux de Schwartz et *al.* mettant en évidence l'absence de modulation par Nef de l'expression de l'IL2 et du TNF α , de la prolifération lymphocytaire CD3 et IL2 dépendante et de la réponse allogénique (MLR). Ce groupe a utilisé des lymphocytes humains normaux transfectés par un vecteur d'expression de Nef rétroviral (même souche LAI). Les lymphocytes normaux constituent de plus, un modèle d'étude plus physiologique que les lignées tumorales (Schwartz et al. 1992).

L'activation du LTR et la translocation de AP1 et NF-kB n'avaient pas été abordées durant cette étude mais une réponse normale aux activateurs testés va de paire avec les translocations correctes de NF-kB et AP-1. Ceci n'exclut pas néanmoins que d'autres paramètres d'activation puissent être modifiés.

Parallèlement à ces travaux, Niederman et *al.*, ont montré l'inhibition par Nef de la translocation de NF-kB et de AP-1 en réponse au PMA dans une lignée Jurkat. Dans ce cas, l'expression de l'IL2 est également inhibée de même que l'activation du LTR du VIH-1 (Niederman et al. 1992; Niederman et al. 1993). Des différences de niveau d'expression de Nef dans une même lignée peuvent expliquer ces résultats. En effet, contrairement à Niederman *et al.*, nous avons utilisé dans notre étude une population polyclonale Jurkat Nef⁺ et non des clones. Une population polyclonale exprime Nef à des niveaux différents, allant de très faibles à très élevés, et est plus proche de la situation *in vivo*. De plus, cette démarche évite que l'effet de Nef mis en évidence ne soit le résultat d'une sélection clonale et non l'effet de la protéine elle-même.

Une homologie avec un site potentiel de phosphorylation par la PKC ainsi qu'une activité GTP binding de Nef ont été définies. L'activité GTP binding, probablement imputable à des protéines G bactériennes contaminantes, avait été fortement contestée par différents laboratoires. Aucune activité GTP binding ni de phosphorylation de Nef en réponse à l'activation par la PKC n'a été mise en évidence après marquages métaboliques. Les différents marquages métaboliques que nous avons utilisés évitent les problèmes de contaminations

inhérents à l'utilisation de protéine recombinante. Manifestement, ces deux activités ne sont pas pertinentes au niveau intracellulaire et ne modifient pas non plus l'inhibition de l'activation du LTR du VIH-1. De plus, selon Zazopoulos *et al.*, la mutation de ces deux sites ne modifie ni la stabilité de Nef, ni son effet sur la réplication virale (Zazopoulos et al. 1992).

En résumé, Nef inhibe l'activation du LTR par un mécanisme NF- κ B et AP-1 indépendant sans modifier la capacité des lymphocytes T à répondre aux stimuli étudiés. Dans la mesure où un grand nombre de lymphocytes T infectés sont situés dans les ganglions, il est possible que Nef contrôle le burst viral lors de l'activation lymphocytaire, évitant l'effet lytique du virus.

E. LES FORMES ACTIVEES DE L'OXYGENE ET L'INFECTION PAR LE VIH

1. INTRODUCTION

Parmis les dysfonctions du système immunitaire observées chez les sujets infectés, différentes anomalies au niveau du métabolisme du glutathion et de la production de formes activées de l'oxygène (FAO) ont été décrites. Les FAO ne sont pas uniquement importantes dans les mécanismes de défense non spécifique du système immunitaire vis-à-vis des agents pathogènes mais jouent également un rôle lors de l'activation lymphocytaire et la réplication virale.

Dans un premier temps, nous décrivons les différentes FAO, leurs origines ainsi que les mécanismes de contrôle. Ensuite, nous décrivons les dysfonctions en rapport avec le métabolisme oxydatif mises en évidence chez les individus infectés par le VIH et nous aborderons l'étude du rôle de Nef dans ces dysfonctions.

2. APERCU THEORIQUE

2.1. Définition des formes activées de l'oxygène

Les formes activées de l'oxygène incluent les peroxydes et les radicaux libres dont nous parlerons plus particulièrement, les complexes métalliques hypervalents et l'oxygène singulet.

composé	nom trivial	peroxyde (P) hydroperoxyde (H) · radical libre (R)	remarques
O ₂	oxygène	P-R (biradical)	peu réactif: requiert une activation.
O ₂ ^{·-}	anion superoxyde	P-R	radical réducteur (réduit le ferricytochrome C).
HO ₂ [·]	radical perhydroxyle	P-H-R	radical extrêmement oxydant: très faible durée de vie; initie les réactions en chaîne.
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène	P-H	produit à partir de O ₂ ^{·-} par dismutation ou directement à partir de O ₂ . Peroxydes non radicalaires: réactivité intrinsèque moyenne mais source de radicaux libres oxydants (OH [·]) en présence de fer.
ROOH	hydroperoxyde organique	P-H	peroxydes non radicalaires: réactivité intrinsèque moyenne mais source de radicaux libres oxydants (RO [·] , ROO [·]) en présence de fer.
ROOR	dialkyl peroxyde	P	peroxydes non radicalaires: réactivité intrinsèque moyenne mais source de radicaux libres oxydants (RO [·] , ROO [·]) en présence de fer.
ROO [·]	radical peroxyde	P-R	produit formellement à partir d'hydroperoxyde organique, ROOH, par soustraction d'hydrogène. Radical oxydant: durée de vie plus longue; propage les réactions en chaîne.
RO [·]	radical alkoxyde	R	radical extrêmement oxydant: très faible durée de vie; initie les réactions en chaîne.
OH [·]	radical hydroxyle	R	radical extrêmement oxydant: très faible durée de vie; initie les réactions en chaîne.

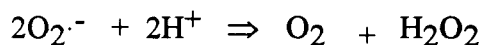
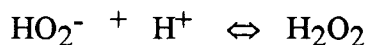
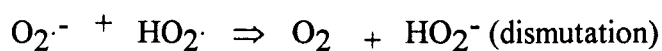
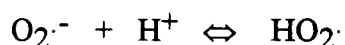
Tableau 7: les différentes formes activées de l'oxygène

Les radicaux libres sont des molécules ou des atomes qui possèdent un électron célibataire sur leur couche externe. En raison de leur tendance à rétablir la parité de leur nombre total d'électrons, ils sont très réactifs et de durée de vie très courte. Cette instabilité les rend difficiles à mettre en évidence.

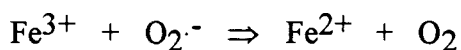
La plupart des molécules biologiques ne sont pas radicalaires et ne contiennent que des électrons appariés. Un radical libre peut donner son électron non apparié (radical réducteur) à une structure non radicalaire ou peut accepter un électron (radical oxydant) d'une autre molécule pour former une paire. Un radical libre peut également se joindre à une structure non radicalaire. Quelle que soit la réaction, la molécule non radicalaire est transformée au moins transitoirement en un radical libre. De ce fait les réactions des radicaux libres avec les structures non radicalaires (la plupart des molécules biologiques) déclenchent des réactions en chaîne (Halliwell 1992). A l'exception de l'anion superoxyde qui est un réducteur mono-électronique, la plupart des radicaux libres sont des oxydants mono-électroniques.

Le rôle central de l'oxygène dans la production de radicaux s'explique par le fait qu'il est à la fois source et cible de telles espèces. Moyennant un apport énergétique extérieur, l'oxygène peut, par acquisition d'un électron, appairer un de ses électrons libres et acquérir une charge négative. Cette activation réductrice de l'oxygène produit l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ (le signe - symbolise la charge électrique, et le point, l'existence d'un électron célibataire).

Cette réduction mono-électronique de l' O_2 est généralement d'origine enzymatique (xanthine-oxydase, NADPH-oxydase membranaire par exemple). L'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est considéré comme un facteur particulièrement délétère mais sa toxicité intrinsèque est très controversée. En milieux protonés, l'existence de $O_2^{\cdot-}$ est de courte durée, car la présence d'ions H^+ permet le phénomène de dismutation avec production de O_2 et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Chaudière 1993).

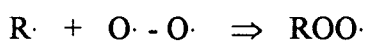


En revanche, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 subit en présence de fer ferreux Fe^{2+} une réaction de Fenton, au cours de laquelle il se décompose en radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$, espèce oxygénée extrêmement réactive, capable d'attaquer les structures organiques les plus stables. $\cdot\text{OH}$ est un puissant oxydant réagissant avec une multitude de molécules par capture d'un atome d'hydrogène $\text{H}\cdot$, ou par capture d'un électron.



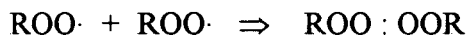
L'effet destructeur de $\text{O}_2\cdot^-$ s'exerce donc en partie de manière indirecte dans les milieux protonés. En absence de sels de fer (assez rare) ou encore en présence d'un chélateur inactivateur, H_2O_2 se décompose extrêmement lentement (Chaudiere 1993).

Les enzymes qui catalysent la réduction biologique de l'oxygène sont les oxydases. Les oxygénases enlèvent un atome d'hydrogène à certains composés organiques, rompant ainsi une liaison covalente et transformant les molécules peu réactives en radicaux libres prompts à réagir avec l'oxygène. Les radicaux libres centrés sur un atome de carbone ($\text{R}\cdot$) subissent une réaction d'addition à l'oxygène du milieu, qui est extrêmement rapide:

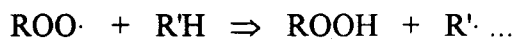


Le corrolaire de cette réaction centrale est double: d'une part l'oxygène n'est pas seulement la source, mais également la cible des radicaux libres; d'autre part, les "piégeurs de radicaux

libres" sont essentiellement des piègeurs de radicaux peroxyde en présence d'oxygène. Le radical peroxyde peut se recombiner, mais il se forme alors un pont tétrouxyde extrêmement instable:



qui se fragmente en libérant l'oxygène singulet, qui réagit très rapidement avec les structures organiques porteuses de double-liaisons. Le radical peroxyde arrache les hydrogènes dans le milieu où il apparaît, amorçant des chaînes de réactions radicalaires (Halliwell 1992).



En présence d'oxygène, nos cellules disposent donc d'une multitude de voies réactionnelles susceptibles de produire des espèces délétères telles que celles qui sont décrites dans les tableaux 7 et 8.

SOURCES OF SUPEROXIDE, HYDROPEROXIDES AND RELATED SPECIES

	$O_2^{\cdot-}$	H_2O_2	ROOH
PHYSIOLOGICAL SOURCES			
Autoxidation of mitochondrial electron carriers	H		
Superoxide dismutases (Cu/Zn-, Mn-)		H	
MonoAmine Oxidase (Cu-dependent)		L	
MonoAmine Oxidase (Flavin-dependent)		L	
Other Flavin dependent monooxygenases		L	
Cyt. P ₄₅₀ -dependent monooxygenases	L	M	
Lipoxygenases (non-heme Fe-dependent)			M
Cyclooxygenases			L
NADPH-Oxidase	VH		
Myeloperoxidase (heme-Fe)		(ClO ⁻)	
Peroxisomes		VH	H
ILL-CONTROLLED SOURCES			
Iron overload	M	H	H
Anoxia, ischemia	M	L	
hyperoxia	M	M	M
Xanthine oxidase induction	H	H	
Post-ischemic reperfusion	VH	VH	
Activated leukocytes	VH	H	
Redox cycling (Xenobiotics)	VH		
Radiations	EH		

L = Low; M = Moderate; H = High; VH = Very High; EH = Extremely High.

Tableau 8: Sources physiologiques et non physiologiques de superoxydes et hydroperoxydes dans les cellules de mammifères (Chaudière 1993).

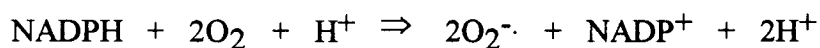
2.2. Origines des FAO

2.2.1. Les mitochondries

Au niveau des mitochondries, au cours de la respiration cellulaire, l'oxygène est réduit en eau par un processus d'oxydoréduction, avec fourniture d'énergie (ATP). Pour une faible part, cette réaction procède par étape d'un seul électron et il y a apparition de formes radicalaires. Normalement les radicaux libres produits par la réduction monovalente de l'oxygène au niveau de la chaîne respiratoire n'excèdent pas 5% et les radicaux formés sont captés par des piègeurs physiologiques (Badwey et al. 1980).

2.2.2. Activation de la NADPH oxydase

Les cellules phagocytaires possèdent, en plus d'un arsenal d'enzymes hydrolytiques, un système oxydasique membranaire, appelé NADPH-oxydase, producteur d'anions superoxydes. Le déclenchement de cette cascade de réactions est généralement dû à des processus immunologiques. L'activation cellulaire s'accompagne de l'activation de la protéine kinase C (PKC) et de la phosphorylation d'un des composants du système NADPH-oxydase. Ce complexe multiprotéique nécessite la sous-unité du cytochrome b₅₅₉ contenant du fer ainsi qu'une flavoprotéine pour transférer les électrons de NADPH sur l'oxygène (Bach et al. 1984; Britigan et al. 1988; Saran et al. 1989) (Fig. 13);



Le système NADPH-oxydase n'est pas limité aux seules cellules phagocytaires. Une forme moins active serait présente sur un grand nombre de types cellulaires et induirait un stress oxydatif (Meier et al. 1990; Schreck et al. 1991).

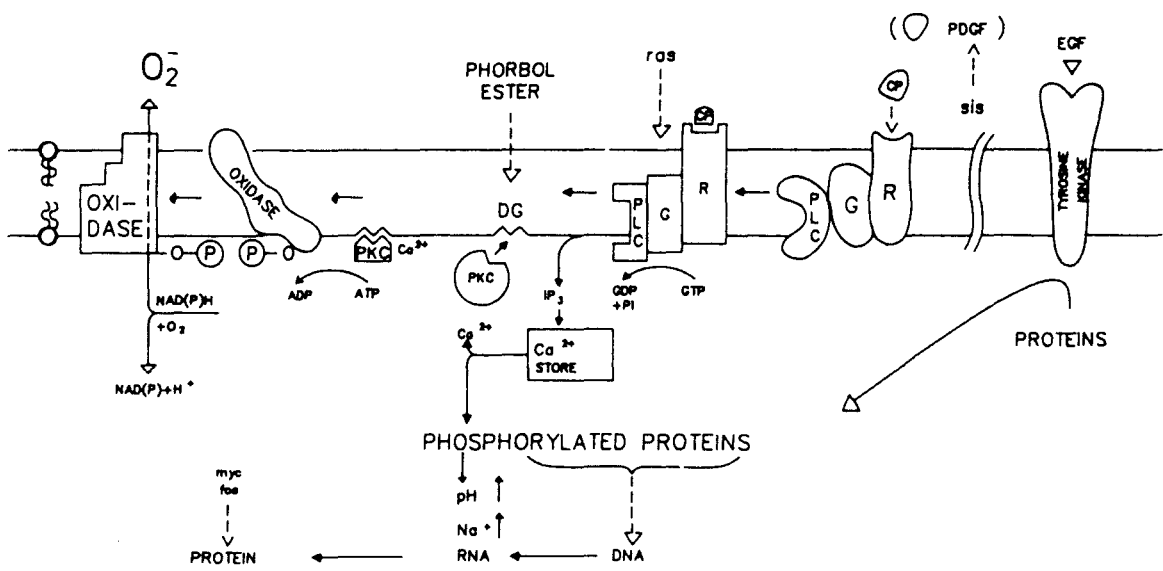


Fig. 13: modèle de production de superoxyde suite à l'activation de la NADPH oxydase par les neutrophiles (Saran et al. 1989)

2.2.4. Formation des formes radicalaires oxygénées par voie exogène

Les radicaux libres peuvent apparaître sous l'action des radiations ionisantes et de la lumière U.V.. Des molécules exogènes comme le chloroforme, l'éthanol, certains médicaments anti-tumoraux induisent eux aussi la formation de radicaux libres (Ferradini et al. 1983).

L'anion superoxyde, H_2O_2 et ROOH sont maintenus dans les compartiments intra- et extra-cellulaires des organismes à des concentrations bien précises par de puissants systèmes de régulation. Des situations de dérégulations induisent un stress oxydatif qui peut aboutir à la mort cellulaire (Chaudiere 1993).

2.3. Mécanismes de protection cellulaire



On appelle antioxydants, ou encore piègeurs de radicaux libres, les substances capables de capter et de neutraliser de manière durable les radicaux libres et les diverses formes activées de l'oxygène. Plus que des molécules, ce sont souvent des chaînes de réactions ou de systèmes antioxydants destinés à régénérer leurs différents composés. On peut les classer en trois groupes selon leur activité:

- les systèmes enzymatiques spécifiques (superoxyde dismutase, catalase,...),
- les piègeurs de radicaux libres qui interviennent soit aux stades d'initiation des cycles de peroxydation soit au stade de propagation (α tocophérol...),
- les piègeurs d'oxygène singulet.

L'activité des antioxydants dépend de leur solubilité préférentielle en milieu aqueux ou lipidique.

Le "stress oxydatif" est associé à une rupture de l'équilibre pro-oxydants/oxydants en faveur des pro-oxydants (Sies 1992).

2.3.1. Les superoxydes dismutases (SOD)

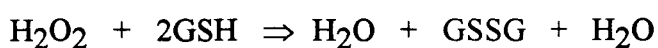
Ce sont des métallo-enzymes. On distingue la CuZnSOD localisée dans le cytosol et les mitochondries des eucaryotes et la MnSOD, exclusivement mitochondriale. Ces enzymes catalysent la dismutation de l'ion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène. La localisation des SOD explique que les membranes externes et les espaces interstitiels soient moins bien protégés que les structures intracellulaires. Les SOD sont utilisées en thérapeutique dans les maladies inflammatoires (Deby et al. 1990).

2.3.2. La catalase

Confinée dans les peroxysomes, cette enzyme transforme par dismutation l'eau oxygénée en eau et en oxygène et empêche le peroxyde d'hydrogène de participer à la réaction de Fenton (Hill et al. 1984; Liebler et al. 1986).

2.3.3. Les glutathion peroxydases et réductases

Les glutathion peroxydases sont des enzymes à sélénium, dont la mieux connue est l'enzyme cytosolique qui réduit les hydroperoxydes (notamment les hydroperoxydes lipidiques) et en particulier H₂O₂ en présence de glutathion (GSH) (Hill et al. 1984; Liebler et al. 1986):



Cette réduction est couplée à l'oxydation du glutathion, elle même couplée à la glutathion-réductase en présence de NADPH. La réaction régénératrice de GSH, catalysée par la GSSG réductase, peut devenir un élément central dans la défense antioxydante. Ainsi l'apport d'équivalents réducteurs de NADPH à cette enzyme est essentiel (Hill et al. 1987; Avissar et al. 1989). En ce qui concerne la dégradation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , il faut souligner que les rôles respectifs des glutathion peroxydases et de la catalase restent à préciser dans les cellules lymphocytaires.

2.3.4. La vitamine E

La vitamine E (tocophérols) inhibe la peroxydation membranaire et empêche ainsi la propagation des radicaux oxygénés lipidiques.

2.3.5. Les groupements thiols

Les thiols (SH) sont essentiels dans la protection contre les effets délétères des dérivés réactifs de l'oxygène. Le tripeptide glutathion (γ -Glu-Cys-Gly) (GSH), thiol principal, participe à de nombreuses réactions décrites plus haut (GSH peroxydases et réductases, GSH transférases...).

L'état d'oxydation des résidus cystéine (thiol ou disulfure) régule l'activité de nombreuses protéines. Le maintien de la forme réduite des groupements thiols des protéines requiert des concentrations variables en glutathion. Le rapport thiols/disulfures joue également un rôle clé lors de l'activation et de la prolifération lymphocytaire (Carson et al. 1986; Fidelus et al. 1986; Dornand et al. 1989). La formation de ponts disulfures et les réarrangements au niveau des protéines sont des réactions d'échange réversibles, thermodynamiquement et/ou cinétiquement sous la dépendance du glutathion et de son métabolisme. Une concentration optimale en thiols

et en disulfures est également indispensable à la formation de la structure tertiaire correcte et rapide des protéines. Le rendement maximal de formation de la structure tertiaire des protéines et de renaturation se situe en général à des ratios de glutathion réduit (GSH) / glutathion disulfure (GSSG) inférieurs à 10 à une concentration physiologique du glutathion total (1 à 10 mM). Ces conditions assez oxydantes sont normalement celles du réticulum endoplasmique. La modification de l'état redox des facteurs de transcription ISGF3, NF- κ B et AP-1 modifie leur activité de fixation au DNA (Xanthoudakis et al. 1992; Meyer et al. 1993). L'interaction des protéines comme NF- κ B et le complexe Fos/Jun avec le DNA est également augmentée *in vitro* en présence de dithiothreitol (DTT) (Meyer et al. 1993).

Tableau 9: Défense antioxydante dans les systèmes biologiques (Sies 1992)

Système	Remarques
Enzymatiques	
superoxydes dismutases	enzymes à CuZn, enzymes à Mn.
GSH peroxydases	sélénoenzymes; non-Se enzymes; certaines GSH S-transférases.
catalase	enzyme contenant un groupement hème; surtout dans la matrice peroxysomale.
Enzymes accessoires	
quinone oxydoréductase NADPH-dépendante, epoxyde hydrolase, enzymes de conjugaison	
GSSG réductase	
approvisionnement en NADPH	
système de transport	exportation du GSSG, exportation des conjugués.
Non-enzymatiques	
α -tocophérol (vitamine E)	lié à la membrane, récepteurs. Scavengers des radicaux peroxydes hydrophobes
ascorbate (vitamine C)	hydrophile.
glutathion (GSH)	hydrophile.
flavonoïdes	antioxydants végétaux.
chimiques	additifs alimentaires.
β -carotène	inhibiteur d'oxygène singulet.
urate	inhibiteur d'oxygène singulet.

2.4. ROLES DES FAO

2.4.1. Défense non spécifique

Si la production de FAO est un danger pour la cellule, elle est également une arme de défense utilisée par les macrophages et les polynucléaires neutrophiles lors de l'élimination des micro-organismes, des macromolécules étrangères et des cellules en décomposition au niveau des tissus nécrotiques. L'activation de la NADPH oxydase est engendrée par des bactéries, des microcristaux, des fractions du complément, des agrégats d'immunoglobulines et peut être induite expérimentalement par des particules exogènes (latex, zymosan...) ou par des activateurs comme le PMA. Une élévation spectaculaire du métabolisme avec une brusque montée de la consommation en oxygène, ou poussées respiratoire (PR) correspondant à une activation de la NADPH-oxydase membranaire. La production de superoxyde est mesurée indirectement par chimiluminescence.

Les FAO produites lors de la PR vont s'attaquer à trois grandes cibles cellulaires (Thérond 1988):

- 1°) les phospholipides des membranes contenant des acides gras polyinsaturés. Leurs doubles liaisons sont particulièrement vulnérables aux radicaux libres;
- 2°) les protéines à groupement thiol. Il s'ensuit une perturbation majeure des réactions biochimiques contrôlées par ces enzymes;
- 3°) les acides nucléiques au niveau des chromosomes. La dénaturation de l'ADN entraînant des cassures chromosomiques avec de graves conséquences sur la réplication du message génétique et sur la multiplication.

2.4.2. Dans l'activation cellulaire

Les FAO ne sont donc pas seulement des produits secondaires indésirables des réactions de transferts d'électrons, mais sont également les produits de systèmes enzymatiques ubiquitaires spécialisés durant l'évolution dans la production de peroxydes et/ou de radicaux libres. En modifiant l'environnement réducteur de la cellule, ils seraient impliqués dans l'activation de gènes cellulaires. Les cellules possèdent un système de contrôle des FAO extrêmement fin et ces intermédiaires réactifs sont présents dans tous les types cellulaires. La concentration en FAO peut être élevée soit en inhibant les mécanismes responsables de l'élimination des FAO ou encore, en activant les systèmes enzymatiques responsables de leur production. Les FAO agiraient ainsi comme des messagers secondaires (Schreck et al. 1991).

- 1°) l'addition de 30 μM d' H_2O_2 active l'expression du VIH dans des Jurkat infectées (Schreck et al. 1991).
- 2°) l'activation par le PMA et le $\text{TNF}\alpha$ induit une déplétion rapide du glutathion cellulaire (Staal et al. 1990),
- 3°) l'addition de thiols comme le N-acetyl-l-cystéine (NAC) ou le glutathion inhibe l'activation de NF-kB par le PMA et le $\text{TNF}\alpha$ ainsi que l'activation du LTR du VIH par NF-kB (Roederer et al. 1990; Kalebic et al. 1991; Staal et al. 1993),
- 4°) une surexpression de la SOD inhibe également l'activation de NF-kB (Wong et al. 1989).

Néanmoins, il n'est pas encore clairement établi si l'effet inhibiteur des piègeurs de radicaux libres est dû au fait que les FAO agissent comme messagers secondaires et sont induites suite à une activation cellulaire ou si l'effet inhibiteur des piègeurs est le résultat d'un état réfractaire induit par un équilibre redox inapproprié. Cet état redox est sous le contrôle de systèmes antioxydants cytoplasmiques et membranaires. Israël et al. ont montré que l'activation du promoteur du VIH par le PMA et le $\text{TNF}\alpha$ est inhibée par la BHA (butylated

hydroxyanisole), l'acide nordihydroguaiaretique (NDGA) ou l' α -tocophérol (vitamine E) (inhibiteurs de la propagation des radicaux libres au niveau des acides gras insaturés et donc inhibiteurs de la peroxydation lipidique membranaire). L'addition de BHA se traduit au niveau de la cellule par une augmentation des thiols totaux (mais pas du glutathion) et une inhibition de l'activation du LTR du VIH-1 par le PMA et le TNF α . Il s'ensuit que l'activation par le TNF et le PMA est possible uniquement lorsque l'équilibre tend vers l'oxydation. En conclusion, les FAO n'agiraient pas directement en activant NF-kB. L'état redox cellulaire modulerait plutôt l'efficacité de l'activation cellulaire NF-kB dépendante (Israël et al. 1992).

2.4.3. Messagers extracellulaires

Il est actuellement démontré que, mis à part les phagocytes et neutrophiles, d'autres cellules ont la capacité de produire des FAO dans le milieu extra-cellulaire et que celles-ci ne sont pas uniquement impliquées dans les processus d'inflammation et de nombreuses situations pathologiques mais activent la prolifération des fibroblastes, ou encore joueraient un rôle dans le processus de transformation (Saran et al. 1989; Hancock et al. 1990).

Différentes études ont mis en évidence l'importance des FAO dans l'initiation de la réponse antigène spécifique et la réplication virale ainsi que la prolifération. L'addition de peroxyde d'hydrogène dans le milieu de culture induit la translocation nucléaire de NF-kB et l'activation du LTR du VIH (Schreck et al. 1991; Dröge et al. 1992) et augmente l'activation T ainsi que la production de TCGF ("*T-cell growth Factor*") (Roth et al. 1987).

3. ROLE DES FAO DANS L'IMMUNOPATHOLOGIE INDUITE PAR LE VIH

3.1. Poussée respiratoire des phagocytes et infection par le VIH

L'inhibition de la poussée respiratoire des phagocytes mononucléés a été mis en évidence chez des patients infectés par le VIH et ceci dès la phase asymptomatique de la maladie. Une certaine variabilité au niveau des résultats obtenus peut être expliquée par une hétérogénéité au niveau des populations étudiées, ou par des différences dans les systèmes de mesure de la poussée respiratoire ou encore par différences dans les stimuli utilisés (Spear et al. 1990; Müller 1992).

L'inhibition de la PR observée chez les individus séropositifs peut avoir plusieurs origines:

- 1°) Il a été montré que l'infection directe des monocytes par le VIH induit une diminution de la PR. Un peptide synthétique homologue à une séquence de la gp120 inhibe le PR de monocytes *in vitro* (Harrell et al. 1986; Re et al. 1991; Müller 1992);
- 2°) Des anomalies de développement et de maturation des cellules précurseurs de la moelle osseuse pourraient aboutir à des déficiences fonctionnelles. En effet, il a été montré que non seulement ces cellules souches sont infectables par le VIH *in vitro* et *in vivo*, mais également que l'infection interfère avec la croissance de ces cellules (rôle de la gp120) et modifie la sécrétion de TNF α et de TGF- β (Re et al. 1991).

L'activité anti-microbienne des phagocytes repose en partie sur la génération de superoxyde, de peroxyde d'hydrogène et d'hydrochlorite lors de la poussée respiratoire. Une réduction de cette fonction prédispose les individus en phase SIDA aux différentes infections observées.

3.2. Niveau en glutathion chez les individus infectés

Différents travaux ont mis en évidence un taux de glutathion nettement plus faible dans les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺, dans le plasma et dans le fluide épithélial pulmonaire chez les sujets asymptomatiques tandis que le niveau intracellulaire des monocytes n'est pas modifié (Buhl et al. 1989; Eck et al. 1989; Staal et al. 1990; Müller 1992; Staal et al. 1992). Lorsque des singes macaques sont infectés par le SIV, le taux de thiols dans le plasma chute après une semaine d'infection (Eck et al. 1991).

Des taux sériques plus faibles en cystéine et méthionine et plus élevé en glutamate ont également été décrits chez les patients à tous les stades de l'infection. Gmünder *et al.* ont montré que la concentration interne en cystéine et en glutathion de lymphocytes murins est fortement influencée par le relargage en cystéine des macrophages voisins (Gmünder et al. 1990). Une augmentation du glutamate extracellulaire telle que celle mise en évidence chez les sujets infectés, interfère avec le transport membranaire de la cystéine ce qui a pour conséquence des concentrations intracellulaires plus faibles en cystéine et en glutathion dans les lymphocytes T (Gmünder et al. 1990; Dröge et al. 1992).

Certaines fonctions lymphocytaires sont favorisées par les FAO et inhibées par la cystéine et ses dérivés tandis que d'autres sont favorisées par une concentration extra-cellulaire élevée en cystéine et un taux en glutathion intra-cellulaire élevé. En effet, la déplétion en glutathion lymphocytaire inhibe la formation de blastes, la production d'IL2 ainsi que la prolifération T (Carson et al. 1986; Fidelus et al. 1986; Dornand et al. 1989) tandis que l'effet de la cystéine sur l'activation de NF-kB suggère qu'une déficience en cystéine pourrait aboutir à une activation de certains gènes inductibles par NF-kB (dont les gènes viraux). L'addition de ferricyanide (inhibiteur de la production d'anions superoxyde), de butyl hydroxyanisole (piégeur de radicaux) ou d'un chélateur inactiveur (bloquant la formation de radical hydroxyl) inhibent l'expression du récepteur de l'IL2 et de la transferrine de lymphocytes T en réponse

au PMA et à l'ionomycine (Chaudhri et al. 1988; Dröge et al. 1992). Des concentrations anormalement élevées en $\text{TNF}\alpha$, des produits de clivage de l' $\text{IL2-R}\alpha$ et de la $\beta 2$ -microglobuline ont été mis en évidence chez les individus infectés à tous les stades de l'infection (Dröge et al. 1992).

En résumé, il est probable qu'une diminution de la concentration interne en glutathion contribue aux dysfonctionnements du système immunitaire mis en évidence chez les sujets infectés et ce, déjà à un stade précoce de l'infection. La déficience en cystéine peut également expliquer la production plus élevée en malondialdéhyde chez les sujets infectés, indicateur important de dommages oxydatifs.

4. LE ROLE DE NEF DANS LE METABOLISME OXYDATIF

4.1. Résultats et discussion

4.1.1. Mesure de la poussée respiratoire en présence de Nef

Nous avons utilisé des lymphocytes B transformés par EBV (B-EBV). En effet, ces cellules sont facilement transfectables, et produisent des anions superoxyde suite à l'activation du système NADPH oxydase (poussée respiratoire) (Hancock et al. 1990; Leca et al. 1991). De plus, ces cellules peuvent également servir à l'étude de la présentation antigénique.

Afin d'étudier le rôle de Nef dans la poussée respiratoire (PR), les B-EBV sont transfectés par un vecteur d'expression de Nef (B-EBV-Nef⁺) ou par un vecteur exprimant le gène de résistance à la néomycine (B-EBV-Nef⁻) (voir matériels et méthodes (M&M, chap. 4.2).

Suite à l'activation de la PKC par le PMA, ces B-EBV produisent des radicaux libres. La production d' $\text{O}_2\cdot^-$, mesurée par chimiluminescence, est néanmoins plus faible que celle des

monocytes mais est prolongée et atteint un pic environ 30 minutes après l'addition du PMA (Leca et al. 1991). La PR est inhibée à 85% suite à l'addition de SOD (0,33mg/ml final) et indique que la production de FAO mesurée à l'aide du système lucigénine est bien limitée aux anions superoxydes. Une inhibition complète de la PR est observée lorsque les B-EBV expriment la protéine Nef (B-EBV-Nef⁺) après transfection stable du plasmide d'expression correspondant (Fig. 14).

Nous avons précédemment montré que Nef était sécrétée par les B-EBV-Nef⁺ (article 1). Afin de montrer si cette inhibition est induite indirectement par la présence de Nef extracellulaire, nous avons incubé des B-EBV-Nef⁺ en présence de surnageant de culture de B-EBV-Nef⁺ contenant Nef durant 30 minutes, 2 ou 4 heures à 37° (surnageant de culture filtré sur filtre de 0,22 µ).

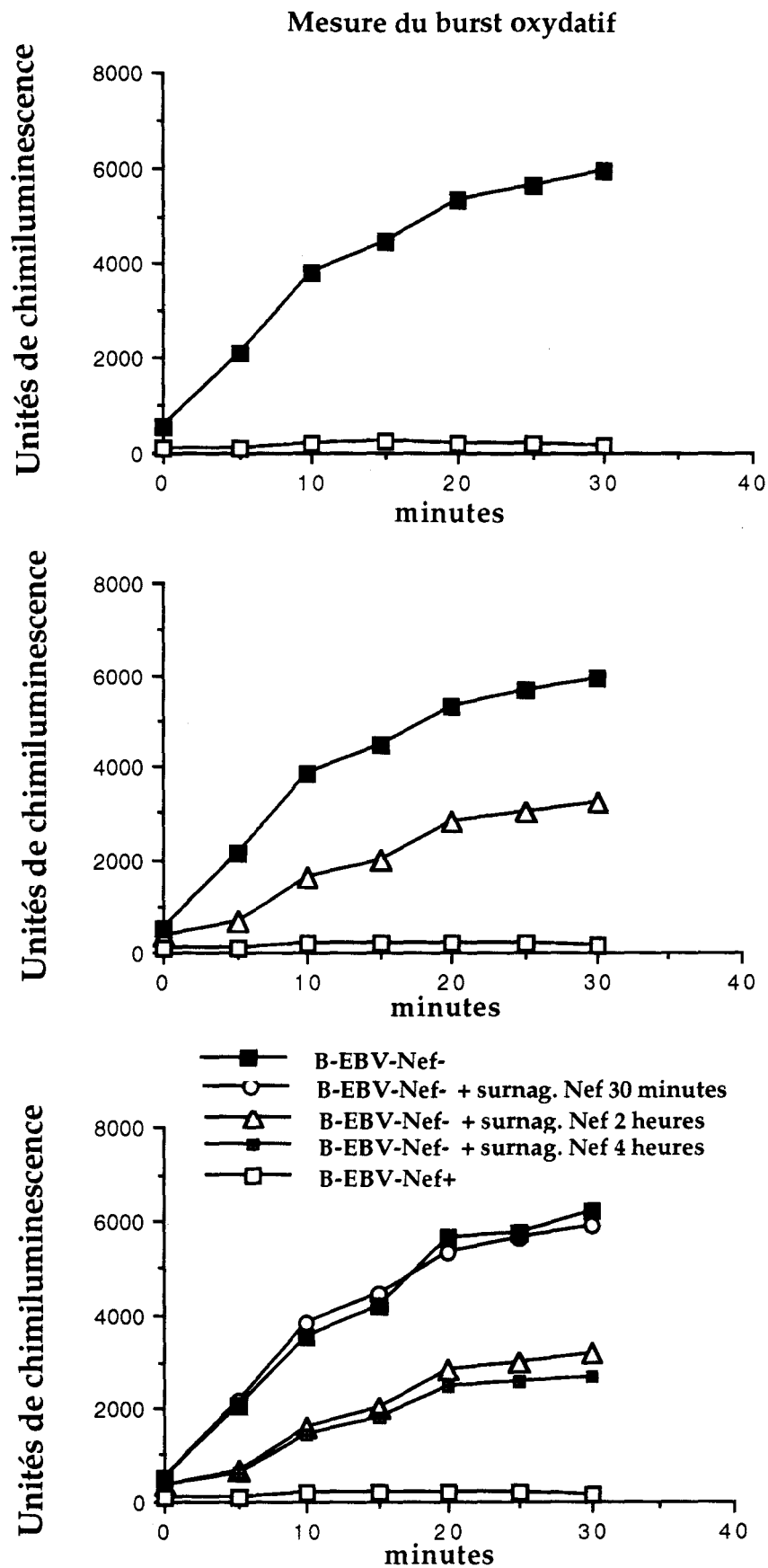


Fig 14: Mesure de la poussée respiratoire de lymphocytes B transformés par EBV en présence et absence de Nef.

Aucune inhibition n'est observée après 30 minutes mais bien après 2 et 4 heures en présence de surnageant contenant Nef (inhibition nécessitant une synthèse protéique) mais n'est pas totale (environ 50%) (Fig. 15). Il est probable que la protéine Nef se dégrade progressivement dans le milieu de culture avec pour conséquence une perte d'activité ou présente un effet direct (inhibition due à la synthèse endogène) ainsi qu'un effet indirect (inhibition due à la présence de la protéine dans le milieu de culture) expliquant l'inhibition de 50%. L'addition d'un inhibiteur de l'endocytose, la chloroquine (10 μ M) a pour effet d'inhiber la poussée respiratoire des B-EBV-Nef⁺ mais également des B-EBV-Nef⁻.

Aucune inhibition n'est enregistrée suite à l'addition de protéine recombinante (produite à partir d'*E.coli*, pure à 95% (doses de 1 à 20 μ g/ml, Transgène, France) durant les mêmes temps.

L'inhibition de la PR peut avoir plusieurs origines:

- un rapport NADPH / NADP⁺ non optimal ne permettant pas au complexe enzymatique de la NADPH oxydase de fonctionner correctement;
- il est possible que Nef agisse comme piègeur des FAO (activité scavenger);
- une modification des voies d'activation cellulaire de la NADPH oxydase;
- une concentration en NADPH oxydase plus faible;

Par immunofluorescence, nous avons montré que le rapport NADPH / NADP⁺ n'est pas modifié par l'expression de Nef. Nef ne présente pas non plus d'activité piègeur des anions superoxydes, mesurée par l'inhibition de la production d'O₂⁻ dans le système lucigénine - xanthine oxydase-xanthine. Par la suite, il serait intéressant d'étudier la modulation éventuelle par Nef de la cascade d'activation de la NADPH oxydase en stimulant les cellules avec des activateurs agissant à des niveaux différents sur la voie d'activation de la NADPH oxydase (ionomycine, mesure de la translocation et de l'activité PKC...) et de mesurer la NADPH oxydase.

4.1.2. Dosage des groupements thiols en présence de Nef

La quantité de groupements thiols totaux, mesurée par la liaison covalente et stoechiométrique de la N-ethylmaleimide -¹⁴C aux groupements thiols est plus faible tandis que la concentration en glutathion est identique en présence ou en absence d'expression de Nef. De même, lorsque les lymphocytes B-EBV-Nef⁺ sont incubés en présence de Nef (surnageant de culture contenant la protéine) durant 4 heures, un taux plus faible en thiols est mesuré. La mesure de l'activité enzymatique de la SOD est quant à elle, plus faible lorsque les B-EBV expriment Nef (tableau 10).

Tableau 10: Mesure des thiols

	Thiols totaux (cpm / 10 ⁶ cellules)	glutath. (ng / 10 ⁶ cellules)	SOD (U/10 ⁶ cellules)
B-EBV	21.595	690	4,4
B-EBV-Nef	11.850	752	1,6
B-EBV + surnag. Nef (4 heures)	12.028	-	-

Les résultats présentés sont issus d'une expérience représentative sur quatre.

La signification précise des taux plus faibles en thiols et SOD est assez difficile à définir. Bien que le glutathion constitue le thiol principal, d'autres systèmes réducteurs existent comme la thioredoxine et la glutarexdoxine et peuvent jouer un rôle important dans le maintien de l'équilibre redox cellulaire (Gilbert 1989). De plus, une modification du rapport thiols/disulfures constitue un signal métabolique modulant l'activité biologique des protéines cibles. Il serait intéressant d'établir un profil précis des différents thiols en présence ou absence de Nef afin d'avoir une idée plus précise de la modification de l'équilibre redox.

4.1.3. Mesure de l'activation du LTR et de la prolifération lymphocytaire en présence de Nef

L'ensemble de ces résultats montrent que l'expression de Nef modifie la concentration en groupements thiols. Néanmoins, ni la fonction présentatrice antigénique des cellules B-EBV ni la MLR ("*Mixed Lymphocytes Reaction*") ne sont modifiées lorsque Nef est exprimée par les cellules présentatrices (tableau 11 et 12, une expérience représentative sur trois). De même, aucune modification de l'expression de la luciférase sous le contrôle du LTR de VIH-1 n'est observée après transfection transitoire des plasmides d'expression correspondants indiquant une activation normale de NF- κ B. L'activité luciférase mesurée dans les lysats cellulaires est identique, que Nef soit exprimée ou non. L'expression de la luciférase étant déjà fortement élevée en l'absence de stimulus, l'activation du LTR par le PMA est très faible, en présence ou absence de Nef. L'expression de la luciférase sous le contrôle des promoteurs Enh-TK (3 fois la séquence consensus kB en amont du promoteur de la TK) n'est pas modifiée par la présence de Nef et cette expression est faiblement augmentée en présence de PMA (Fig.15). Ce système ne permet donc pas d'étudier l'impact de nos observations sur l'activation du LTR.

Tableau 11: présentation antigénique (prolifération mesurée en cpm)

	T	EBV	T+EBV+ TT	T+EBV+ SEB	T+EBV+ anti-CD3
B-EBV- Nef+	-	-	8.041	10.921	7.512
B-EBV- Nef-	-	-	8.575	9.242	6.912

tableau 12: mesure de la MLR (prolifération mesurée en cpm)

	T	EBV	T+EBV	T+EBV+ PHA	T+EBV+ SEB	T+EBV+ PWM
B- EBV- Nef+	-	-	19.693	61.290	71.039	51.342
B- EBV- Nef-	-	-	15.410	71.016	70.620	44.782

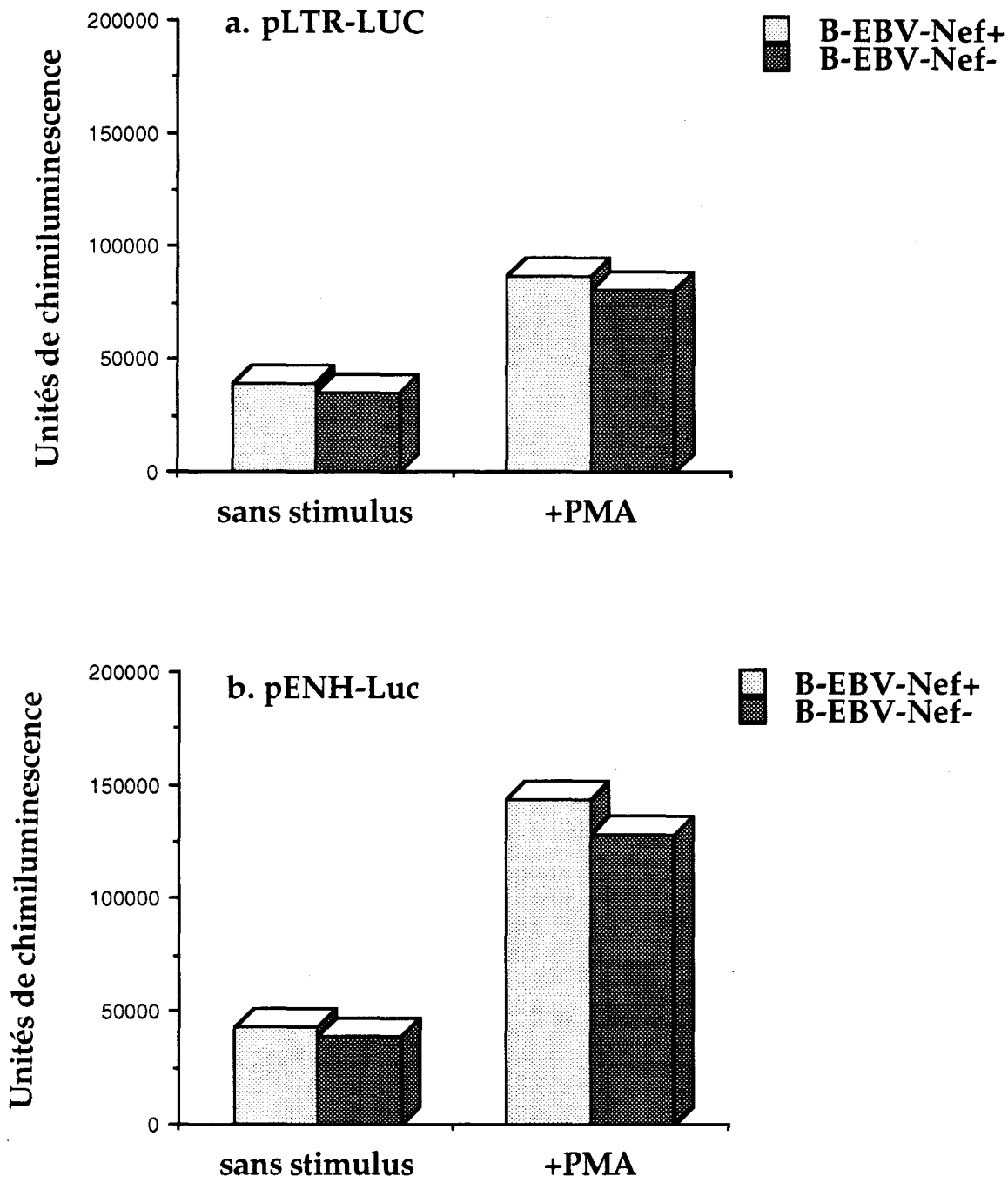


Fig. 15: Mesure de l'activation du LTR du VIH-1

La modulation du métabolisme oxydatif par des protéines virales n'est pas un cas sans précédent en immunologie. Les lymphocytes T infectés par le rétrovirus HTLV-I (agent étiologique de la leucémie T adulte, ATL) produisent un facteur capable d'induire l'expression de l'IL2R dans la lignée cellulaire YT (hLGL: human large granular lymphocytes). Après purification et clonage, il apparut que ce facteur (ADF: ATL-derived factor) était en fait un analogue humain du enzyme bactérien thioredoxine (Yodoi et al. 1992).

Ces deux molécules présentent une activité piègeur et sont capables de cataboliser H₂O₂. Il a été montré récemment, que l'ADF synergise la réponse des lymphocytes aux interleukines IL1 et IL2 permettant aux lymphocytes infectés de répondre à une quantité suboptimale de facteurs de croissance. De plus, elles protégeraient les cellules vis-à-vis de la cytotoxicité de H₂O₂ et du TNF (Yodoi et al. 1992). Bien que Nef ne présente pas d'activité piègeur, nos observations soulèvent une hypothèse de travail intéressante: le rôle de Nef en tant que molécule de signalisation circulante dans l'organisme et capable de moduler les paramètres de signalisation de cellules voisines. Néanmoins, les conséquences précises de la modulation de la PR ainsi que de la variation de la concentration en thiols dans le contexte immunologique restent encore à définir.

4.2. Matériels et méthodes

4.2.1. Culture cellulaire et transfection

Les lymphocytes sont isolés à partir du sang périphérique d'individu sain et transformés par le virus EBV (voir article 1). Les cellules (B-EBV) sont cultivées dans du RPMI en présence de 20% de SVF, 1mM de glutamine, 1mM de pyruvate de sodium et 80µM de gentamicine. Les cellules sont transfectées par électroporation avec un vecteur d'expression de Nef sous le contrôle du promoteur CMV (voir article 1). Les cellules transfectées sont maintenues en présence de G418 et l'expression de Nef mise en évidence par immunoprécipitation. Les

clones positifs sont regroupés afin de minimiser la variabilité cellulaire (B-EBV-Nef⁺). Un travail identique est réalisé avec le vecteur CMV-Neo et les cellules résistantes au G418 sont regroupées (B-EBV-Nef⁻) et utilisées comme témoin négatif (voir article 1).

4.2.2. Marqueurs phénotypiques

<i>Tableau 13: <u>marqueurs phénotypiques de B-EBV</u></i>					
	CD19	CD10	CD23	CD39	CD4
B-EBV-Nef ⁺	97%	2%	76,7%	98,5 %	5%
B-EBV-Nef ⁻	95%	4%	70,93%	99%	5%

Les anticorps correspondants marqués à la fluoresceine ont été obtenus chez Immunotech et l'immunofluorescence mesurée par FACS est exprimée en pourcentage de cellules positives.

4.2.3. Mesure de la poussée respiratoire

10⁶ cellules (dans 200µl de Hank's Wallace (HW)) sont incubées en présence de 25µl d'une solution de lucigénine (bis-N-méthylacridinium) (100 µM final, en HW) et 25µl de PMA (25 ng/ml final en HW). La production d'anions superoxydes en réponse à l'activation par le PMA (poussée respiratoire) est mise en évidence durant 30 minutes à 37° par chimiluminescence (CL) à l'aide d'un chimioluminomètre de type Bio-Orbit, 1251 Luminometer. La CL résulte de l'émission d'énergie sous forme de lumière à partir de réactions chimiques, l'émission de photons étant due au retour des composés électroniquement instables à leur état fondamental.

4.2.4. Mesure de l'activité piégeur de $O_2^{\cdot-}$ de Nef

Réactifs:

Xanthine: 1,8 mg dans 20 ml Hanks Hepes pH 7,8 (HH). Faire bouillir 2 minutes. Diluer au 1/20 pour le dosage dans du HH.

Lucigénine: 1,15 mg dans 10 ml de HH.

Lucigénine - xanthine oxydase: 4 ml de lucigénine + 5,5 μ l de xanthine -oxydase grade III.

Dosage:

- 200 μ l de Lucigénine - xanthine oxydase

- 150 μ l de HH ou d'échantillon à tester

- 100 μ l de xanthine (départ réaction).

La lecture se fait à 25°C en intégration sur 30 secondes.

4.2.5. Mesure du rapport NADPH / NADP⁺

Le rapport NADPH / NADP⁺ est mesuré par microscopie à fluorescence à l'aide d'un filtre 350/490. L'intensité de l'émission est évaluée *de visu*.

4.2.6. Mesure des groupements thiols

La concentration cellulaire en thiols est mesurée selon la technique décrite par Gougerot-Pocidallo et al. Cette technique se base sur la pénétration de la N-ethylmaleimide dans les cellules et à se lier de façon covalente et stoéchiométriquement aux groupements thiols (Israël et al. 1992).

10^6 cellules sont resuspendues dans 150 μ l de PBS avec 0,120 μ Ci N(ethyl- 14 C)-maleimide (14 C)NEM; 42.90 mCi/mmol; New England Nuclear, Boston, MA) ajustée à 1.6 μ Ci/ μ M. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, la radioactivité libre est séparée de la radioactivité fixée par centrifugation sur un mélange lipidique durant 5 minutes à 4000xg. Les tubes contenant la radioactivité sont comptés à l'aide d'un compteur à scintillations.

4.2.7. Détermination du glutathion intracellulaire

Le glutathion total est titré par un procédé de recyclage enzymatique dans lequel il est oxydé par le DTNB (5-5'-dithiobis-2nitrobenzoate) en GSSG, lequel est réduit par le NADPH en présence de glutathion réductase.

Extraction du glutathion:

- reprendre le culot cellulaire ($0,7 \times 10^6$ cellules lavées 3x) dans 500 μ l de Triton 0,05% tampon PBS-EDTA 6,3 mM pH 7,5, agiter;
- prélever 380 μ l et ajouter 20 μ l de HCl 0,1 N et 20 μ l d'acide sulfosalicylique (50g/10ml eau). Agiter 1 à 2 min, centrifuger 10 min à 1800xg et récupérer le surnageant.

Dosage:

- 1400 μ l de NADPH (0,3mM/tampon PBS-EDTA 6,3 mM pH 7,5)
- 200 μ l de DTNB (3mM/tampon PBS-EDTA 6,3 mM pH 7,5)
- 200 μ l de tampon PBS-EDTA 6,3 mM pH 7,5
- 200 μ l d'échantillon
- zéro à 412 nm à 30°
- ajouter 20 μ l de glutathion réductase (50 U/ml de tampon PBS-EDTA 6,3 mM pH 7,5)

- mesurer la différence de DO entre la 10^e et la 16^e minute et comparer avec une courbe étalon.

4.2.8. Titrage de la superoxyde dismutase

La technique utilisée est basée sur l'inhibition par la SOD de la réduction de cytochrome C par les ions superoxydes obtenus durant l'oxydation de la xanthine, catalysée par la xanthine oxydase (suivant la technique de Mc CORD et FRIDOVICH, 1969, modifiée par CRAPO et Mc CORD).

Les cellules sont lavées 2x dans la solution de Hanks puis reprises dans du tampon phosphate pH 7,8 à raison de 6×10^6 cellules/2 ml. La suspension cellulaire est soniquée à 20 kc/sec pendant 30 secondes, dans la glace. Après centrifugation à 800xg à 4°C pendant 10 min, le surnageant est prélevé et additionné de Triton X 100 à 0,2% V/V. Après 30 minutes d'incubation à 4°C, la solution est centrifugée à 45000xg pendant 15 minutes à 4°C.

Titration de la SOD totale:

- 1,85 ml de tampon carbonate pH 10 EDTA 10^{-4} M
- 600 μ l de cytochrome C 10^{-5} M (tampon carbonate pH 10 EDTA 10^{-4} M)
- 150 μ l de xanthine (6,08 mg/20 ml tampon carbonate pH 10 EDTA 10^{-4} M)
- 250 μ l échantillon cellulaire
- 150 μ l de xanthine oxydase (ajustée de façon à obtenir une différence de DO de 0,025 mn⁻¹ de la réduction du cytochrome C). Départ de la réaction.

La lecture se fait au spectrophotomètre à 25°C à la longueur d'onde 550 nm sur la partie linéaire de la courbe de réduction du cytochrome C. Une unité de SOD correspond à 50% d'inhibition de la réduction du cytochrome C.

4.2.9. Mesure de la prolifération antigène dépendante et de la MLR

Les lignées antigène dépendantes ont été obtenues à partir de lymphocytes T circulants d'individus normaux selon la technique de Nutman *et al.* (Nutman 1991). La prolifération lymphocytaire T CD4⁺ antigène dépendante en réponse à l'antigène TT (tétanus toxoid) présenté par les B-EBV-Nef⁺ ou de B-EBV-Nef⁻ est mesurée par incorporation de thymidine à trois jours ((Groux *et al.* 1992), pour référence technique). La prolifération en réponse au SEB (staphylococcal enterotoxin B) (1µg/ml) ou à l'anti-CD3 (X35-7, IgG 2a) est également mesurée à trois jours.

La prolifération de lymphocytes normaux non autologues (isolés par FICOL-HYPAQUE à partir de sang d'individus sains) en présence des cellules B-EBV-Nef⁺ ou de B-EBV-Nef⁻ et de PHA (10µg/ml), superantigène SEB (1µg/ml) ou PWM (10µg/ml) est mesurée par incorporation de thymidine à trois jours ((Groux *et al.* 1992), pour référence technique).

4.2.10. Activation du LTR du VIH-1

Les B-EBV-Nef⁺ et B-EBV-Nef⁻ sont transfectées transitoirement par le plasmide pLTR-Luc ou pEnh-TK (3x la séquence kB en amont du promoteur de la TK) (protocole voir article 2).

F. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Initialement, la protéine virale Nef était présumée inhiber la transcription de l'ensemble des gènes viraux, participant ainsi à la maintenance de la phase de latence du VIH. Parallèlement, certaines propriétés ou caractéristiques particulières de la protéine Nef avaient été définies : (a) l'induction d'une diminution de l'expression de l'IL2 et du récepteur CD4; (b) des propriétés biochimiques comparables à celles des protéines G cellulaires : capacité de fixation du guanosine 5'-triphosphate (GTP) associée à l'activité GTPase et (c) la phosphorylation potentielle (thréonine en position 15) par la protéine kinase C. Par la suite, les expériences réalisées par Kesler *et al.* sur les singes rhésus inoculés avec différents clones SIV mutés ou délétés ont souligné l'importance de l'expression de Nef dans le maintien d'une charge virale importante et le caractère pathogène du virus.

Une réévaluation précise de la fonction biologique et des propriétés biochimiques de la protéine Nef s'averait nécessaire afin de permettre une meilleure compréhension de l'implication précise de Nef dans la physiopathologie de l'infection par le VIH.

Par microscopie électronique, nous avons montré que Nef était localisée soit de façon diffuse dans le cytoplasme, soit dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi de lymphocytes T normaux et de lymphocytes B transformés par EBV. La co-localisation de Nef et gp120 ainsi que la présence de Nef dans le surnageant cellulaire ont également été mises en évidence. Par contre, nous n'avons observé qu'une localisation cytoplasmique diffuse dans les lignées lymphocytaire T Jurkat et monocyttaire THP-1 infectées ou transfectées par un vecteur d'expression de Nef correspondant. Cette localisation pourrait être expliquée par une différence de niveau d'expression de Nef.

La localisation particulière de Nef dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, de même que la déplétion des cellules T CD4⁺ circulants chez les souris transgéniques mettent en évidence le rôle de Nef dans l'un des aspects essentiels de l'infection qui est la diminution de l'expression du récepteur CD4 dans les cellules infectées.

Les interactions éventuelles entre gp120, CD4 et Nef pourraient être montrées par immunoprécipitation sélective. Un système de culture permettant de suivre l'effet de Nef sur la réplication virale, la sécrétion de virions ainsi que la formation de syncytia en présence et absence de CD4 et/ou de Nef serait une façon d'étudier l'importance de ces interactions vis-à-vis du rôle de Nef dans la charge virale. Des marquages métaboliques au ³⁵S-Méthionine de type "pulse-chase" nous donneraient également des informations sur la 1/2 vie de CD4 en présence de Nef.

Notre intérêt s'est ensuite porté sur l'étude des propriétés enzymatiques de Nef. Par marquage métabolique, nous n'avons pas identifié d'activité GTP binding de Nef et montré que Nef n'était pas phosphorylée en réponse à l'activation de la PKC.

Le rôle de Nef dans l'activation lymphocytaire T CD4⁺ ainsi que la relation entre l'activation cellulaire et l'activation du LTR du VIH-1 ont ensuite été abordés. Nef inhibe l'activation du LTR par un mécanisme NF-kB et AP-1 indépendant sans modifier la capacité des lymphocytes T à répondre aux stimuli étudiés. Dans la mesure où un grand nombre de lymphocytes infectés sont situés dans les ganglions, siège de la réponse immune, il est possible que Nef intervienne dans le contrôle de la réplication virale lors de l'activation immunitaire. En évitant ainsi la synthèse d'un nombre trop élevé de particules virales, Nef éviterait l'effet lytique du virus et permettrait une charge virale plus élevée.

A l'égard du rôle de Nef dans la modulation de l'expression membranaire de CD4 et de l'importance de CD4 dans l'activation T, Il serait intéressant d'utiliser des lignées lymphocytaires T antigène dépendantes exprimant Nef après transduction d'un vecteur

d'expression rétroviral. Ce modèle cellulaire, non tumoral, mettra en évidence dans un contexte plus physiologique, le rôle de Nef sur la signalisation cellulaire passant par le récepteur T lorsque l'expression membranaire du récepteur CD4 est inhibée. En particulier, pourront être abordées la réponse antigène dépendante de lymphocytes exprimant Nef ainsi que la localisation de la tyrosine kinase $p56^{lck}$ et la phosphorylation $p56^{lck}$ dépendante, événements dont l'importance a été démontrée lors de la réponse antigène spécifique (Crise et al. 1992; Haughn et al. 1992; Julius et al. 1993).

Parmi les dysfonctions du système immunitaire observées chez les sujets infectés, différentes anomalies au niveau du métabolisme du glutathion et de la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène ont été décrites, et ceci dès la phase asymptomatique de la maladie. Comme il est probable que ces anomalies jouent un rôle dans le dysfonctionnement du système immunitaire induit par le VIH, le rôle de Nef dans le métabolisme oxydatif a été étudié.

Une inhibition totale de la PR, en réponse au PMA est observée lorsque les B-EBV expriment la protéine Nef. Cette inhibition est partiellement reproduite lorsque les B-EBV-Nef⁻ sont incubés en présence de Nef extracellulaire et n'est pas due à une activité piègeur d'anions superoxydes de Nef ni à un rapport NADPH / NADP incorrect. Le rôle éventuel de Nef dans la cascade d'activation de la NADPH oxydase pourrait être mise en évidence dans un premier temps, en stimulant les B-EBV-Nef⁺ avec des activateurs agissant à des niveaux différents sur la cascade d'activation comme l'ionomycine afin de voir si cette inhibition est levée. Il serait également intéressant de vérifier si la PKC est correctement transférée vers la membrane. Ceci peut être réalisé par dosage de la PKC cytoplasmique et membranaire suite à l'activation et par la vérification de son activité enzymatique lors de la phosphorylation d'un substrat (histones). L'observation de la variation du calcium cytoplasmique en réponse au PMA ainsi que le dosage de la NADPH oxydase apporterons également des informations supplémentaires.

Nous avons également montré que la concentration en thiols totaux, est plus faible lorsque ces mêmes cellules expriment Nef ou sont incubées en présence de Nef. Cette modification n'est pas due à un changement de la concentration en glutathion. Néanmoins, ni la fonction présentatrice antigénique de ces cellules de même que la MLR ne sont modifiées en présence de Nef. L'établissement d'un profil précis des différents thiols en présence et en absence de Nef devrait permettre d'avoir une idée plus précise de la modification de l'équilibre redox induit. Bien que le glutathion constitue le thiol principal, d'autres systèmes réducteurs existent comme la thioredoxine et la glutaredoxine et peuvent jouer un rôle important dans le maintien de l'équilibre redox cellulaire.

Outre la mise en évidence de la localisation et de la sécrétion de Nef, ce travail aura contribué à une meilleure connaissance des propriétés enzymatiques et du rôle de Nef dans la pathologie de l'infection. Les résultats sur le métabolisme oxydatif ouvrent également de nouvelles perspectives sur l'étude du rôle de Nef en tant que molécule capable de moduler les paramètres de signalisation de cellules voisines.

G. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ahmad, N. and S. Venkatesan (1988). "Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR" *Science* **241**(4872): 1481.

Aldovini, A. and R. A. Young (1990). "Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus." *J. Virol.* **64**: 1920.

Ameisen, J. C. and A. Capron (1991). "T cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis." *Immunol. Today* **123**: 102.

Ameisen, J. C., B. Guy, S. Chamaret, M. Loche, B. Mach, A. Tartar, Y. Mouton and A. Capron (1989). "Persistent antibody response to the HIV-1-negative regulatory factor in HIV-1-infected seronegative persons." *N Engl J Med* **320**(4): 251.

Ameisen, J. C., B. Guy, S. Chamaret, M. Loche, Y. Mouton, J. L. Neyrinck, J. Khalife, C. Lerepovost, G. Beaucaire, C. Boutillon and a. l. et (1989). "Antibodies to the nef protein and to nef peptides in HIV-1-infected seronegative individuals." *Aids Res Hum Retroviruses* **5**(3): 279.

Autran, B., S. B. Sadat, F. Hadida, A. Parrot, J. M. Guillon, F. Plata, C. Mayaud and P. Debre (1991). "HIV-specific cytotoxic T lymphocytes against alveolar macrophages: specificities and downregulation." *Res Virol* **142**(2-3): 113.

Avissar, N., J. C. Whitin, P. Z. Allen, D. D. Wagner, P. Liegey and H. J. Cohen (1989). "Plasma selenium-dependent glutathion peroxidase." *J. Biol. Chem.* **263**: 15850.

Bach, J. F. and P. Lesavre (1984). "*In: Immunologie.*" Paris, Flammarion :

Badwey, J. A. and M. L. Karnovsky (1980). "Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes." *Annu. Rev. Biochem.* **49**: 695.

Bahraoui, E., A. Benjouad, J. M. Sabatier, J. P. Allain, Y. Laurian, L. Montagnier and J. C. Gluckman (1990). "Relevance of anti-nef antibody detection as an early serologic marker of human immunodeficiency virus infection." *Blood* **76**(1): 257.

Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey and L. Montagnier (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* **220**: 868.

Benson, R. E., A. Sanfridson, J. S. Ottinger, C. Doyle and B. R. Cullen (1993). "Downregulation of cell-surface CD4 expression by Simian Immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection." *J. Exp. Med* **177**: 1561.

Berkhout, B. and K. T. Jeang (1990). "Functional roles for the TATA promoter and enhancers in basal and Tat-induced expression of the HIV-1 LTR." *J Virol* **66**: 139.

Britigan, B. E., T. J. Coffman, D. R. Adelberg and M. S. Cohen (1988). "Mononuclear phagocytes have the potential for sustained hydroxyl radical production." *J. Exp. Med.* **168**: 2367.

Bryant, M. and L. Ratner (1990). "Myristoylation-dependant replication and assembly of human immunodeficiency virus 1." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 523.

Buhl, R., H. A. Jaffe, K. J. Holroyd, F. B. Wells, C. Saltini and A. M. Cantin (1989). "Systemic glutathione-deficiency in symptom-free HIV-seropositive individuals." *Lancet* **2**: 1294.

Bukrinsky, M. I., T. L. Stanwick, M. P. Dempsey and M. Stevenson (1991). "Quiescent T lymphocytes as an inductible virus reservoir in HIV-1 infection." *Science* **254**: 423.

Bushman, F. and R. Craigie (1991). "Activities of HIV integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA." *Science* **249**: 1555.

Carson, D. A., S. Seto and D. B. Wasson (1986). "Lymphocyte dysfunction after DNA damage by toxin oxygen species." *163* (746-751):

Chakrabarti, L., M. Guyader, M. Alizon, M. D. Daniel, R. C. Desrosiers, P. Tiollais and P. Sonigo (1987). "Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to the human and simian retroviruses." *Nature* **328**: 543.

Chang, D. D. and P. A. Sharp (1989). "Regulation of HIV Rev depends upon recognition of splice sites." *Cell* **59**: 789.

Chaudhri, G., N. H. Hunt, J. A. Clark and R. Ceredig (1988). "Antioxidants inhibit proliferation and cell surface expression of receptors for interleukin-2 and transferrin in T

lymphocytes stimulated with phorbol myristate acetate and ionomycin." *Cell. Immunol.* **115**: 204.

Chaudiere, J. (1993). "Some chemical and biochemical constraints of oxidative stress in living cells." *In: Free Radical Damage and its Control*, RICE-EVANS C. Ed., *New Comprehensive Biochemistry*, Elsevier, in press.

Chenciner, N., F. Michel, G. Dadaglio, D. P. Langlade, A. Hoffenbach, A. Leroux, P. F. Garcia, G. Rautmann, B. Guy, J. M. Guillon and a. l. et (1989). "Multiple subsets of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans and in mice." *Eur. J. Immunol.* **19**(9): 1537.

Cheng, M. C., P. Iannello, K. Shaw, P. A. Luciw and J. A. Levy (1989). "Differential effects of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host." *Science* **246**(4937): 1629.

Cheng-Mayer, C., C. Weiss, D. Seto and J. A. Levy (1989). "Isolates of human immunodeficiency virus type 1 from the brain may constitute a special group of the AIDS virus." *Proc. Natl. Sci. USA* **80**: 8575.

Clouse, K. A., D. Powell, I. Washington, G. Poli, K. Strebel, W. Farrar, P. Barstad, J. Kovacs, A. S. Fauci and T. Folks (1989). "Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone." *J. Immunol.* **142**: 431.

Cohen, E. A., G. Dehni, J. G. Sodroski and W. A. Haseltine (1990). "Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein." *J. Virol.* **64**: 3097.

Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, Y. Jalinoos, J. Proulx, J. G. Sodroski and W. A. Haseltine (1990). "Identification of HIV-1 vpr product and function." *J. of Acq. Imm. Def. Synd.* **3**: 11.

Constantoulakis, P., G. Nasioulas, E. Afonina, M. Campbell, B. K. Felber and G. Pavlakis (1993). "An interferon-inductible gene family inhibiting HIV-1 expression." *Keystone Symposia Q* **341**: 52.

Crise, B. and J. K. Rose (1992). "Human immunodeficiency virus type 1 precursor retains a CD4-p56lck complex in the endoplasmic reticulum." *J. Virol.* **66**(4): 2296.

Cullen, B. (1991). "Regulation of HIV-1 expression." *FASEB J.* **5**: 2361.

Cullen, B. R. (1986). "Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism." *Cell* **46**: 973.

Cullen, B. R. and E. D. Garrett (1992). "A comparison of regulatory features in primate lentiviruses." *AIDS Res. Human Retroviruses* **8**: 387.

Culmann, B., E. Gomard, M. P. Kieny, B. Guy, F. Dreyfus, A. G. Saimot, D. Sereni and J. P. Levy (1989). "An antigenic peptide of the HIV-1 NEF protein recognized by cytotoxic T lymphocytes of seropositive individuals in association with different HLA-B molecules." *Eur J Immunol* **19**(12): 2383.

Culmann, B., E. Gomard, M. P. Kieny, B. Guy, F. Dreyfus, A. G. Saimot, D. Sereni, D. Sicard and J. P. Levy (1991). "Six epitopes reacting with human cytotoxic CD8⁺ T cells in the central region of the HIV-1 NEF protein." *J Immunol* **146**(5): 1560.

Cunningham-Rundles, S., M. Michelis and H. Masur (1983). "Serum suppression of lymphocyte activation in vitro in acquired immunodeficiency disease." *J. Clin. Invest.* **3**: 156.

Daniel, M. D., N. L. Letvin, N. W. King, M. Kannagi, P. K. Seghal, R. D. Hunnt, P. J. Kanki, M. Essex and R. C. Desrosiers (1985). "Isolation of a T-cell tropic HTLV-III like retrovirus from macaques." *Science* **228**: 1201.

de Ronde, A., B. Klaver, W. Keulen, L. Smit and J. Goudsmit (1992). "Natural HIV-1 NEF accelerates virus replication in primary human lymphocytes." *Virology* **188**(1): 391.

Deby, C. and R. Goutier (1990). "New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutases." *Biochem. Pharmacol.* **39**: 399.

Deby, C., J. Pincemail, P. Hans, P. Braquet, Y. Lion, G. Deby-Dupont and R. Goutier (1984). "Mechanisms of free radicals production in the arachidonic acid cascade and the role of anti-lipoperoxidants and free radical scavengers." *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 245.

Dornand, J. and M. Gerber (1989). "Inhibition of murine T-cell responses by anti-oxidants: the targets of lipo-oxygenase pathway inhibitors." *Immunology* **68**: 384.

Dorsett, B., W. Cronin, V. Chuma and H. L. Iochim (1985). "Anti-lymphocyte antibodies in patients with the acquired immune deficiency syndrome." *Am. J. Med.* **78**: 621.

Dröge, W., H.-P. Eck and S. Mihm (1992). "HIV-induced cysteine deficiency and T-cell dysfunction - a rationale for treatment with N-acetylcysteine." *Immunol. Today* **13**: 211.

Eck, H.-P., H. Gmünder, M. Hartmann, D. Petzoldt and W. Dröge (1989). "Low concentration of acid-soluble thiols in the plasma of HIV-1 infected patients." *Chem. Hoppe-Seyler* **370**: 101.

Eck, H.-P., C. Stahl-Hennig, G. Hunsmann and W. Dröge (1991). "Metabolic disorder as early consequence of simian immunodeficiency virus infection in rhesus macaques." *Lancet* **338**: 344.

Edelman, A. S. and S. Zolla-Pazner (1989). "AIDS: a syndrome of immune dysregulation, dysfunction and deficiency." *Faseb J.* **3**: 22.

Embretson, J., M. Zupancic, J. L. Ribas, A. Burke, P. Racz, K. Tenner-Racz and A. T. Haase (1993). "Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS." *Nature* **362**: 359.

Ensoli, B., L. Buonaguro, G. Barillari, V. Fiorelli, R. Gendelman, R. A. Morgan, P. Wingfield and R. C. Gallo (1993). "Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation." *J. Virol.* **67**: 277.

Estaquier, J., C. Boutillon, J. C. Ameisen, M. H. Gras, J. P. Lecocq, B. Barbier, A. Dixon, A. Tartar, A. Capron and C. Auriault (1992). "T helper cell epitopes of the human immunodeficiency virus (HIV-1) nef protein in rats and chimpanzees." *Mol Immunol* **29**(4): 489.

Fantini, J., D. G. Cook, N. Nathanson, S. L. Spitalnik and F. Gonzales-Scarano (1993). "Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2700.

Farnet, C. and W. A. Haseltine (1990). "Integration of HIV-1 DNA in vitro." *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4164.

Fauci, A. S. (1988). "The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis." *Science* **239**: 617.

Fauci, A. S. (1992). "Immunopathogenic mechanisms in HIV infection." *Septième colloque des cent gardes* : 325.

Felber, B. K., M. Hadzopoulos-Cladaras, C. Cladaras, T. Copeland and G. N. Pavlakis (1989). "Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1495.

Ferradini, C. and J. Pucheault (1983). "Biologie de l'action des rayons ionisants." Masson :

Fidelus, R. and M. F. Tsan (1986). "Enhancement of glutathione promotes lymphocyte activation by mitogen." *Cell. Immunol.* **97**: 155.

Folks, T. M., K. A. Clouse, J. Justement, A. Rabson, E. Duh, J. M. Kehrl and A. S. Fauci (1989). "Tumor necrosis factor alpha chronically infected T-cell clones." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 2365.

Frankel, A. D., D. S. Bredt and C. O. Pabo (1988). "Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer." *Science* **240**: 70.

Frankel, A. D. and C. O. Pabo (1988). "Cellular uptake of Tat protein from human immunodeficiency virus." *Cell* **55**: 1189.

Gabuzda, D., K. Lawrence, E. Langhoff, E. Terwilliger, T. Dorfman, W. A. Haseltine and J. Sodroski (1992). "Role of vif in replication of the human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes." *J. Virol.* **66**: 6489.

Gallo, R., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Parker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster and P. D. Markham (1984). "Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HLTVIII) from patients with AIDS and at risk for AIDS." *Science* **224**: 550.

Garcia, J. A., F. K. Wu, R. Mitsuyasu and R. B. Gaynor (1987). "Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus." *EMBO* **6**: 3671.

Garcia, J. V., J. Afano and A. D. Miller (1993). "The negative effect of human immunodeficiency virus type 1 nef on cell surface CD4 expression is not species specific and requires the cytoplasmic domain of CD4." *J. Virol.* **67**: 1511.

Garcia, J. V. and A. D. Miller (1991). "Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef." *Nature* **350**(6318): 508.

Garndner, M. B. and P. A. Luciw (1989). "Animal models in AIDS." *Faseb J.* **3**(2593-2599):

Garrett, E. D., L. S. Tiley and B. R. Cullen (1991). "Rev activates expression of the human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr gene products." *J. Virol.* **65**: 1653.

Garvey, K. J., M. S. Oberste, J. E. Elser, M. J. Braun and M. A. Gonda (1990). "Nucleotide sequence and genomic organization of biologically active proviruses of the bovine immunodeficiency-like virus." *Virology* **175**: 391.

Gilbert, H. F. (1989). "Thermodynamic and kinetic constraints on thiol/disulfide exchange involving glutathione redox buffers." *In/ Glutathione centennial molecular perspectives and clinical implications* Acad. Press. Taniguchi N., Higachi T., Sakamoto Y. and Meister A.: 73.

Gilmore, T. D. (1990). "NF-kB, KBF1, dorsal and related matters." *Cell* **62**: 841.

Gluckman, J. C., F. C. Fretz, C. Rouzioux, P. Perret, O. Lopez, D. Bucquet and E. Bahraoui (1989). "Lack of anti-p27 nef antibody detection in HIV-seronegative high-risk people [letter]." *Aids* **3**(12): 855.

Gmünder, H., H. P. Eck, B. Benninghoff, S. Roth and W. Dröge (1990). "Macrophages regulate intracellular glutathione levels of lymphocytes. Evidence for an immunoregulatory role of cysteine." *Cell. Immunol.* **129**: 32.

Gombert, F. O., W. Blecha, M. Tahtinen, A. Ranki, S. Pfeifer, W. Troger, R. Braun, L. N. Muller, G. Jung, W. H. Rubsamen and a. l. et (1990). "Antigenic epitopes of NEF proteins from different HIV-1 strains as recognized by sera from patients with manifest and latent HIV infection." *Virology* **176**(2): 458.

Gottlinger, H. G., J. G. Sodroski and W. A. Haseltine (1989). "Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5781.

Gougeon, M. L., R. Olivier, S. Garcia, D. Guetard, C. Dragic, C. Dautet and L. Montagnier (1991). "Mise en évidence d'un processus d'engagement vers la mort cellulaire par apoptose dans les lymphocytes de patients infectés par le VIH." *C. R. Acad. Sci. Paris t 312, série III*: 529.

Groux, H., G. Torpier, D. Monte, Y. Mouton, A. Capron and J. C. Ameisen (1992). "Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals." *J. Exp. Med.* **175**: 331.

Gruters, R. A., F. G. Terpstra, R. De Jong, C. J. M. Noesel, R. A. W. Van Lier and F. Miedema (1990). "Selective loss of T cell functions in different stages of HIV infection." *Eur. J. Immunol.* **20**: 1039.

Gurley, R. J., K. Ikeuchi, R. A. Byrn, K. Anderson and J. E. Groopman (1989). "CD4+ lymphocyte functions with early human immunodeficiency virus infection." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1908.

Guy, B., M. Geist, K. Dott, D. Spehner, M. P. Kieny and J. P. Lecocq (1991). "A specific inhibitor of cysteine proteases impairs a vif-dependent modification of human immunodeficiency virus type 1 env protein." *J. Virol.* **65**: 1325.

Guy, B., M. P. Kieny, Y. Riviere, C. Le Peuch, K. Dott, M. Girard, L. Montagnier and J. P. Lecocq (1987). "HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product." *Nature* **330**(6145): 266.

Guy, B., Y. Riviere, K. Dott, A. Regnault and M. P. Kieny (1990). "Mutational analysis of the HIV nef protein." *Virology* **176**(2): 413.

Haase, A. (1986). "Pathogenesis of lentivirus infection." *Nature* **322**: 130.

Halliwell, B. (1992). "Les formes réactives de l'oxygène dans les systèmes vivants: origine, biochimie et rôle dans les maladies chez l'homme." *In*: GSH System. Le glutathion dans les mécanismes de défense antioxydants. G.G. Crystal, P.M. Suter, C. Voisin. Excerpta Medica, Amsterdam. :

Hammes, S. R., E. P. Dixon, M. H. Malim, B. R. Cullen and W. C. Greene (1989). "Nef protein of human immunodeficiency virus type 1: evidence against its role as a transcriptional inhibitor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23): 9549.

Hancock, J. T., L. M. Henderson and O. T. G. Jones (1990). "Superoxide generation by EBV-transformed B lymphocytes. Activation by IL-1 beta, TNF alpha and receptor independent stimuli." *Immunology* **71**: 213.

Harrell, R. A., G. J. Cianciolo, T. D. Copeland, S. Oroszlan and R. Snyderman (1986). "Suppression of the respiratory burst of human monocytes by a synthetic peptide homologous to envelope proteins of human and animal retroviruses." *J. Immunol.* **136**: 3517.

Harris, M., S. Hislop, P. Patsilinos and J. Neil (1992). "In vivo derived HIV-1 nef gene products are heterogeneous and lack detectable nucleotide binding activity." *Aids Res. and Hum. Retrov.* **8**: 537.

Haseltine, W. A. (1991). "Molecular biology of HIV-1." *FASEB J.* **5**: 2349.

Haseltine, W. A. (1991). "Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1." *Faseb J* **5**(10): 2349.

Hattori, N., F. Michaels, K. Fargnoli, L. Marcon and R. C. Gallo (1990). "The human immunodeficiency virus type 2 vpr gene is essential for productive infection of human macrophages." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8080.

Hauber, J., A. Perkins, E. P. Heimer and B. R. Cullen (1987). "Trans-activation of HIV gene expression is mediated by nuclear events." *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **84**: 6364.

Haughn, L., S. Gratton, L. Caron, R.-P. Sékaly, A. Veillette and M. Julius (1992). "Association of tyrosine kinase p56lck with CD4 inhibits the induction of growth through the alpha-beta T-cell receptor." *Nature* **358**: 328.

Hemler, M. E., M. J. Elices, C. Parker and Y. Takada (1990). "Structure of integrin VLA-4 and its cell-cell and cell-matrix adhesion functions." *Immunol. Rev.* **114**: 44.

Hill, K. E. and R. F. Burk (1984). "Influence of vitamin E and selenium on glutathione-dependent protection against microsomal lipid peroxidation." *Biochim. Pharmacol.* **33**: 1065.

Hill, K. E., R. F. Burk and J. M. Lane (1987). "Effect of selenium depletion and repletion on plasma glutathione and glutathione dependent enzymes in the rat." *J. Nutr.* **1987**: 99.

Hirsch, V., N. Riedel and J. I. Mullins (1987). "The genome organization of STLV-3 is similar to that of the AIDS virus except for a truncated transmembrane protein." *Cell* **49**: 307.

Hiscott, J., A. Roulston, M. D'Addario, J. Lacoste and L. Cohen (1992). "La régulation de l'expression de VIH-1 et l'activation des gènes de cytokines." *M/S* **8**: 346.

Hofmann, B., K. D. Jakobsen, N. Odum, E. Dickmeiss, P. Platz, L. P. Ryder, C. Petersen, L. Mathiesen, I. Bygbjerg, V. Faber and A. Svejgaard (1989). "HIV-induced immunodeficiency." *J. Immunol.* **142**: 1874.

Hofmann, B., N. Odum, B. Jakobsen, P. Platz, L. Ryder, J. Nielsen, J. Gerstoft and A. Svejgaard (1986). "Immunological studies in the acquired immunodeficiency syndrome." *Scand. J. Immunol.* **23**: 669.

Israël, N., M. A. Gougerot-Pocidalo, F. Aillet and J. L. Virelizier (1992). "Redox status of cells influences constitutive or induced NF-kB translocation and HIV long terminal repeat activity in human T and monocytic cell lines." *J. Immunol.* **149**: 3386.

Jakobovits, A., A. Rosenthal and D. J. Capon (1990). "Trans-activation of HIV-1 LTR-directed gene expression by tat requires protein kinase C." *EMBO J.* **9**: 1165.

Jones, K. A., J. T. Kadonga, P. A. Luciw and R. Tjian (1986). "Activaton of the AIDS retrovirus promotor by the cellular trancription factor Sp1." *Science* **323**: 755.

Julius, M., C. R. Maroun and L. Haughn (1993). "Distinct roles for CD4 and CD8 as co-receptors in antigen receptor signalling." *Immunol. Today* **14**(4): 177.

Kalebic, T., A. Kinter, G. Poli, M. E. Anderson, A. Meister and A. S. Fauci (1991). "Suppression of human immunodeficiency virus expression in chronically infected monocytic cells by glutathione, glutathione ester, and N-acetylcysteine." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 986.

Kaminchik, J., N. Bashan, D. Pinchasi, B. Amit, N. Sarver, M. I. Johnston, M. Fischer, Z. Yavin, M. Gorecki and A. Panet (1990). "Expression and biochemical characterization of human immunodeficiency virus type 1 nef gene product." *J Virol* **64**(7): 3447.

Kao, S.-Y., A. F. Calman, P. A. Luciw and B. M. Peterlin (1987). "Anti-terminaison of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product." *Nature* **330**: 489.

Kestler, H., T. Kodama, D. Ringler, M. Marthas, N. Pedersen, A. Lackner, D. Regier, P. Sehgal, M. Daniel, N. King and R. Desrosiers (1990). "Induction of AIDS in Rhesus monkeys by molecularly cloned simian immunodeficiency virus." *Science* **248**: 1109.

Kestler, H., D. J. Ringler, K. Mori, D. L. Panicali, P. K. Sehgal, M. D. Daniel and R. C. Desrosiers (1991). "Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS." *Cell* **65**(4): 651.

Kieran, M., V. Blank, F. Logeat and e. al. (1990). "The DNA binding subunit of NF-kB is identical to factor KBF1 and homologous to the rel oncogene product." *Cell* **62** (1007-1018):

Kim, S., K. Ikeuchi, R. Byrn, J. Groopman and D. Baltimore (1989). "Lack of a negative influence on viral growth by the nef gene of human immunodeficiency virus type 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23): 9544.

Kim, S. Y., R. Byrn, J. Groopman and D. Baltimore (1989). "Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human HIV infection; evidence for differential gene expression." *J. Virol.* **63**: 3708.

Klatzmann, D., F. Barré-Sinoussi, M. T. Nuguyere, C. Danquet, E. Vilmer, C. Griscelli, F. Brun-Vezinet, C. Rouzioux, J. C. Gluckman, J. C. Cherman and L. Montagnier (1984). "Selective tropism of LAV for helper-inducer T lymphocytes." *Science* **225**: 59.

Klimkait, T., K. Strebel, M. D. Hoggan, M. A. Martin and J. M. Orenstein (1990). "The human immunodeficiency virus type-1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release." *J. Virol.* **64**: 621.

Kohl, N. E., E. A. Emini, V. A. Schleif, L. J. Davis, J. C. Heimbach, R. A. Dixon, E. M. Scolnick and I. S. Sigal (1988). "Active HIV protease is required for viral infectivity." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4686.

Kornfelt, H., W. W. Cruikshank, S. W. Pyle, J. S. Berman and D. M. Center (1988). "Lymphocyte activation by HIV-1 envelope glycoprotein." *Nature* **335**: 445.

Langhoff, E., E. F. Terwilliger, H. J. Bos, K. H. Kalland, M. C. Poznansky, O. M. L. Bacon and W. A. Haseltine (1991). "Replication of HIV-1 in primary dendritic cell cultures." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7839.

Lanzavecchia, A., E. Roosnek, T. Gregory, P. Berman and S. Abrignani (1988). "T cells can present antigen such as HIV gp120 targeted to their own surface molecules." *Nature (London)* **334**: 530.

Laspia, M. F., A. P. Rice and M. B. Mathews (1990). "Synergy between HIV-1 Tat and adenovirus E1A is due to stabilization of transcriptional elongation." *Genes Dev.* **4**: 2397.

Leca, G., G. Benichou, A. Bensussan, F. Mitente, P. Galanaud and A. Vazquez (1991). "Respiratory burst in human B lymphocytes. Triggering of surface Ig receptors induces modulation of chemiluminescence signal." *J. Immunol.* **146**: 3542.

Letvin, N. L., M. D. Daniel, P. K. Seghal, R. C. Desrosiers, R. D. Hunt, L. M. Waldron, J. J. Mac Key, D. K. Schmidt, L. V. Chalifoux and N. W. King (1985). "Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T cell tropic retrovirus STLV-III." *Science* **230**: 71.

Levy, D. N., L. S. Fernandes, W. V. Williams and D. B. Weiner (1993). "Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus vpr." *Cell* **72**: 541.

Levy, J. A., L. Evans, C. Cheng-Mayer, L.-Z. Pan, A. Lane, S. C., D. Dina, C. Wiley and J. Nelson (1987). "The biologic and molecular properties of the AIDS associated retrovirus that affect antiviral therapy." *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* **138**: 101.

Libermann, T. A. and D. Baltimore (1990). "Activation of IL6 gene expression through the NF-kB transcription factor." *Mol. Cell. Biol.* **10**: 2327.

Liebler, D. C., D. S. Kling and D. J. Reed (1986). "Antioxidant protection of phospholipid bilayers by alpha-tocopherol." *J. Biol. Chem.* **261**: 12114.

Lindholm, P. F., R. L. Reid and J. N. Brady (1992). "Extracellular Tax1 protein stimulates Tumor Necrosis Factor-beta and immunoglobulin kappa chain expression in lymphoid cells." *J. Virol.* **66**: 1294.

Lu, Y., M. Stenzel, J. G. Sodroski and W. A. Haseltine (1989). "Effects of long terminal repeat mutations on human immunodeficiency virus type 1 replication." *J Virol* **63**(9): 4115.

Lu, Y., N. Touzjian, M. Stenzel, T. Dorfman, J. Sodroski and W. A. Haseltine (1990). "Identification of cis-acting repressive sequences within the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1." *J. Virol.* **64**: 5226.

Lu, Y., N. Touzjian, M. Stenzel, T. Dorfman, J. G. Sodroski and W. A. Haseltine (1991). "The NF-kB independent cis-acting sequences in HIV-1 LTR responsive to T-Cell activation." *J. AIDS* **4**: 173.

Luciw, P. A., C. Cheng-Mayer and J. A. Levy (1987). "Mutational analysis of the human immunodeficiency virus : the Orf-B region down-regulates virus replication." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1434.

Luria, S., I. Chambers and P. Berg (1991). "Expression of the type 1 human immunodeficiency virus Nef protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukin 2 mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(12): 5326.

Lyerly, H. K., T. J. Matthews, A. J. Langlois, D. P. Bolognesi and K. J. Weinhold (1987). "Human T-cell lymphotropic virus IIIB glycoprotein (gp120) bound to CD4 determinants on normal lymphocytes and expressed by infected cells serves as target for immune attack." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4601.

Macatonia, S. E., M. Gompels, A. J. Pinching, S. Patterson and S. C. Knight (1992). "Antigen presentation by macrophages but not dendritic cells in human immunodeficiency virus (HIV) infection." *Immunol.* **75**: 576.

Maitra, R. K., N. Ahmad, S. M. Holland and S. Venkatesan (1991). "Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) provirus expression and LTR transcription are repressed in NEF-expressing cell lines." *Virology* **182**(2): 522.

Malim, M. H., S. Bohlein, J. Hauber and B. R. Cullen (1989). "Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator - derivation of a trans-dominant repressor of Rev function." *Cell* **58**: 205.

Malim, M. H. and B. R. Cullen (1991). "HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for the HIV-1 latency." *Cell* **65**: 241.

Malim, M. H., J. Hauber, S.-Y. Le, J. V. Maizel and B. R. Cullen (1989). "The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA." *Nature (London)* **338**: 254.

Mann, D. L., E. Read-Connole, L. O. Arthur, W. G. Robey, P. Wernet, E. M. Schneider, W. A. Blattner and M. Popovic (1988). "HLA-DR is involved in the HIV-1 binding site on cells expressing MHC Class II antigens." *J. Immunol.* **141**: 1131.

Marciniak, R. A., B. J. Cainan, A. D. Frankel and P. A. Sharp (1990). "HIV tat protein trans-activates transcription in vitro." *Cell* **63**: 791.

Maurer, B. and R. M. Flugel (1988). "Genomic organization of the human spumaretrovirus and its relatedness to AIDS and other retrovirus." *Aids Res Hum Retrovir* **4**: 467.

Meier, B. B., H. H. Radeke, S. Selle, G. G. Habermehl, K. Resch and H. Sies (1990). "Human fibroblasts release low amounts of reactive oxygen intermediates in response to the potent phagocyte stimulants serum-treated zymosan, N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, leukotriene B4 or 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate." *Biological chemistry Hoppe-Seyler* **371**: 1021.

Meyer, M., R. Schreck and P. A. Baeuerle (1993). "H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF- κ B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor." *EMBO J.* **12**: 2005.

Miedema, F. (1992). "Immunological abnormalities in the natural history of HIV infection: mechanisms and clinical relevance." *Immunodeficiency reviews* **3**: 173.

Miedema, F., A. J. C. Petit, F. G. Terpstra, J. K. Scattenkerk, F. De Wolf, B. J. Al, M. Roos, J. Lange, S. Danner, J. Goudsmit and P. T. Schellekens (1988). "Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus infected asymptomatic homosexual men." *J. Clin. Invest.* **82**: 1908.

Miedema, F., M. Tersmette and R. Van Lier (1990). "AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system." *Immunol. Today* **11**: 293.

Müller, F. (1992). "Reactive oxygen intermediates and human immunodeficiency virus (HIV) infection." *J. Free Rad. Biol. Med.* **13**: 651.

Muthiah, D. D., F. Kirchoff, S. C. Czajak, P. K. Seghal and R. C. Desrosiers (1993). "Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the Nef Gene." *Science* **258**: 1938.

Nabel, G. and D. Baltimore (1987). "An inducible transcription factor activates expression of HIV in T cells." *Nature* **326**: 711.

Nabel, G., S. A. Rice, D. M. Knipe and D. Baltimore (1988). "Alternative mechanism for activation of HIV enhancer in T cells." *Science* **239**: 1299.

Nebreda, A. R., T. Bryan, F. Segade, P. Wingfield, S. Venkatesan and E. Santos (1991). "Biochemical and biological comparison of HIV-1 NEF and ras gene products." *Virology* **183**(1): 151.

Nebreda, A. R., F. Segade and E. Santos (1992). "The nef gene products: biochemical properties and effects on host cell functions." *Res Virol* **143**(1): 55.

Niederman, T. M., V. Garcia, R. W. Hastings, S. Luria and L. Ratner (1992). "Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein inhibits NF-kB induction in human T cells." *J. Virol.* **66**: 6213.

Niederman, T. M., B. J. Thielan and L. Ratner (1989). "Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(4): 1128.

Niederman, T. M. J., W. R. Hastings, S. Luria, J. Brandres and L. Ratner (1993). "HIV-1 Nef protein inhibits the recruitment of AP-1 DNA-binding activity in human T-cells." *Virology* **194**: 338.

Nutman, T. B. (1991). "Generation and maintenance of T cell lines and clones." *Current Protocols in Immunology* : 7.

Olsen, H. S., A. W. Cochrane, P. J. Dillon, C. M. Nalin and C. A. Rosen (1990). "Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env

mRNA is dependant on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids.”
Genes Dev. **4**: 1357.

Orenstein, J. M., M. S. Meltzer, T. Phipps and H. E. Gendelman (1988). “Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study.” *J. Virol.* **62**: 2578.

Pantaleo, G., C. Graziosi, J. Demarest, L. Butini, M. Montroni, C. H. Fox, J. M. Orenstein, D. P. Kotler and A. S. Fauci (1993). “HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically stage of disease.” *Nature* **362**: 355.

Parganihan, A. and D. Fiore (1988). “Ordered interstrand and intrastrand DNA transfer during reverse transcription.” *Science* **241**: 1064.

Peter, M. E., C. Hall, A. Rühlmann, J. Sancho and C. Terhorst (1992). “The T-cell receptor ζ chain contains a GTP/GDP binding site.” *EMBO J.* **11**: 933.

Petit, C. A. J., M. Tersmette, F. G. Terpstra, R. E. Y. de Goede, R. A. W. van Lier and F. Miedema (1988). “Decreased accessory cell function by human monocytic cells after infection with HIV.” *J. Immunol.* **140**: 1485.

Piatak, J., M. S. Saag, L. C. Yang, J. Clark, J. C. Kappes, K. C. Luk, B. H. Hahn, G. M. Shaw and J. D. Lifson (1993). “High level of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR.” *Science* **259**: 1749.

Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, J. W. Mier, A. M. Woods and R. C. Gallo (1980). “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**: 7415.

Pomerantz, R. J., D. Trono, M. B. Feinberg and D. Baltimore (1990). "Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit an aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency." *Cell* **61**: 1271.

Rabson, A. B. and M. A. Martin (1985). "Molecular organization of the AIDS retrovirus." *Cell* **40**: 477.

Ranki, A., K. Jarvinen, S. L. Valle, P. Nurmilaakso and K. Krohn (1990). "Antibodies to recombinant HIV-1 nef protein detected in HIV-1 infection as well as in nonrisk individuals." *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **3**(4): 348.

Re, M. C., G. Zauli and G. Visani (1991). "HIV-1 mediated inhibition of enriched hematopoietic cell (CD34+) growth." VII International Conference on AIDS, Florence : Abstract M.A. 1240.

Reiss, P., A. de Ronde, J. M. Lange, F. de Wolf, J. Dekker, C. Debouck and J. Goudsmit (1989). "Antibody response to the viral negative factor (nef) in HIV-1 infection: a correlate of levels of HIV-1 expression." *Aids* **3**(4): 227.

Robert-Guroff, M., M. Popovic, S. Gartner, P. Markham, R. C. Gallo and M. S. Reitz (1990). "Structure and expression of tat-, rev-, and nef-specific transcripts of human immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages." *J Virol* **64**(7): 3391.

Roederer, M., F. J. T. Staal, P. A. Raju, S. W. Ela, L. A. Herzenberg and A. L. Herzenberg (1990). "Cytokine-stimulated human immunodeficiency virus replication is inhibited by N-acetyl-L-cysteine." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4884.

Rosen, C. A. (1991). "Regulation of HIV expression by RNA-protein interactions." *TIG* 7: 9.

Rosen, C. A., J. G. Sodoroski and W. A. Haseltine (1985). "The location of cis acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III LTR." *Cell* 41: 813.

Rosen, C. A., E. Terwilliger, A. Dayton, J. G. Sodoroski and W. A. Haseltine (1988). "Intragenic cis-acting art gene -responsive sequences of the human immunodeficiency virus." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2071.

Ross, E. K., A. J. Buckler-White, A. B. Rabson, G. Englund and M. Martin (1991). "Contribution of NF-kB 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.

Roth, S. and W. Dröge (1987). "Regulation of T-cell activation and T-cell growth factor (TCGF) production by hydrogen peroxide." *Cell. Immunol* 108: 417.

Sakai, H., R. Shibata, J. I. Sakuragi, S. Sakuragi, M. Kawamura and A. Adachi (1993). "Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 vif protein for maturation of virus particles." *J. Virol.* 67: 1663.

Samuel, K. P., A. Seth, A. Konopka, J. A. Lautenberger and T. S. Papas (1987). "The 3'-orf protein of human immunodeficiency virus shows structural homology with the phosphorylation domain of human interleukin-2 receptor and the ATP-binding site of the protein kinase family." *Febs Lett* 218(1): 81.

Saran, M. and W. Bors (1989). "Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis." *Free Rad. Res. Comms.* 7: 213.

Schellekens, H. and M. C. Horzinek (1990). "Animal models in AIDS." Elsevier Amsterdam :

Schnittman, S. M., S. M. Denning, J. J. Greenhouse, J. S. Justement, M. Baseler, J. Kurtzberg, B. J. Haynes and A. S. Fauci (1990). "Evidence for susceptibility of intrathymic T-cell precursors and their progeny carrying T-cell antigen receptor phenotypes TCR alpha,bêta+ and TCR gamma, delta+ to human immunodeficiency virus infection: A mechanism for CD4 (T4) lymphocyte depletion." *proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7727.

Schreck, R. and P. A. Baeuerle (1991). "A role for oxygen radicals as second messengers." *Trends in Cell Biology* **1**: 39.

Schreck, R., P. Rieber and P. A. Baeueule (1991). "Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kB transcription factor of HIV-1." *EMBO J.* **8**: 2247.

Schwartz, O., F. Arenzana-Seisdedos, J. M. Heard and O. Danos (1992). "Activation pathways and human immunodeficiency virus type 1 replication are not altrered in CD4+ T cells expressing the nef protein." *Aids Res. and Hum. Retrov.* **8**: 545.

Schwartz, O., Y. Rivière, J.-M. Heard and O. Danos (1993). "Reduced cell surface expression of processed Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope glycoprotein in the presence of nef." *J. Virol.* **67**: 3274.

Schwartz, S., B. Felber and G. Pavlakis (1992). "Mechanism of translation of monocistronic and multicistronic human immunodeficiency virus type 1 mRNAs." *Mol. Cell. Biol.* **12**: 207.

Schwartz, S., B. K. Felber, E. M. Fenyo and G. N. Pavlakis (1990). "Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus are produced from multiple bicistronic mRNAs." *J. Virol.* **64**: 5448.

Schwartz, S., B. K. Felber and G. N. Pavlakis (1991). "Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is Rev-dependent and regulated by splicing." *Virology* **183**(2): 677.

Shalaby, M. R., J. F. Krowa, T. J. Gregory, S. E. Hirabayashi, S. M. MacCabe, D. S. Kaufman, D. P. Stites and A. J. Amann (1987). "The effect of human immunodeficiency virus recombinant envelope glycoprotein on immune cell functions in vitro." *Cell. Immunol.* **110**: 140.

Shaw, J. P., P. J. Utz, D. B. Durand, J. J. Toole, E. A. Emmel and G. R. Crabtree (1988). "Identification of a putative regulator of early T cell activation genes." *Science* **241**: 202.

Sheline, C. T., L. H. Milocco and K. A. Jones (1991). "Two distinct nuclear transcription factors recognize loop and buldge residues of the HIV-1 TAR RNA hairpin." *Genes Dvpt* **5**: 2508.

Siekevitz, M., S. F. Josephs, M. Dukovich, N. Peffer, F. Wong-Staal and W. Greene (1987). "Activation of the HIV-1 LTR by T cell mitogens and the Trans-activator protein of HTLV-1." *Science* **238**: 1575.

Sies, H. (1992). "Le stress oxydatif: de la recherche fondamentale à l'application clinique." *In*: GSH System. Le glutathion dans les mécanismes de défense antioxydants. G.G. Crystal, P.M. Suter, C. Voisin. Excerpta Medica, Amsterdam. :

Siliciano, R. F., T. Lawton, C. Knall, R. W. Karr, P. Berman, T. Gregory and E. L. Reinherz (1988). "Analysis of host-virus interactions in AIDS with anti-gp120 clones : effect of HIV sequence variation and a mechanism for CD4+ cell depletion." *Cell* **54**: 561.

Skowronski, J., D. Parks and R. Mariani (1993). "Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene." *EMBO* **12**: 703.

Smith, M. R. and W. C. Greene (1989). "The same 50-kDa cellular protein binds to the negative regulatory elements of the interleukin 2 receptor alpha-chain gene and the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8526.

Southgate, C. D. and M. R. Green (1991). "The HIV-1 Tat protein activates transcription from an upstream DNA-binding site: implications for Tat functions." *Genes Dev* **5**: 2496.

Spear, G. T., H. A. Kessler, L. Rothberg, J. Phair and A. L. Landay (1990). "Decreased oxidative burst activity of monocytes from asymptomatic HIV-infected individuals." *Clin. Immunol. Immunopathol.* **54**: 184.

Staal, F. J., M. Roederer, L. A. Herzenberg and A. L. Herzenberg (1990). "Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kB and transcription of human immunodeficiency virus." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9943.

Staal, F. J. T., S. W. Ela, M. Roederer, N. Anderson, L. A. Herzenberg and A. L. Herzenberg (1992). "Glutathione deficiency and human immunodeficiency virus infection." *Lancet* **339**: 909.

Staal, F. J. T., M. Roederer, P. A. Raju, M. T. Anderson, S. W. E. Leonard, L. A. Herzenberg and L. A. Herzenberg (1993). "Antioxidants inhibit stimulation of HIV transcription." *AIDS Res. Human Retroviruses* **9**: 299.

Stein, B. S., S. D. Gowda, J. D. Lifson, R. C. Penhallow, K. G. Bensch and E. G. Engleman (1987). "pH independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane." *Cell* **49**: 659.

Stevenson, M., T. L. Stanwick, M. P. Dempsey and C. A. Lamonica (1990). "HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration." *EMBO J* **9**: 1551.

Strebel, K., D. Daugherty, K. Clouse, D. Cohen, T. Folks and M. A. Martin (1987). "The HIV'A'(sor) gene product is essential for virus infectivity." *Nature* **328**: 728.

Strebel, K., T. Klimkait and M. A. Martin (1988). "A novel gene of HIV-1, vpu, and its 19-kilodalton product." *Science* **241**: 1221.

Tahtinen, M., F. Gombert, E. R. Hyytinen, G. Jung, A. Ranki and K. J. Krohn (1992). "Fine specificity of the B-cell epitopes recognized in HIV-1 NEF by human sera." *Virology* **187**(1): 156.

Takeda, A., C. U. Tuazon and F. A. Ennis (1988). "Antibody-enhanced infection by HIV-1 via Fc receptor mediated entry." *Science* **244**(580):

Talle, M. A., P. E. Rao, E. Westberg, N. Allegar, M. Makowski, R. S. Mittler and G. Goldstein (1983). "Pattern of antigenic expression of human monocytes as defined by monoclonal antibodies." *Cell. Immunol.* **78**: 83.

Terwilliger, E. F., E. A. Cohen, Y. Lu, J. G. Sodroski and W. A. Haseltine (1989). "Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5163.

Terwilliger, E. F., E. Langhoff, D. Gabuzda, E. Zazopoulos and W. A. Haseltine (1991). "Allelic variation in the effects of the nef gene on replication of human immunodeficiency virus type 1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(23): 10971.

Thérond, P. (1988). "Les radicaux libres en biologie." *Le biologiste* **174**: 97.

Tong-Starksen, S. E., P. A. Luciw and B. M. Peterlin (1987). "Human immunodeficiency virus long terminal repeat responds to T-cell activation signals." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6845.

Unger, R. E., M. L. Marthas, E. Pratt-Lowe, P. A. Padrid and P. A. Luciw (1992). "The Nef gene of Simian Immunodeficiency Virus SIVmac1A11." *J. Virol.* **66**: 5432.

Van Hille, B., N. Duponchel, N. Salome, N. Spruyt, S. F. Cotmore, P. Tattersall, J. J. Cornelis and J. Rommelaere (1989). "Limitations to the expression of parvoviral nonstructural proteins may determine the extent of sensitization of EJ-ras-transformed rat cells to minute virus of mice." *Virology* **171**: 89.

Van Noesel, C. J., R. A. Gruters, F. G. Terpstra, P. T. Schellekens, R. A. Van der Lijde and F. Miedema (1990). "Functional and phenotypic evidence for a selective loss of memory T cells in asymptomatic human immunodeficiency virus-infected men." *J. Clin. Invest.* **86**: 293.

Varmus, H. (1988). "Retroviruses." *Science* **240**: 1427.

Viscidi, R. P., K. Mayur, H. M. Lederman and A. D. Frankel (1989). "Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by tat protein from HIV-1." *Science* **246**: 1606.

von Schwedler, U., J. Song, C. Aiken and D. Trono (1993). "Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells." *J. Virol.* **67**: 4945.

Wain-Hobson, S., P. Sonigo, O. Danos, S. Cole and M. Alizon (1985). "Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV." *Cell* **40**: 9.

Weinhold, K. J., H. K. Lyerly, T. J. Matthews, D. S. Tyler, P. M. Ahearne, K. C. Stine, A. J. Langlois, D. T. Durack and D. P. Bolognesi (1988). "Cellular anti-gp120 cytotoxic reactivities in HIV-1 seropositive individuals." *Lancet* **61**: 902.

Weiss, R. A. (1991). "Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retroviruses entry." *In* J.A. Levy (ed.), *The retroviruses*, in press. Plenum Press, New York :

Weiss, R. A. (1993). "How does HIV cause AIDS." *Science* **260**: 1273.

Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin and K. Strebel (1992). "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes." *J. Virol.* **66**: 226.

Wolber, V., H. Rensland, B. Brandmeier, M. Sagemann, R. Hoffmann, H. R. Kalbitzer and A. Wittinghofer (1992). "Expression, purification and biochemical characterisation of the human immunodeficiency virus 1 nef gene product." *Eur. J. Biochem.* **205**(3): 1115.

Wong, G. H. W., J. H. Elwell, L. W. Oberley and D. V. Goeddel (1989). *Cell* **58**: 923.

Wright, C. M., B. K. Felber, H. Paskalis and G. N. Pavlakis (1986). "Expression and characterisation of the trans-activator of HTLV-III/LAV virus." *Science* **234**: 988.

Xanthoudakis, S., G. Miao, F. Wang, Y. C. E. Pan and T. Curran (1992). "Redox regulation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme." *EMBO J.* **11**: 3323.

Yao, J., F. Boisvert and E. A. Cohen (1993). "Vpu mediates HIV-1 particles release." *Keystone Symposium Q365*: 58.

Yodoi, J. and T. Uchiyama (1992). "Diseases associated with HTLV-1: virus, IL2 receptor dysregulation and redox regulation." *Immunol. Today* **13**: 405.

Yuan, X., Z. Matsuda, M. Matsuda, M. Essex and T. H. Lee (1990). "Human immunodeficiency virus vpr gene encodes a virion-associated protein." *AIDS Res. Human Retroviruses* **6**: 1265.

Zarling, J. M., J. A. Ledbetter, J. Sias, P. Fultz, G. Eichberg, G. Gjerset and P. A. Moran (1990). "HIV-infected humans, but not chimpanzees, have circulating cytotoxic T lymphocytes that lyse uninfected CD4+ cells." *J. Immunol.* **144**: 2992.

Zazopoulos, E. and W. A. Haseltine (1992). "Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Nef function." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **89**(14): 6634.

Zazopoulos, E. and W. A. Haseltine (1993). "Disulfide bond formation in the human immunodeficiency virus type 1 Nef protein." *J. Virol.* **67**: 1676.

Zazopoulos, E. and W. A. Haseltine (1993). "Effect of nef alleles on replication of human immunodeficiency virus type 1." *Virology* **194**: 20.

Zucker-Franklin, D., C. S. Termin and M. C. Cooper (1989). "Structural changes in the megakaryocytes of patients infected with HIV-1." *Am. J. Pathol.* **134**: 1295.