

**UNIVERSITE DE LILLE I  
SCIENCES ET TECHNOLOGIES**



**THESE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I**

*Discipline* : Sciences de la Vie et de la Santé

présenté et soutenue publiquement  
par

Claire GUILLERM  
le 30 avril 1998

**Titre:**

**ROLE DE LA MOLECULE CD4 DANS L'APOPTOSE  
INDUITE PAR LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE  
HUMAINE**

---

Directeur de Thèse:  
**M. Christian Devaux.**

---

**JURY**

M. J-P BOHIN, Président  
M. G. KROEMER, rapporteur  
M. A. HOVANESSIAN, rapporteur  
Mme U. HIBNER, examinateur

<b><u>I. RAPPELS CONCERNANT LE SYSTEME IMMUNITAIRE</u></b>	<b>5</b>
<b>A. DEFINITIONS</b>	<b>5</b>
<b>B. LES LYMPHOCYTES T</b>	<b>6</b>
1. ONTOGENESE	6
2. LES LYMPHOCYTES T CD8 <sup>+</sup>	6
3. LES LYMPHOCYTES T CD4 <sup>+</sup>	9
<b>C. LE ROLE CENTRAL DES LYMPHOCYTES T CD4<sup>+</sup></b>	<b>9</b>
<b><u>II. ACTIVATION DES LYMPHOCYTES T CD4<sup>+</sup></u></b>	<b>11</b>
<b>A. LE PREMIER SIGNAL D'ACTIVATION</b>	<b>11</b>
1. LE RECEPTEUR DES CELLULES T (TCR)	11
a) Structure	11
b) Conséquences d'une activation via le TCR	13
2. LA MOLECULE CD4	15
a) structure	15
b) le rôle physiologique de la molécule CD4	15
(1) une molécule d'adhésion	15
(2) rôle dans la signalisation intracellulaire	17
c) la molécule CD4 et la P56 <sup>lck</sup>	17
(1) interaction des deux molécules et rôle de cette interaction	17
(2) structure de la P56 <sup>lck</sup> et régulation de son activité	18
<b>B. LE SECOND SIGNAL</b>	<b>20</b>
<b><u>III. LES LYMPHOCYTES T CD4<sup>+</sup> CIBLES PRINCIPALES DU VIH</u></b>	<b>20</b>
<b>A. LE TROPISME CD4</b>	<b>21</b>
1. INTERACTION GP120/CD4	21
2. SIGNAUX INDUITS PAR L'INTERACTION CD4/GP120	21
3. D'AUTRES VOIES D'ENTREE DU VIRUS	22
<b>B. LES CO-RECEPTEURS</b>	<b>22</b>
<b><u>IV. LE VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE</u></b>	<b>23</b>
<b>A. LES RETROVIRUS</b>	<b>23</b>
1. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE COMMUNES DES RETROVIRUS	23
2. CLASSIFICATION DES RETROVIRUS	24
<b>B. LE VIH</b>	<b>25</b>
1. MORPHOLOGIE ET ORGANISATION GENOMIQUE DU VIH	27
a) Morphologie	27
b) Génome	27
(1) Les gènes régulateurs essentiels	27
(2) Les gènes accessoires.	28
(3) Les gènes structuraux	29
2. CYCLE DE REPLICATION DU VIH-1	32
a) fixation du virus	32
b) les étapes postérieures à la fixation et précédant la fusion	32

c) la fusion	32
d) la rétrotranscription	35
e) l'adressage nucléaire	35
f) l'intégration	36
g) la transcription	36
h) l'encapsidation	37
3. FACTEURS POUVANT INFLUENCER LA PRODUCTION VIRALE	37
a) Influence de l'activation cellulaire sur les étapes précoces du cycle	37
b) Les facteurs modulateurs de la transcription des gènes du VIH	37
4. LE SYNDROME DE L'IMMUNODEFICIENCE ACQUISE (SIDA)	40
a) La période de primo-infection	41
b) phase d'incubation asymptomatique	41
c) SIDA	41
<b>C. PHYSIOPATHOLOGIE ET EFFETS CYTOPATHOGENES DU VIH</b>	<b>42</b>
1. EFFETS DU VIRUS SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE	42
a) La persistance de la réplication virale et l'épuisement du système immunitaire	42
b) Perturbation de l'homéostasie lymphocytaire.	43
c) Défaut des fonctions présentatrices des monocytes et déséquilibre des sous-populations T CD4 <sup>+</sup>	44
2. EFFETS CYTOPATHOGENES DU VIH	45
a) Mécanismes directs entraînant la mort des cellules infectées.	45
b) Mécanismes indirects touchant également des cellules non infectées	46
<b>V. L'APOPTOSE</b>	<b>51</b>
<b>A. DEFINITIONS HISTORIQUES</b>	<b>51</b>
<b>B. CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE, GENETIQUE ET BIOCHIMIQUE DE L'APOPTOSE.</b>	<b>53</b>
1. MORPHOLOGIE	53
2. QUELQUES GENES DE L'APOPTOSE.	56
a) La famille de bcl-2	56
b) les gènes régulateurs du cycle cellulaire	58
c) l'antigène Fas et son ligand	60
d) les protéines kinases	61
e) La famille ICE	62
<b>C. ROLE DE L'APOPTOSE.</b>	<b>64</b>
1. ORIGINES DE LA MORT PROGRAMMEE	64
2. UNE PROTECTION CONTRE L'EXTENSION DE LA MALADIE	65
a) un moyen d'élimination des cellules dangereuses	65
b) Détournement du programme de mort par les virus	65
<b>VI. APOPTOSE ET VIH</b>	<b>66</b>
<b>A. OBSERVATIONS</b>	<b>66</b>
1. L'ANERGIE	66
2. L'APOPTOSE	67
a) populations cellulaires touchées	67
b) mise en évidence in vitro et in vivo	67
<b>B. MECANISMES INDUCTEURS D'APOPTOSE</b>	<b>69</b>
1. DYSFONCTIONNEMENT DES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENE	69
a) éléments de preuve	69
b) stimulation anormale des cellules T CD4 <sup>+</sup>	70

c) sécrétion anormale de cytokines	70
2. EFFETS DIRECTS DU VIRUS	70
a) interaction gp120 / CD4	72
(1) Résultats préliminaires	72
(2) Les effets de la gp120	72
b) Tat	76
c) la protéase du VIH	77
d) Vpr	77
3. EFFETS DU VIRUS SUR L'EXPRESSION DE GENES CELLULAIRES LIES A L' APOPTOSE	78
a) effet sur l'expression de Fas	78
(1) à la surface des lymphocytes T CD4 <sup>+</sup>	78
(2) à la surface des macrophages	79
b) Effets sur l'expression de Bcl-2	79
<b>C. VOIES MOLECULAIRES D'ACTIVATION DE L' APOPTOSE PAR VIH</b>	<b>80</b>
1. P56 <sup>LCK</sup>	80
2. LA VOIE FAS/ FAS-L	81
3. LA FAMILLE ICE, DES EFFECTEURS PROBABLES	81
4. LE STRESS OXYDATIF	83
<b>D. L'INHIBITION DE L' APOPTOSE A DES FINS THERAPEUTIQUES ET SES CONSEQUENCES.</b>	<b>83</b>
1. LA SUREXPRESSION DE GENES DE SURVIE: BCL-2 ET E1B19K	84
2. INHIBITION DE PROTEINES INDUCTRICES D' APOPTOSE: LES CASPASES	84
3. L'INDUCTION D' APOPTOSE: FAS-L	85
<b><u>VII. CONCLUSION</u></b>	<b>85</b>
<b><u>VIII. INTRODUCTION DE LA PARTIE EXPERIMENTALE</u></b>	<b>88</b>
<b><u>IX. LE ROLE DU DOMAINE CYTOPLASMIQUE DE LA MOLECULE CD4 DANS L' APOPTOSE INDUITE PAR VIH-1</u></b>	<b>89</b>
<b>A. INTRODUCTION</b>	<b>89</b>
<b>B.</b>	<b>91</b>
<b>C. RESULTATS- DISCUSSION</b>	<b>92</b>
1. RESULTATS OBTENUS APRES INFECTION DES CELLULES A2.01/CD4	402 94
2. A PROPOS DE L' IMPORTANCE DES INTERACTIONS P56 <sup>LCK</sup> /CD4	97
a) Infection de cellules A2.01 CD4/415	97
b) Discussion	98
<b><u>X. LE TRAITEMENT DES CELLULES CEM INFECTEES PAR UN ANTICORPS QUI BLOQUE L'EXPRESSION DES GENES VIRAUX, INHIBE L'INDUCTION D' APOPTOSE.</u></b>	<b>101</b>
<b>A. INTRODUCTION</b>	<b>101</b>
1. RESUME DES EFFETS CONNUS DE L' ANTICORPS 13B8.2	101
2. EFFET DE L' ANTICORPS 13B8.2 SUR L' APOPTOSE INDUITE PAR VIH	102
<b>B.</b>	<b>104</b>

<b>C. RESULTATS-DISCUSSIONS</b>	<b>105</b>
1. L'ANTICORPS 13B8.2 INHIBE L'APOPTOSE INDUITE PAR VIH	105
2. L'ANTICORPS 13B8.2 INHIBE L'APOPTOSE INDUITE PAR L'ENVELOPPE EXPRIMEE A LA SURFACE CELLULAIRE	105
3. EFFET DE L'ANTICORPS 13B8.2 SUR D'AUTRES STIMULI INDUCTEURS D'APOPTOSE.	108
4. REMARQUES	108
<b>D. RESULTATS COMPLEMENTAIRES</b>	<b>110</b>
<b>E. LE PARADOXE DU MECANISME D'ACTION DE L'ANTICORPS 13B8.2</b>	<b>110</b>
<b><u>XI. EXPERIENCES COMPLEMENTAIRES A PROPOS DU ROLE DE FAS DANS L'APOPTOSE INDUITE PAR VIH</u></b>	<b>111</b>
<b>A. FAS ET CD4</b>	<b>111</b>
<b>B. L'APOPTOSE INDUITE PAR VIH N'EST PAS BLOCABLE PAR UN ANTICORPS IGG ANTI-FAS</b>	<b>113</b>
<b><u>XII. BIBLIOGRAPHIE</u></b>	<b>116</b>

# ANNEXE

## des

### ABREVIATIONS

#### Abréviations générales:

aa:	Acide aminé
Ag:	Antigène
ADCC:	Antibody dependent cellular cytotoxicity
ADN:	Acide Désoxyribonucléique
ARN:	Acide Ribonucléique
ARNm:	ARNmessenger
ARNt:	ARN de transfert
Asp:	acide aspartique
ATP:	Adénosine Triphosphate
BCR:	Récepteur d'antigène des Cellules B
Caspase:	« cysteinyl aspartate-specific proteinase-1 »
CD:	Classe de Différenciation
CDR:	« complementary determining region »
CMH:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA:	Cellule Présentatrice d'Antigène
DAG:	di-acyl glycérol
Fas-L:	ligand de Fas
Glu:	Acide glutamique
gp:	Glycoprotéine
ICE:	« Interleukine 1 $\beta$ converting enzyme »
Ig:	Immunoglobuline
LFA:	« Lymphocyte Function-associated Antigen »
LTR:	« Long Terminal Repeat »
MAP kinase:	« Mitogen Activated protein kinase »
MKK:	MAP kinase kinase
NK:	« Natural Killer »

NRE:	« Negative Regulatory Element »
PARP:	Poly-ADP-ribose
PBMC:	« Peripheral blood mononuclear cells »
PLC:	phospho-lipase C
PMA:	Phorbol 12-Myristate 13-acétate
PKC:	Protéine Kinase C
RE:	Réticulum endoplasmique
RRE:	« Rev responsive element »
TdT:	Terminal dinucleotidyl transferase »
TCR:	Récepteur d'antigène des cellules T
Th:	cellule T « helper »
Thr:	thréonine
TRAIL:	« TNF-related apoptosis-inducing ligand »
Trp:	tryptophane
TUNEL:	« terminal dUTP nick end labeling »
z-VAD:	Benzyloxycarbonyl Val-Ala- Asp (OMe) Fluoromethylketone

### **Facteurs de transcription:**

API:	Protéine activatrice-1
COUP-TF:	« Chicken Ovalbumine Upstream Promoter-Transcription Factor »
LBP:	« Leader Binding Protein »
NF-AT:	« Nuclear Factor-Activated T cells »
TAF:	« TBP Associated Factor »
TCF:	« Ternary Complex Factor »
USF:	« Upstream Stimulatory Factor »

### **Cytokines et facteurs de croissance:**

EGF:	facteur de croissance des cellules épidermiques
GM-CSF:	facteur de croissance des granulocytes et des macrophages
IL-:	Interleukines
IFN:	Interféron
PDGF:	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
TNF:	« Tumor necrosis Factor »

PREMIERE PARTIE:  
INTRODUCTION

# I. RAPPELS CONCERNANT LE SYSTEME IMMUNITAIRE

## A. Définitions

Le système immunitaire constitue un ensemble de mécanismes qui permettent à un organisme pluricellulaire d'assurer son intégrité face aux germes qui l'environnent. D'une façon générale, la réaction d'un organisme vis à vis du non soi se traduit à la fois par une réponse non spécifique, dite naturelle ou innée, et d'une réponse spécifique ou acquise. Classiquement, l'immunité est dite spécifique lorsqu'elle met en jeu des effecteurs capables de reconnaître les antigènes au niveau de déterminants antigéniques conduisant à leur mémorisation. La reconnaissance spécifique des antigènes est la caractéristique essentielle du système immunitaire.

### • Immunité non spécifique

L'organisme dispose donc d'une première ligne de défense mise en place rapidement dans le cas d'une infection par un micro-organisme.

Ces mécanismes de défense sont variés:

-le complément est activé par l'entrée dans l'organisme, d'un microorganisme qui peut-être une bactérie, une levure ou un virus. Cette activation entraîne le développement d'une réaction qui limite l'extension de l'infection. Après leur phagocytose par les polynucléaires et les macrophages, les micro-organismes opsonisés par le complément activé sont détruits.

-Dans le cas d'une infection virale, les cellules infectées produisent de l'interféron (IFN $\alpha$  et  $\beta$ ) qui inhibe la réplication virale dans les cellules hôtes.

-Enfin, la fièvre constitue également un mécanisme de défense non spécifique.

### • Immunité spécifique

L'immunité spécifique intervient plus tardivement. Son fonctionnement est basé sur deux populations de cellules effectrices, les **lymphocytes B** et les **lymphocytes T** capables de reconnaître un antigène par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique (TCR pour les lymphocytes T et BCR pour les lymphocytes B).

Si les lymphocytes B peuvent reconnaître un antigène sous forme soluble *via* leurs immunoglobulines (Ig) de membrane, les lymphocytes T nécessitent, pour qu'un antigène soit reconnu, que les protéines du non soi aient subi une étape de fragmentation intracellulaire. L'antigène se présente alors à la surface des cellules, sous forme d'un fragment peptidique d'une dizaine d'acides aminés, associé aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'association d'un peptide avec une molécule du

CMH de classe I ou de classe II permet alors une reconnaissance par le TCR. On appelle cette étape: la présentation de l'antigène.

## **B. Les lymphocytes T**

### **1. Ontogenèse**

Les cellules précurseurs des lymphocytes T migrent dans le thymus où elles subissent une série d'étapes de différenciation qui s'accompagnent de l'acquisition ou à la perte d'antigènes de membrane:

-les premières cellules, dites prothymocytes, issues de la moelle osseuse, présentent à leur surface la molécule CD7 et au niveau du cytoplasme la molécule CD3.

-Elles migrent dans le cortex thymique où elles acquièrent les antigènes CD1, CD2, CD5, CD25 (la chaîne  $\alpha$  du récepteur de l'interleukine 2), et surtout les molécules CD4 et CD8, les cellules immatures étant de ce fait doublement positives ( $CD4^+ CD8^+$ ).

-En migrant ensuite dans la région médullaire thymique, les thymocytes expriment en surface la molécule CD3 mais perdent la molécule CD1. A ce stade, ces cellules acquièrent aussi le récepteur T pour l'antigène (TCR) et subissent ce que l'on appelle la sélection thymique, c'est à dire l'élimination des cellules auto-réactives (capables de répondre contre des cellules du soi), ainsi que des cellules dont le récepteur n'est pas assez affin pour l'antigène. On estime ainsi que seules 15% des cellules T survivent aux processus de sélection (Nossal, 1994).

-Les cellules T se différencient ensuite en deux populations principales présentant à leur surface soit l'antigène CD4, soit l'antigène CD8 (cellules matures simples positives).

-Elles migrent alors dans le compartiment périphérique où elles perdent la molécule CD25 mais acquièrent la molécule CD28.

### **2. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>**

expriment le marqueur de différenciation CD8 et reconnaissent l'antigène associé à des molécules de classe I du CMH exprimées sur tous les types de cellules. Ces antigènes peuvent être des molécules virales.

Leur fonction est principalement une fonction **cytotoxique**, c'est à dire de destruction des cellules présentant à leur surface des antigènes différents du soi, telles que des cellules tumorales ou des cellules infectées par un virus et qui expriment donc des antigènes viraux à leur surface.

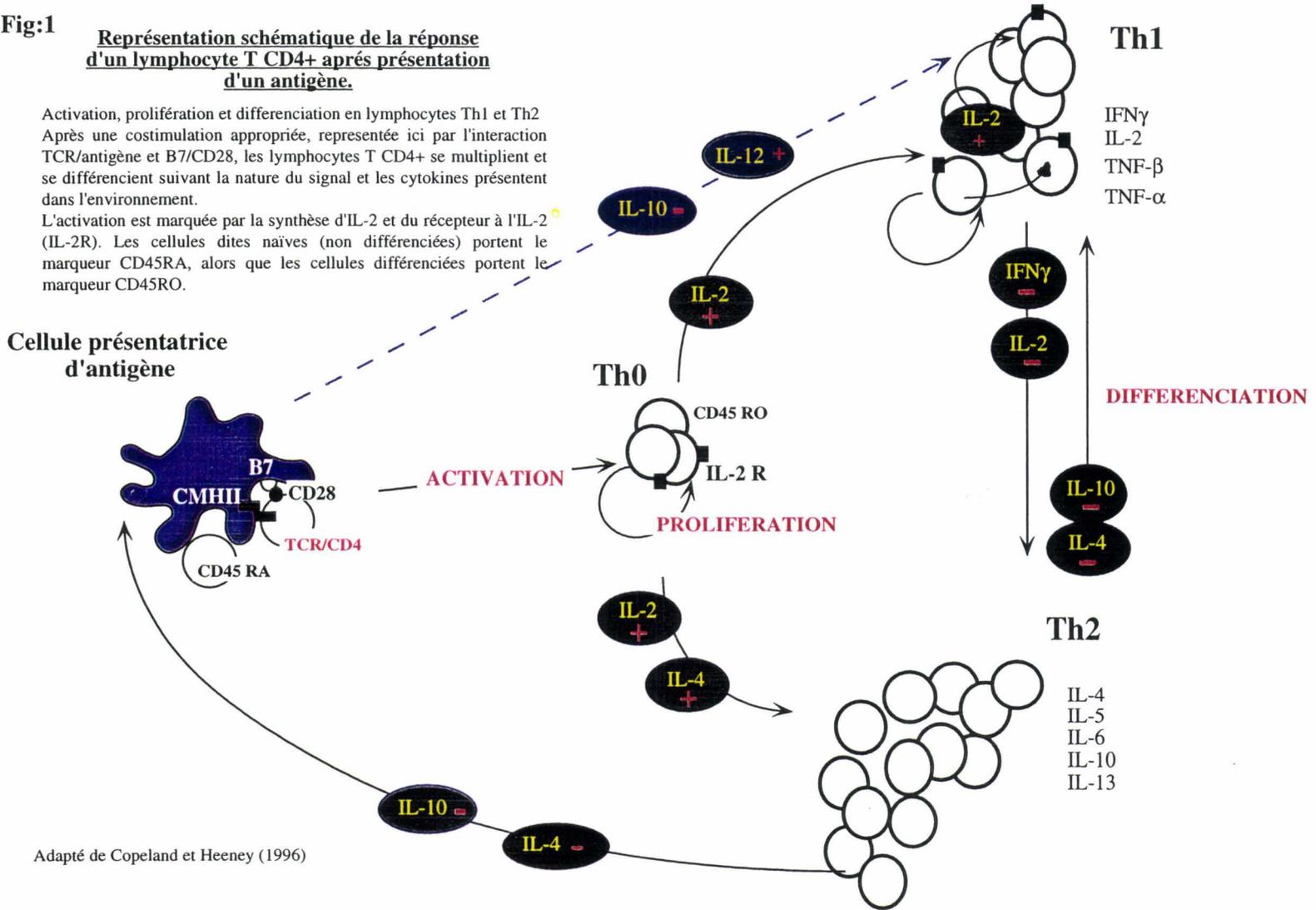
Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> stimulés produisent essentiellement de l'IFN $\alpha$ , accompagné de quantités variables d'IL-2 et modérées de GM-CSF, d'IL-3 et de TNF $\alpha$  et  $\beta$ .

Fig:1

**Représentation schématique de la réponse d'un lymphocyte T CD4+ après présentation d'un antigène.**

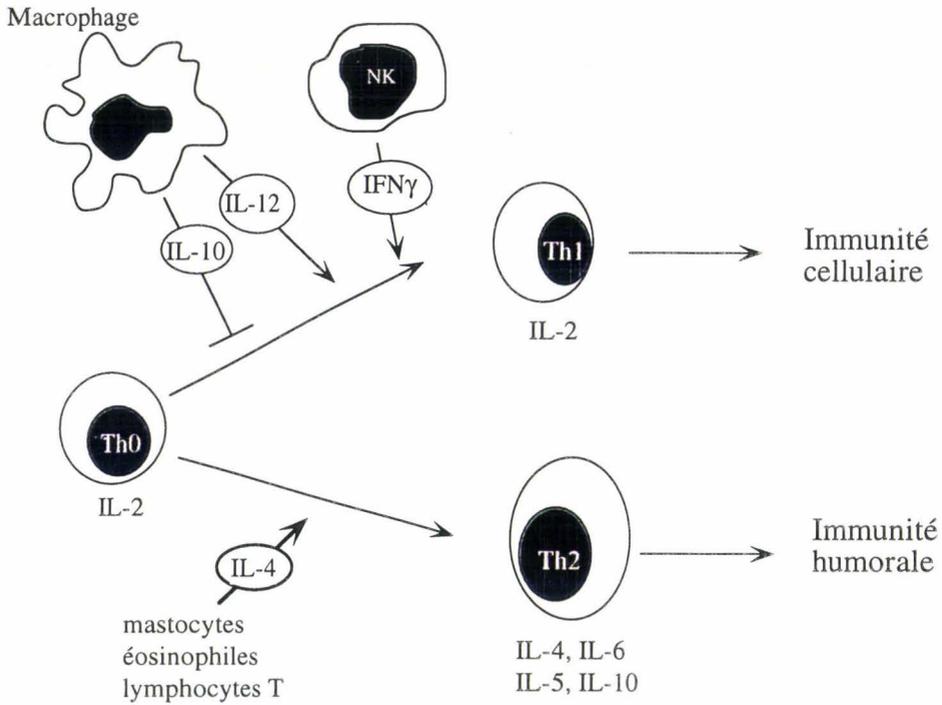
Activation, prolifération et différenciation en lymphocytes Th1 et Th2  
Après une costimulation appropriée, représentée ici par l'interaction TCR/antigène et B7/CD28, les lymphocytes T CD4+ se multiplient et se différencient suivant la nature du signal et les cytokines présentes dans l'environnement.

L'activation est marquée par la synthèse d'IL-2 et du récepteur à l'IL-2 (IL-2R). Les cellules dites naïves (non différenciées) portent le marqueur CD45RA, alors que les cellules différenciées portent le marqueur CD45RO.

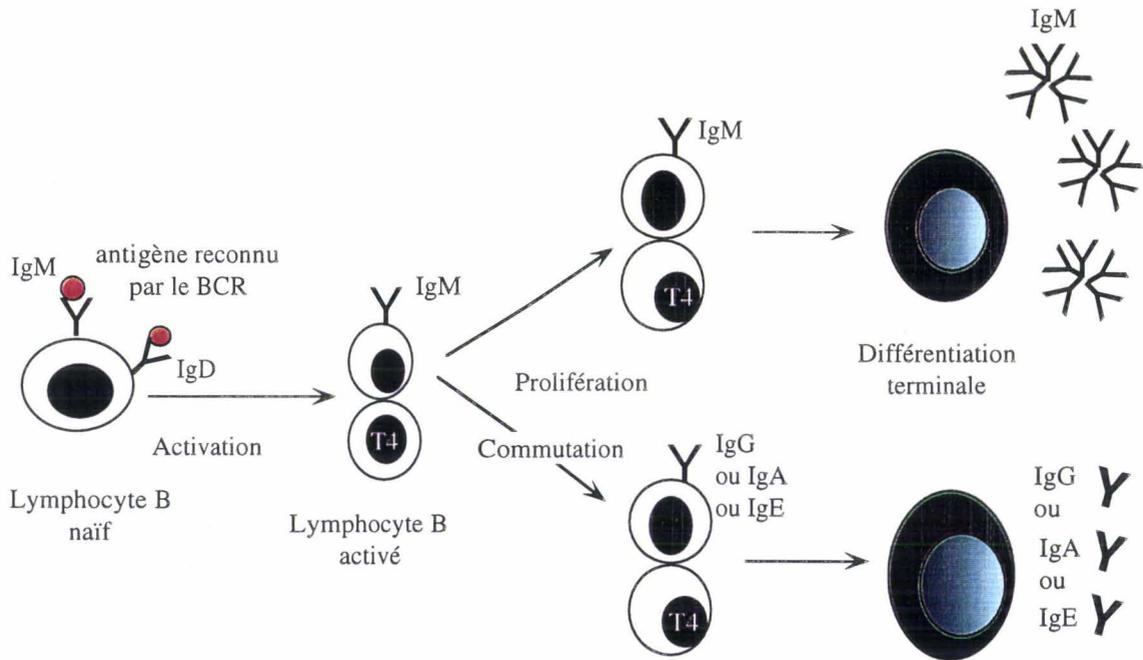


Adapté de Copeland et Heeney (1996)

**Fig: 2**



**Différenciation des cellules T auxiliaires:** Les cellules Th0 sous l'influence de l'IL-12 et /ou l'IFN $\gamma$  se différencient en cellules Th1 alors que la différenciation de ces mêmes cellules vers Th2 nécessite la présence d'IL-4.



**Schéma de la fonction d'aide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans la réponse des lymphocytes B**

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en interagissant avec les lymphocytes B activés, par les interactions TCR-CD4/Ag-CMH, CD28/B7, produisent des cytokines comme l'IL-2 ou l'IL-4. Ces cytokines induisent la prolifération clonale des lymphocytes B et la production d'IgM, ainsi que la commutation vers la production d'IgE, d'IgG ou d'IgA selon le contexte.

### 3. les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

expriment le marqueur de différenciation CD4 et sont restreints aux molécules de classe II (les molécules de classe II du CMH sont exprimées essentiellement par des cellules du système immunitaire: les lymphocytes B, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>). Ces lymphocytes, dits **auxiliaires** (helper), constituent une sous-population majoritaire des lymphocytes T puisqu'ils représentent 50 à 65% d'entre eux.

On distingue deux types de sous-populations de lymphocytes T auxiliaires, après stimulation, selon la nature des cytokines produites:

-les cellules **Th1** (T helper 1) sécrètent de l'IL-2, de l'IFN $\alpha$ , de l'IFN $\gamma$  et du TNF $\beta$

-les cellules **Th2** se distinguent par une production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6 et d'IL-10.

Le GM-CSF et le TNF $\alpha$  sont produits par les deux types de sous-population mais en quantité plus importante par les cellules Th1 (*cf figure 1*).

Les différentes cytokines produites confèrent aux cellules qui les produisent des fonctions bien distinctes (Abbas et al., 1996).

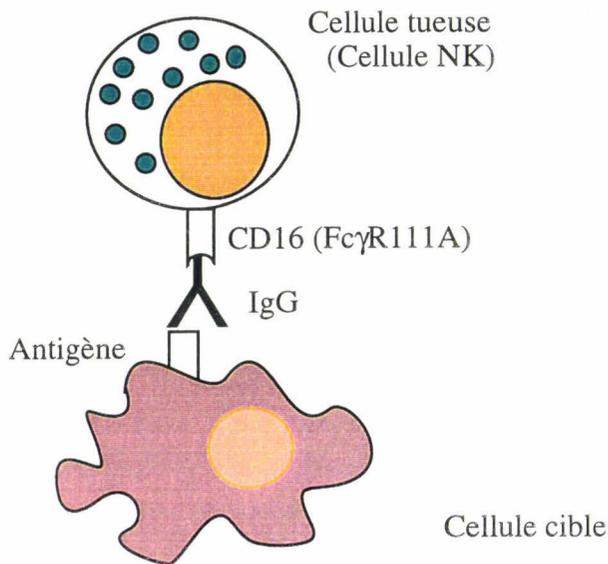
#### C. Le rôle central des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

D'une manière générale, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> contrôlent la spécificité de la réponse immune en déterminant les antigènes reconnus, ils stimulent la prolifération des cellules effectrices et la fonction des phagocytes. D'autre part, l'orientation vers une sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> donnée est déterminante pour le choix des mécanismes effecteurs dirigés contre les antigènes cibles:

-la production d'IL-12 par les macrophages conduit à la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> en cellules Th1 qui induisent une réponse à médiation cellulaire. Dans ce cas, les principales cellules effectrices sont: les cellules T cytotoxiques (dont 10% sont des cellules T CD4<sup>+</sup>), les cellules NK (natural killer). La stimulation des macrophages par la sous-population Th1 conduit à une réaction d'hypersensibilité retardée.

-la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en cellules Th2 nécessiterait de l'IL-4 qui peut provenir des mastocytes, des basophiles ou encore d'autres lymphocytes T (Scott, 1993). Les cellules Th2 induisent une réponse à médiation humorale. Elles sont impliquées dans la coopération avec les cellules B aboutissant à une production d'anticorps, notamment des IgE (*cf figure 2*).

En réalité, la situation n'est jamais dichotomique et de nombreuses situations sont intermédiaires, ou font participer les 2 types de sous-populations. L'ADCC notamment



**Fig:3**

**Réaction de cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC)**

L'anticorps fixé sur l'antigène (ex: antigène viral d'une cellule infectée) est reconnu par les récepteurs (CD16) des fragments Fc des cellules tueuses. Ce récepteur est de faible affinité.

Les cellules NK constituent le troisième type de lymphocytes. Elles sont essentiellement circulantes et représentent 5 à 15% des lymphocytes sanguins. Elles n'expriment ni le récepteur T, ni le récepteur B, mais CD16 et CD56 (NCAM, une molécule d'adhésion).

(cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante d'anticorps) nécessite la stimulation de la production d'anticorps spécifiques, et la prolifération des cellules cytotoxiques qui reconnaissent les fragments Fc des IgG fixées sur les antigènes de surface des cellules cibles (cf **figure 3** d'après Granel, 98). La distinction de deux sous populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> peut paraître simpliste, et ce schéma est parfois contredit. Néanmoins certains modèles pathologiques, où l'une des réponses est bénéfique alors que l'autre est pathogène, corroborent l'idée de l'existence de deux sous-populations (Abbas et al., 1996).

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> constituent donc les principaux modulateurs de la réponse immune, et jouent un rôle central auprès des autres cellules effectrices du système immunitaire.

## **II. Activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

### **A. le premier signal d'activation**

#### **1. Le récepteur des cellules T (TCR)**

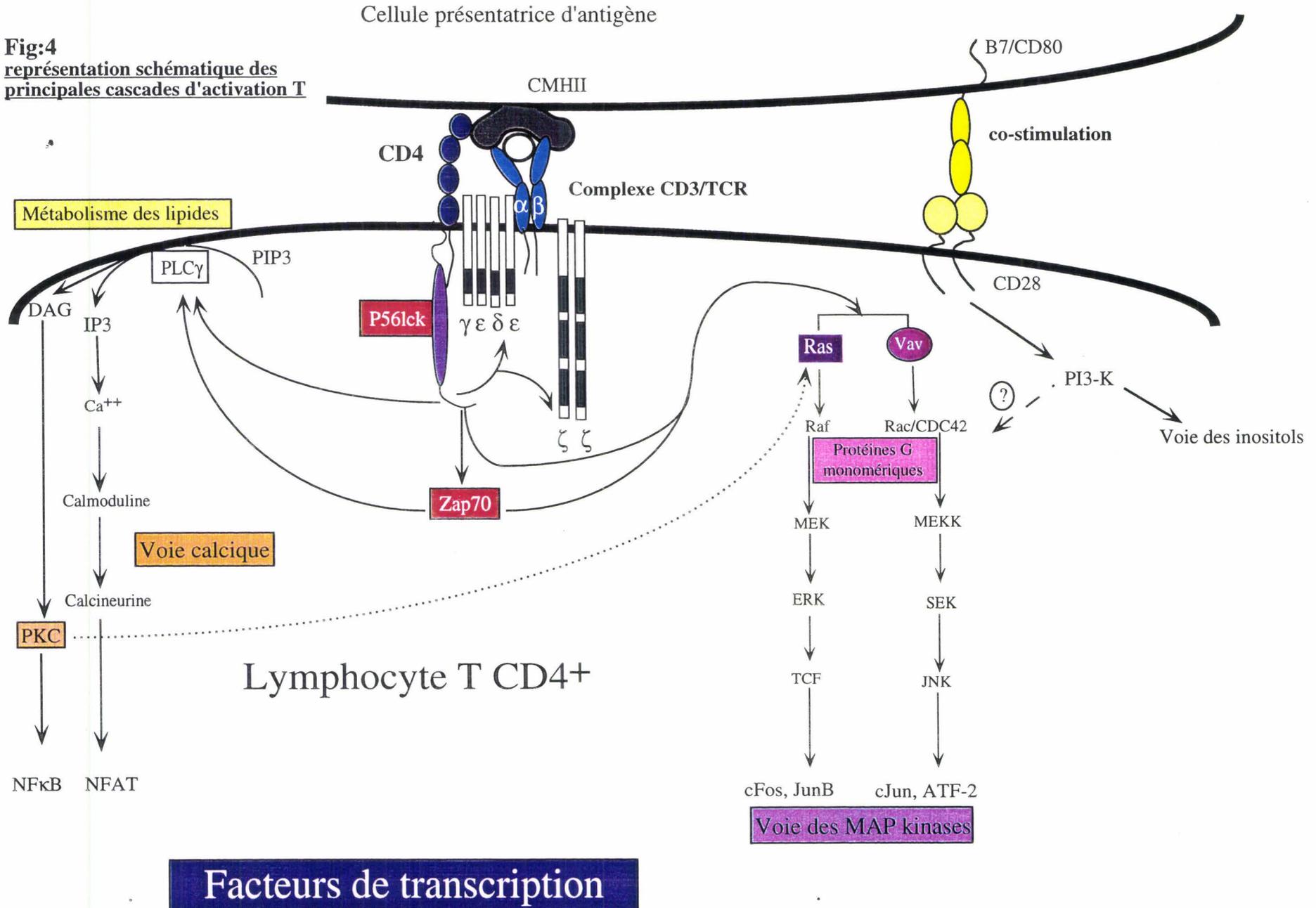
Les lymphocytes T expriment à leur surface une catégorie particulière de récepteur grâce à laquelle ils reconnaissent de manière spécifique une grande variété d'antigènes protéiques. Ce récepteur est appelé TCR pour "T Cell Receptor". Il permet la transduction d'un premier signal nécessaire à l'activation T. Pour que cette activation soit complète et conduise à une prolifération clonale, un second signal est nécessaire. Celui-ci est délivré par des molécules situées à la surface des cellules présentatrices d'antigène.

##### **a) Structure**

Schématiquement, le TCR se compose de 2 groupes distincts de molécules: un hétérodimère T<sub>i</sub> porteur de la spécificité antigénique et une structure invariante CD3, elle-même composée de 5 protéines ( $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , le doublet  $\zeta\zeta$  ou  $\zeta\eta$ ).

- Le premier composant (TCR) est formé de protéines capables de reconnaître spécifiquement les structures étrangères grâce à un site spécialisé "paratope" capable de se combiner à un site "épitope" situé sur la molécule étrangère. La structure du paratope présente une hypervariabilité qui permet à ces protéines de reconnaître toute structure antigénique et de s'y associer. Le message de cette association est alors transmis au second composant.
- Le second composant (CD3) est formé d'un complexe protéique membranaire de structure conservée, dont la fonction est de transduire vers le cytoplasme et le noyau

**Fig:4**  
**représentation schématique des**  
**principales cascades d'activation T**



une série complexe de signaux biochimiques déclenchant la réponse cellulaire appropriée.

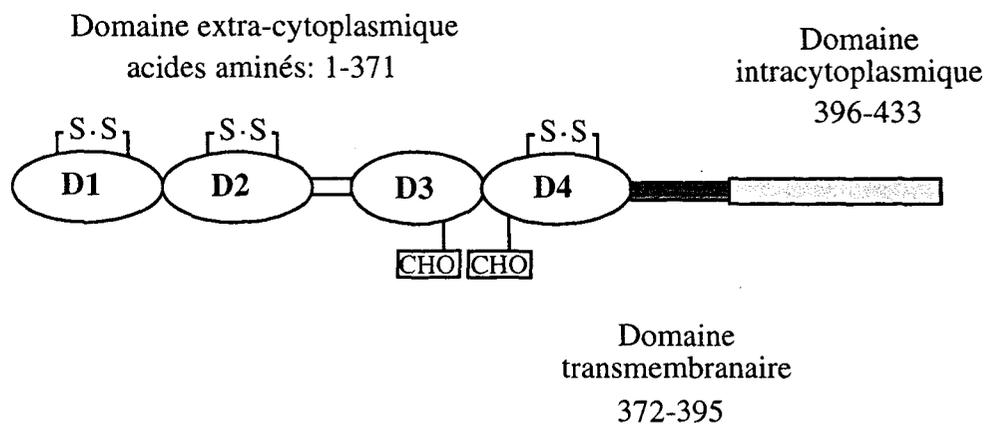
### *b) Conséquences d'une activation via le TCR*

L'interaction du TCR avec l'antigène ou un anticorps anti-TCR conduisent à de rapides changements intracellulaires et phénotypiques qui caractérisent l'activation des lymphocytes T-auxiliaires et T cytotoxiques. Au niveau biochimique, cette réponse est accompagnée d'une augmentation soudaine du niveau intracellulaire de phosphorylation des tyrosines et des protéines tyrosine kinases (PTK). Celle-ci est nécessaire au bon déroulement des événements suivants l'activation T, incluant la stimulation du recyclage des phospho-inositols, l'augmentation du  $Ca^{++}$  intracellulaire, la sécrétion de lymphokines, et la mitogénèse.

Le complexe TCR/CD3 ne possède pas par lui-même de propriété catalytique capable d'induire la phosphorylation des PTK. Les différentes chaînes constituant la molécule CD3 possèdent dans leur partie cytoplasmique des séquences qui permettent le couplage du TCR aux PTK intracellulaires. Ces motifs sont appelés ARAM pour "Antigen Recognition Activation Motif".

Par ces domaines, l'engagement du TCR conduit à la génération de seconds messagers qui permettent l'amplification du signal (*cf figure 4*). Plusieurs familles de protéines sont impliquées dans ce processus:

- des PTK dont **lck**, **fyn**, **zap 70**, et **syk** qui entraînent la phosphorylation de nombreuses protéines au niveau de résidus tyrosine;
- des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides et responsables de la synthèse de phospholipides, telles que la **PLC $\gamma$**  et la **PI3K**;
- des protéines régulées par l'augmentation du taux de calcium intracellulaire, telles que la **protéine kinase C**, la **calmoduline** ou la **calcineurine**;
- des protéines impliquées dans l'activation des protéines G monomériques: **Ras** et les protéines qui régulent son activité comme **Sos** ou **P120Ras-GAP**, ainsi que les protéines en aval de Ras telles que les protéines sérine/thréonine kinases constituant la voie des MAP Kinases (Mitogen Activated protein kinases): **raf**, **MAPKK** ou **MEK** et **MAPK** ou **ERK** (extracellular signal regulated kinase).
- Les protéines de la famille Rho (CDC42 et Rac1) et les protéines qui régulent leur activité (Vav et p190 Rho-GAP) sont également activées par la stimulation du TCR. Ces protéines activent une voie de signalisation parallèle à la voie des MAP kinases constituée par les protéines **PAK** et **JNK/SAPK** (pour revue: Fraser et al., 1993; Weiss and Littman, 1994; Weil and Veillette, 1996).



**Fig:5**

Structure schématique de la molécule CD4:

Les domaines D1-D4 correspondent aux 4 domaines homologues  
 aux domaines caractérisant les immunoglobulines.  
 S-S indique la localisation des ponts disulfures, et CHO la liaison  
 avec les chaînes glucidiques.

D'après M. Marsh et A. Pelchen-Matthews.

Bien que l'ordre précis du recrutement et de l'activation des différentes PTK suivant l'induction du TCR ne soit pas entièrement déterminé, les données suggèrent que lck et fyn initieraient la phosphorylation précoce des résidus tyrosine conduisant à la phosphorylation de la chaîne  $\zeta$ . Zap70 est également recrutée à la membrane après son interaction avec les chaînes  $\epsilon$  et  $\zeta$  (Ravichandran et al., 1996).

## 2. La molécule CD4

### a) *structure*

La molécule CD4 est une glycoprotéine transmembranaire de 58 kDa. Sa structure a d'abord été étudiée à partir de sa séquence d'ADN complémentaire, puis plus récemment par cristallographie.

Globalement, la séquence codant pour la molécule CD4 présente des homologies avec celles des protéines de la superfamille des Immunoglobulines (Ig), avec cependant quelques divergences (Maddon et al., 1985). Comme les Ig, la partie extracytoplasmique de la molécule est composée de 4 domaines de D1 à D4 (*cf fig 5*). Au niveau du domaine D1, on retrouve des régions qui s'apparentent aux régions CDR des Ig (régions hypervariables qui forment le site de combinaison antigénique), même si la structure en acides aminés de la molécule CD4 est, elle, invariante. Une différence notable établie par comparaison de séquences se situe au niveau du pont dissulfure entre les feuillets  $\beta$  conservé dans les Ig. Ce pont est inexistant au niveau du domaine D3, et localisé de façon inhabituelle au niveau du domaine D2, (pour revue: Brady and Barclay, 1996).

La cristallographie par rayon X a permis de confirmer les prédictions effectuées à partir de l'ADNc et d'aller plus loin dans la description de la structure de CD4. Ainsi, il a pu être montré que les domaines 1 et 3 sont plutôt similaires aux régions variables des anticorps, tandis que les domaines 2 et 4 ont une taille proche de celle des domaines conservés, avec certaines régions similaires aux domaines variables (Williams and Barclay, 1988).

### b) *le rôle physiologique de la molécule CD4*

#### (1) *une molécule d'adhésion*

A l'origine, la molécule CD4 a été identifiée comme marqueur phénotypique de certains lymphocytes (Reinherz et al., 1979). L'inhibition de fonctions effectrices T *in vitro* par l'utilisation d'anticorps anti-CD4 a ensuite permis d'affirmer qu'il existait une fonction pour la molécule CD4 dans la réponse T. Enfin des expériences d'inhibition de cytolyse de cellules cibles, toujours au moyen d'anticorps anti-CD4, en empêchant la formation de



conjugués, ont mis en évidence le rôle d'adhésion de la molécule CD4 (Spits et al., 1982). En effet, la capacité des anticorps anti-CD4 à inhiber la formation des conjugués est inversement proportionnelle à l'avidité de la cellule T pour la cellule présentatrice d'antigène suggérant que lorsque l'avidité de la cellule T pour l'antigène et CMH de classe II est basse, l'interaction CD4/CMHII devient critique. Ainsi, la molécule CD4 intervient comme co-récepteur "accessoire" dans la réponse immune. Elle augmente l'avidité de l'association entre la cellule T et la cellule présentatrice d'antigène, en interagissant avec les portions non polymorphiques du complexe formé par les régions proximales de la molécule du CMHII et les molécules du TCR (Doyle and Strominger, 1987). Le rôle joué par la molécule CD4 est d'autant plus important que l'affinité de l'antigène pour le TCR est faible.

## (2) rôle dans la signalisation intracellulaire

De nombreuses observations ont permis d'affirmer que la molécule CD4 peut transduire des signaux intracellulaires durant l'activation T. Notamment, des expériences de ligation de la molécule CD4 avec le complexe TCR/CD3 ont montré que la molécule CD4 augmente significativement l'intensité de l'activation, par rapport au TCR ligué seul. La capacité de CD4 à participer activement au signal de transduction a vraiment été mise en évidence par les travaux de Sleckman et al (Sleckman et al., 1988) qui ont démontré que l'optimisation de l'activation T résultant de l'expression de CD4 pouvait être empêchée par délétion du domaine cytoplasmique de CD4 ou par remplacement des domaines cytoplasmique et transmembranaire par un glycoposphatidylinositol. La molécule mutée CD4/glycoposphatidylinositol a la même avidité pour le CMHII que le CD4 sauvage. Dans le contexte d'une activation T, la transduction des signaux *via* CD4 passe aussi par l'association physique des molécules CD4 et des molécules du TCR. Cela a pu être mis en évidence par des expériences de "cocapping". Cette association est également complètement dépendante du domaine cytoplasmique de CD4 mais aussi de l'association de la P56<sup>lck</sup> avec le domaine intracytoplasmique de CD4.

## c) la molécule CD4 et la P56<sup>lck</sup>

### (1) interaction des deux molécules et rôle de cette interaction

La p56<sup>lck</sup> est une PTK de la famille src spécifique des lymphocytes. Elle est située sur la face interne de la membrane des lymphocytes T grâce à sa séquence N-terminale myristyllée. Elle se fixe à la région intracytoplasmique de la molécule CD4 au niveau 32 acides aminés N-terminaux de façon non covalente. Cette interaction avec la partie intracytoplasmique de la molécule CD4 se fait par deux résidus cystéine (Shaw et al., 1990) (*cf figure 6*).

D'une part, elle joue un rôle dans le renouvellement des molécules CD4 à la surface cellulaire. La formation du complexe CD4/P56<sup>lck</sup> stabilise la molécule CD4 à la surface membranaire et empêche son endocytose (Pelchen-Matthews et al., 1991; Pelchen-Matthews et al., 1992).

D'autre part, elle participe à l'amplification du signal d'activation T. La ligation de la molécule CD4 avec un anticorps monoclonal entraîne une rapide augmentation du niveau de phosphorylation des résidus tyrosine et sérine de la P56<sup>lck</sup> au niveau, de même qu'une augmentation de son activité (Veillette et al., 1989).

## (2) structure de la P56<sup>lck</sup> et régulation de son activité

### Structure

La p56<sup>lck</sup>, comme les autres membres de la famille src comporte des domaines structuraux multiples indépendants.

Ils incluent, du NH<sub>2</sub>-t au COOH-t:

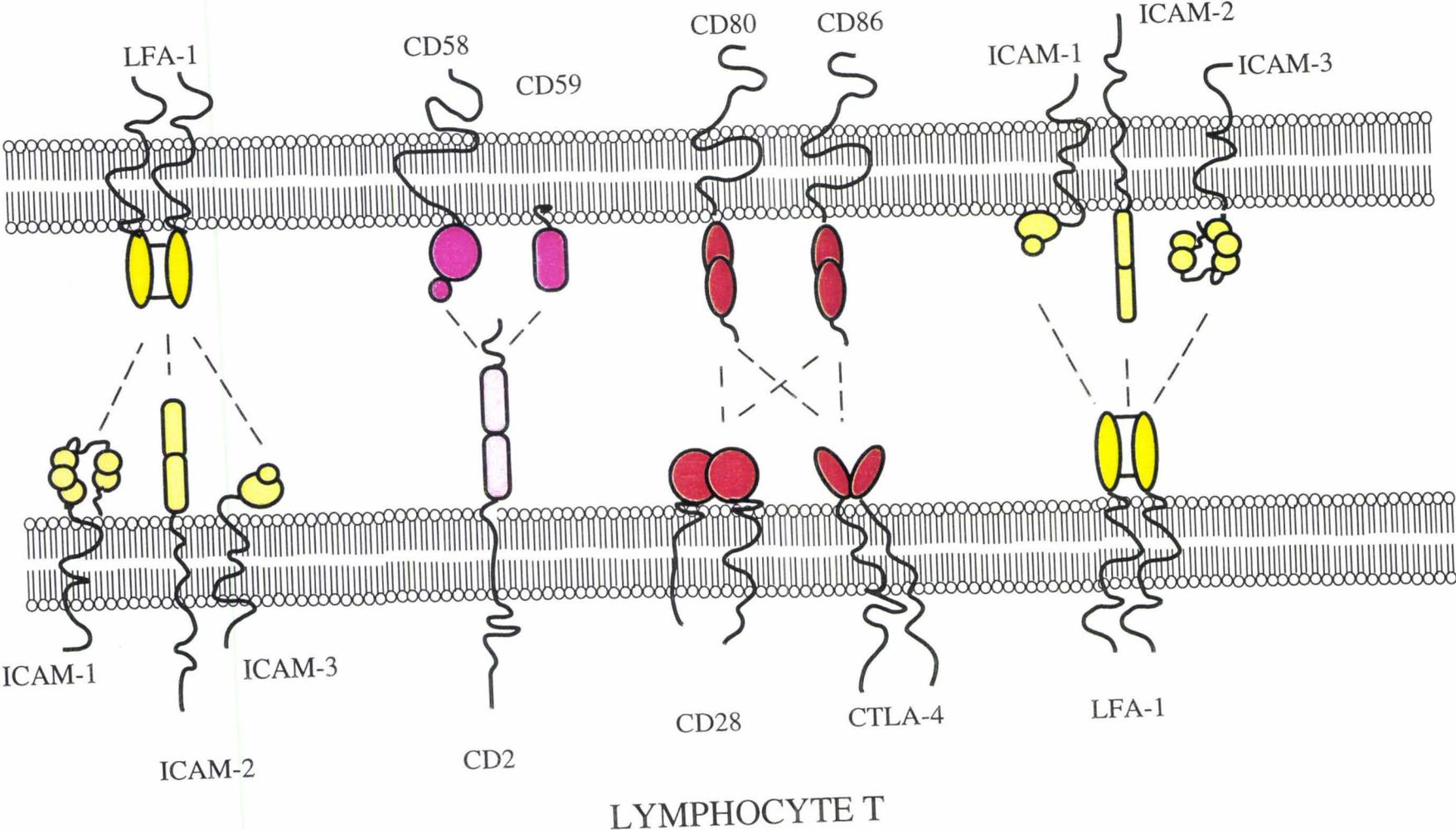
- des sites de myristylation et de palmitoylation qui permettent une association stable avec la membrane plasmique interne
- un domaine unique de 60 acides aminés, conférant à p56<sup>lck</sup> sa capacité à s'associer à CD4 ou CD8 (Shaw et al., 1989)
- un domaine d'homologie src, SH3, qui permet son interaction avec les protéines riches en proline impliquées dans l'amplification de signal,
- un domaine SH2 qui peut se fixer à des peptides contenant des domaines phosphotyrosines
- un domaine catalytique incluant un site pour la fixation de l'ATP, le transfert de phosphate et l'autophosphorylation, un domaine de régulation négatif COOH-t qui porte le site principal de phosphorylation de tyrosine.

### Régulation

Comme c'est le cas pour les autres enzymes de la famille src, l'activité de p56<sup>lck</sup> est d'abord régulée par phosphorylation de résidus tyrosine. Plus précisément, l'activité catalytique de p56<sup>lck</sup> est dictée par la balance entre l'action des kinases et des phosphatases qui régulent la phosphorylation du résidu tyrosine 505, situé en C-terminal. La phosphorylation de celui-ci par une PTK telle que p50<sup>csk</sup> réprime l'activité catalytique de p56<sup>lck</sup>. Cet effet inhibiteur résulterait de la capacité de la tyrosine 505 à participer à une association intramoléculaire avec le domaine SH2 (Amrein et al., 1993).

La déphosphorylation du résidu tyrosine 505 est médiée par CD45, une phosphatase transmembranaire abondamment exprimée dans les cellules hématopoïétiques (Sieh et al., 1993). Cette déphosphorylation de la tyrosine 505 est probablement critique pour l'initiation du signal médié par le TCR.

# CELLULE PRESENTATRICE D'ANTIGENE



**Fig:7**  
**Molécules impliquées dans le second signal nécessaire à l'activation T**

Il existe également un mode de régulation positif. Il s'agit de l'autophosphorylation du résidu tyrosine 394 (Abraham and Veillette, 1990). Ce résidu est peu phosphorylé dans les cellules T quiescentes.

### **B. Le second signal**

Pour une activation T complète, deux signaux sont nécessaires: le signal spécifique médié par le complexe TCR/antigène/ CMH et un second signal délivré par des molécules costimulatrices (Chambers and Allison, 1997). Les principales molécules impliquées dans le second signal ainsi que leur ligand sont décrites sur le *schéma 7*. En l'absence de ce cosignal, l'activation T peut être très fortement perturbée, et après une deuxième stimulation, les cellules T ne répondent plus et deviennent "anergiques" (Schwartz, 1996).

Brièvement, le second signal peut-être transmis de deux manières.

- d'une part par le renforcement de l'interaction TCR/CPA.

C'est par ce mécanisme qu'agissent LFA-1 et son ligand ICAM-1. La reconnaissance de l'antigène par le complexe TCR active la PLC $\gamma$ 1 qui hydrolyse le phosphatidyl-inositol biphosphate en IP3 et DAG. Ce dernier active la PKC qui, en phosphorylant la chaîne  $\beta$  de LFA-1, induit une augmentation de l'affinité de ICAM-1 pour LFA-1. L'interaction CPA/cellule T est alors renforcée et le temps de contact des cellules est augmenté.

- d'autre part par l'amplification du signal de transduction et la synthèse de seconds messagers.

C'est par ce mécanisme qu'agissent CD2 et LFA-3. Le contact des deux molécules induit une augmentation de la concentration en Ca<sup>++</sup> intracellulaire et active la voie des phospho-inositols, ce qui amplifie le premier signal transduit par le complexe TCR. L'interaction entre CD28 et B7 active la phosphatidyl-inositol 3-kinase qui contrôle le métabolisme des phospho-inositols. Le signal transduit par CD28 permettrait par ce biais de réduire le nombre minimal de molécules de TCR nécessaire à l'activation T (Bachmann et al., 1997).

## **III. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> cibles principales du VIH**

Dès la première description clinique du SIDA, un tropisme sélectif pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> a été suggéré. Gottlieb et collaborateurs (Gottlieb et al., 1981) ont montré la diminution du taux circulant des lymphocytes CD4<sup>+</sup> chez les patients atteints du SIDA. Par la suite, de nombreux travaux ont permis de démontrer l'infection de ces cellules par le VIH, leur destruction et l'effondrement concomitant du système immunitaire.

## **A. le tropisme CD4**

Une des caractéristiques remarquables de l'infection par le VIH est le tropisme de ce virus pour les effecteurs cellulaires immunocompétents: les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les cellules monocytaires, et les cellules dendritiques. Ce tropisme préférentiel pour les cellules exprimant la molécule CD4 s'explique par la forte affinité de la protéine d'enveloppe **gp120** pour la molécule CD4 (Dalglish et al., 1984; Klatzmann et al., 1984; Sattentau et al., 1988).

### **1. interaction gp120/CD4**

La localisation du site de liaison de haute affinité de la glycoprotéine d'enveloppe reste controversé:

- des études effectuées à l'aide d'anticorps anti-CD4, confirmées par des analyse génétique par mutagenèse place le site de fixation sur le domaine D1 (Richardson et al., 1988), dans la région correspondante au CDR2, plus précisément entre les acides aminés 40 à 60 (Landau et al., 1988; Sattentau et al., 1989). Les acides aminés situés au niveau de cette zone forment une saillie complémentaire de la poche de la gp120 (Moebius et al., 1992).

Ce site reconnu par la gp120 est distinct de celui qui permet l'interaction avec la molécule du CMH II, néanmoins les deux sites pourraient se recouvrir (Moebius et al., 1992).

- d'autres résultats suggèrent une localisation dans la région "CDR3 like". En effet, des peptides homologues à cette région incluant les acides aminés 83 à 94 (Lifson et al., 1988) ou 81 à 92 (Nara et al., 1989; Lifson et al., 1991) inhibent la fixation de la gp120 à CD4, l'infection et la formation de syncytia. Ces résultats ne font, toutefois, pas l'unanimité (Berger et al., 1991).

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 destabilisant la double couche lipidique cellulaire et déclenchant ainsi une fusion entre la membrane plasmique et l'enveloppe du virus (cf p 31).

### **2. signaux induits par l'interaction CD4/gp120**

Le rôle de la molécule CD4 au cours de l'infection n'est pas restreinte à la fonction d'attachement du virus. La fixation du VIH à CD4 déclenche **des signaux conduisant à la translocation nucléaire de NFκB et AP-1** et cette activation semble importante pour le processus de production virale (Benkirane et al., 1994). Plus en amont de ces facteurs de transcription qui constituent l'étape terminale, la PI-4 kinase et les MAP kinases (Schmid-Antomarchi et al., 1996), ainsi que Raf-1 (sans passer par Ras) (Popik

and Pitha, 1996) ont également été impliqués dans la transduction de signaux (voir p 8 pour le détail des cascades d'activation), après la fixation de virus inactivé ou de gp120 sur CD4. Si la question du lien entre CD4 et l'activation de ces différentes voies est loin d'être résolue, la p56<sup>lck</sup> joue sans doute un rôle important (Merzouki et al., 1995). Elle est activée après fixation de la gp120 "cross-linkée" sur CD4 (Hivroz et al., 1993), et cette activation est nécessaire pour la translocation de NFκB décrite ci-dessus.

Outre la région intracytoplasmique, transductrice de signaux (par définition), la région CDR3 (extra-cellulaire) du domaine D1 de CD4 semble jouer un rôle dans cette cascade de signalisation. Cette région pourrait être impliquée dans une oligomérisation de CD4 consécutive à la fixation du virus (Briant et al., 1997). Cependant, cette interprétation, quant au rôle du domaine D1, ne vont pas dans le sens des travaux de Wu et al qui ont pu obtenir la cristallisation d'une molécule CD4 dimérisée par le domaine D4 (Wu et al., 1997).

### 3. d'autres voies d'entrée du virus

L'interaction CD4/gp120 constitue la voie d'infection préférentielle mais d'autres modes de pénétration, ne dépendant pas de CD4, existent. La particule virale recouverte d'anticorps ou de protéines du complément (Speth et al., 1997) pénètre dans la cellule par l'intermédiaire de la fixation de ces molécules sur leurs récepteurs respectifs. Le galactosylcéramide exprimé à la surface de certaines cellules, notamment les cellules épithéliales intestinales ou nerveuses (Harouse, 1989; Fantini et al., 1991), pourrait être aussi un récepteur potentiel alternatif de la gp120. En effet la gp120 peut se fixer au galcer par sa boucle V3, et des anticorps dirigés contre ce sphingolipide empêche l'infection par VIH.

#### **B. les co-récepteurs**

La molécule CD4 lie le virus par l'intermédiaire de la gp120, mais ne permet pas à elle seule l'entrée du virus. D'autres protéines membranaires, appelées corécepteurs, sont nécessaires à la fusion des membranes virale et cellulaire (Moore et al., 1997). Deux corécepteurs principaux, utilisés de manière alternative par les différentes souches virales, ont actuellement été identifiés:

- le récepteur **CCR5** (Samson et al., 1996), un récepteur liant les chimiokines MIP-1α, MIP-1β et RANTES, est nécessaire à l'entrée des souches de VIH-1 infectant les macrophages (M-tropiques), mais ne permet pas l'entrée des souches T-tropiques, adaptées aux lignées de lymphocytes T en culture.

-le récepteur **CXCR4** liant la chimiokine SDF-1, permet l'entrée des souches T-tropiques, mais non celle des souches M-tropiques de VIH-1.

Les souches M-tropiques de virus sont toujours rencontrées au cours des premières années qui suivent l'infection. Les souches T-tropiques apparaissent plus tardivement, en même temps que déclinent progressivement les populations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Pour des raisons qui ne sont pas encore complètement élucidées, il semble donc que seuls les virus M-tropiques utilisant CCR5 sont aptes à transmettre la maladie, et à se propager dans l'organisme pendant les stades initiaux de l'infection.

Ce rôle central de CCR5 a été confirmé par la détection dans les populations européennes d'une délétion affectant le gène codant pour CCR5, et aboutissant à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle, incapable d'être transportée normalement à la membrane plasmique. Les individus homozygotes pour cette mutation sont en effet fortement, sinon totalement, protégés contre l'infection par VIH-1, alors que les individus hétérozygotes semblent présenter une résistance relative à l'infection, et une progression en moyenne plus lente vers les stades cliniques de la maladie (Liu et al., 1996; Samson et al., 1996). Si on n'a pas, actuellement, retrouvé cette mutation dans les populations africaines, elle existe au sein de populations non-européennes avec un gradient décroissant Nord-Sud.

Il est important de noter que des résultats préliminaires suggèrent que la fixation du virus sur ces récepteurs induit des signaux intracellulaires à l'instar de la molécule CD4 (Davis et al., 1997).

## **IV. Le Virus de l'Immunodéficience Humaine**

### **A. Les rétrovirus**

#### **1. Morphologie et structure communes des rétrovirus**

Les rétrovirus sont des virus enveloppés à ARN simple brin de polarité positive. Ces sphérules de 110 à 150 nm de diamètre sont formées d'une membrane lipidique périphérique, dans laquelle sont enchâssées les protéines d'enveloppe, et d'un complexe nucléoprotéique central: le nucléoïde. Celui-ci est formé de protéines de structure, d'enzymes et d'ARN. L'utilisation d'une ADN polymérase-ARN dépendante (ou transcriptase inverse) au cours de leur réplication distingue les rétrovirus des autres types de virus à ARN (Gilboa et al., 1979). L'ADN bicaténaire produit à partir de l'ARN viral s'insère dans le génome de la cellule hôte sous la forme d'un provirus. Une fois intégré, le génome parasite subit les mêmes régulations et est transcrit au même titre que les gènes cellulaires.

Au sein de la particule virale, l'information génétique est contenue dans une molécule d'ARN d'environ 8 kb pour les rétrovirus classiques à 12 kb pour des rétrovirus

complexes (lentivirus et spumavirus). L'ARN est présent en deux exemplaires ce qui rend le génome du virion diploïde. Sa structure est celle d'un ARN messager eucaryote, elle présente une extrémité 5' coiffée d'une methylguanosine et une extrémité 3' polyadénylée. L'ARN possède deux séquences répétées R et deux régions uniques régulatrices, situées en 5' ou en 3', U5 et U3. La région codante est située entre ces deux régions régulatrices.

Au cours de la rétrotranscription et après l'intégration, les deux ARNs ne forment qu'un seul segment d'ADN de structure modifiée. Les extrémités distales sont dupliquées en régions appelées LTR (pour long terminal repeat) de séquence U3-R-U5. Le génome viral est alors placé sous le contrôle de la région U3 qui contient des séquences typiques des promoteurs eucaryotes, ce qui permettra à l'ARN polymérase II de produire les ARNs viraux infectieux.

## 2. Classification des rétrovirus

Les rétrovirus ont été initialement (et sont toujours) répertoriés selon la pathologie prépondérante qu'ils induisent. A un virus déterminé, on associe pour qualificatif soit l'espèce hôte dans laquelle il se multiplie, soit le nom de celui qui l'a décrit. L'existence de virus capables de causer des pathologies différentes a conduit à les classer selon des critères pathogéniques plus larges. Les rétrovirus sont divisés en trois grands groupes: les Oncovirus, les Lentivirus, et les Spumavirus.

**-Les Oncovirus à ARN:** ces virus sont très répandus dans le monde animal. Ils provoquent des tumeurs et des leucémies.

Selon la cinétique d'apparition des tumeurs ils sont scindés en deux familles:

- les oncovirus responsables de sarcomes et de leucémies d'apparition précoce transduisent un oncogène qui est une forme dérégulée d'un gène cellulaire intervenant dans une cascade activatrice. Cet apport quoique non suffisant à la transformation, accélère le processus. A l'exception de RSV (Rous Sarcome Virus), ces oncovirus sont défectifs, c'est à dire incapables de se répliquer. Le gène véhiculé s'étant substitué à l'un des gènes viraux, la réplication est assurée par complémentation avec un virus auxiliaire apparenté dont les gènes structuraux sont intacts.

- Les virus d'oncogénicité lente comme ceux des leucémies aviaires ne se manifestent qu'après une longue période d'infection asymptomatique. Des événements rares tels que l'intégration dans ou à coté d'un proto-oncogène en perturbent l'expression et participent au long processus d'accumulation de mutations qui aboutira à l'émergence de clones malins. Le potentiel réplcatif du virus de cette deuxième famille n'est pas forcément affecté.

Les virus des leucémies T humaines (HTLV-I et HTLV-II) se distinguent du modèle général, ils sont classés dans cette dernière famille conformément au principe de cette classification, c'est à dire que la pathologie l'emporte sur la pathogénèse.

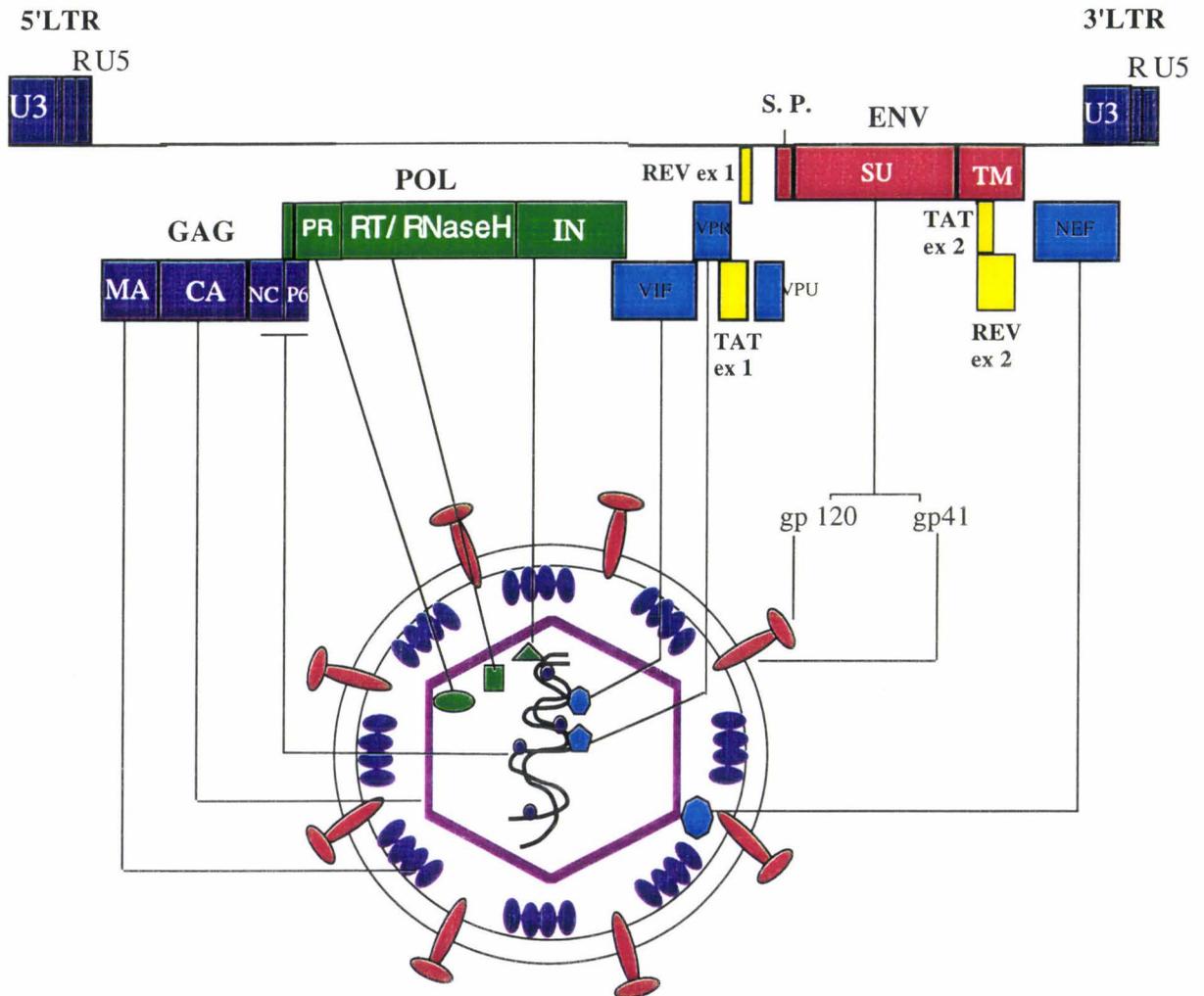
-**Les Lentivirus:** comprennent des rétrovirus qui engendrent de manière principale des pathologies non néoplasiques, d'évolution lente. La pathogénicité de certains virus, classés dans ce groupe sur la base de données génétiques, comme le virus de l'immunodéficience bovine (BIV), est très faible et reste à établir. *In vitro*, ils sont généralement cytopathogènes, infectent les cellules mononucléées du sang périphérique, lymphocytes et macrophages, et leur multiplication peut être facilitée par l'emploi de cytokines telles l'IL2. Dans l'organisme, ils établissent avec le système immunitaire une relation complexe de subversion lente et progressive qui aboutit au maintien d'une virémie plasmatique et/ ou cellulaire malgré l'existence d'une réponse immune. Parmi ces virus, on peut citer: le virus Visna du mouton (CAEV) et le virus de l'anémie infectieuse équine (EIAV). Les virus de l'immunodéficience acquise, dont VIH fait partie, se manifestent par une destruction lente et irrémédiable du système immunitaire. Certains d'entre eux, cependant, sont non pathogènes pour leur hôte naturel.

-**Les Spumavirus:** détectés pour la première fois chez des singes dont les cellules dégénéraient en formant des syncytia. Malgré des données contradictoires concernant leur implication dans des pathologies diverses (carcinomes, thyroïdites, myasthénie), ils ne présenteraient pas de pathogénicité associée connue pour l'homme et sont présents chez de nombreux mammifères.

## **B. Le VIH**

Deux ans seulement après la description clinique des premiers malades du SIDA, Barre-Sinoussi et al isolent un rétrovirus à partir de cellules ganglionnaires d'un malade atteint de lymphadenopathie (Barre-Sinoussi et al., 1983). Pour cette raison, ils l'appelleront LAV (Lymphadenopathy Associated Virus). Par la suite ce virus prendra le nom de VIH et sera désigné comme étant l'agent étiologique du SIDA.

Il se transmet par voie sexuelle, par le sang, et à la période périnatale, de la mère à l'enfant à travers le placenta ou par le lait.



**Fig: 8**

**Organisation génomique et structure schématique de la particule virale du VIH**

Les deux régions promotrices (LTR) bordent la région codante.  
 Les protéines précurseurs clivées pour donner les protéines finales sont délimitées par des lignes verticales:  
 Le précurseur GAG (group antigen) donne la matrice (MA) p17, la capside (CA) p24, la nucléocapside (NC) p7, et la protéine p6;  
 le précurseur GAG-POL est clivé pour donner la protéase (PR) p10, la transcriptase inverse (RT) p66/p51, et l'intégrase (IN) p32;  
 l'enveloppe gp160 est clivée à la surface pour donner (SU) gp120 et la gp41 transmembranaire.  
 Les gènes tat et rev consistent tout deux en deux exons codant pour le produit final.  
 Les gènes accessoires vif, vpu, vpr, nef sont situés dans la moitié 3' du génome. S.P correspond au peptide signal.

## 1. Morphologie et organisation génomique du VIH

### a) Morphologie

La morphologie du virus correspond à celle qui a été décrite précédemment pour les rétrovirus. Les particules virales matures ont un diamètre de 90 à 120 nm. L'enveloppe externe lipidique d'environ 100 nm qui les entoure est formée pour une part de la membrane la cellule infectée, pour une autre part des protéines d'enveloppe **gp120** et **gp41**. Enfermé dans une enveloppe protéique appelée capsid, formée des protéines **gag**, se trouve le nucléoïde: noyau dense contenant 2 molécules identiques d'ARN simples brin, de polarité positive, de 9,7 kb, et répondant à l'organisation générale des rétrovirus. Chaque molécule d'ARN est couplée à un ARN de transfert spécifique servant d'amorce à la synthèse d'ADN. A ces 2 molécules d'ARN sont associées les enzymes virales (transcriptase inverse, intégrase, endonucléase) (*cf fig 8*).

### b) Génome

Comme tous les génomes rétroviraux, le génome de VIH est constitué d'une séquence contenant les trois gènes de structure: **gag**, **pol**, et **env** (Wain-Hobson et al., 1985) dont les extrémités sont formées par les séquences **LTR** (Long Terminal Repeat) longues de 635bp et divisés en **U3-R-U5** (456, 97 et 82bp respectivement), fournissant non seulement les extrémités permettant l'intégration, mais également des signaux de régulation transcriptionnelle. La transcription s'effectue à partir d'un promoteur unique, situé dans la région U3 du LTR-5' et doit répondre à deux nécessités:

- l'une est la synthèse d'ARNs de longueur complète (génomique), qui seront associés aux protéines internes du virion et incorporés dans les particules virales.
- l'autre est la synthèse d'ARNs messagers spécifiques de chaque groupe de protéines virales (de structure et de régulation).

#### (1) Les gènes régulateurs essentiels

Le génome de VIH possède deux régulateurs spécifiques essentiels à l'expression virale, l'un activateur transcriptionnel: **Tat**, l'autre régulateur post-transcriptionnel: **Rev**.

Les phases codantes de **Tat** et **Rev** sont scindées en deux exons. Le premier est situé dans la portion centrale du génome, le second recouvre en partie la portion distale de **env** qui code pour la région intracytoplasmique de la protéine d'enveloppe. Leurs messagers précoces, de 2 kb, sont multiépissés et d'expression indépendante de **Rev**. Celui de **Tat** est monocistronique, celui de **Rev** est bicistronique et code en partie pour **Nef**. Dans la

phase tardive du cycle répliatif, Tat peut être exprimé à partir d'un ARNm monoépissé. Rev assure le passage de la phase de transcription virale précoce à la phase tardive.

La protéine transactivatrice du VIH, Tat, possède plusieurs propriétés, dépassant la simple fonction transcriptionnelle, qui permettent de penser qu'elle pourrait participer aux effets cytopathogènes du VIH. Tat est sécrétée par les cellules infectées, elle est probablement accumulée dans les tissus lymphoïdes où la répliation est active pendant la phase asymptomatique. Elle peut aussi affecter l'expression de gènes cellulaires ou leurs fonctions (Scala et al., 1994).

## (2) Les gènes accessoires.

Le génome des lentivirus comporte, en plus des gènes codant pour les protéines structurales, enzymatiques et régulatrices, des gènes codant pour des protéines accessoires. Si ces gènes ne sont pas nécessaires pour la croissance virale dans de nombreux systèmes *in vitro*, leur conservation et les études réalisées *in vivo* indiquent qu'ils ont une fonction cruciale (pour revue Trono 95 et Miller & Sarver, 97).

### **Nef (negative regulatory factor)**

Le gène nef code pour une protéine de 27 kDa, qui n'est produite que par les lentivirus de primates, exprimée en abondance durant les stades précoces de la répliation. A l'origine Nef était considérée comme un régulateur négatif de la répliation virale, raison pour laquelle elle porte ce nom, on sait aujourd'hui que Nef participe aux mécanismes d'endocytose et de dégradation lysosomiale de la molécule CD4 grâce à son association à la membrane plasmique par un résidu myristyl en N-terminal. Ce phénomène pourrait préserver la cellule d'une surinfection.

De plus, Nef interagit également avec la p56<sup>lck</sup> et perturbe son expression à la membrane. Des similitudes ont été observées dans les phénotypes de souris transgéniques pour nef et p56<sup>lck</sup> -/- (Molina et al., 1992; Brady et al., 1993). Ces similitudes portent sur les réponses médiées par le TCR, ainsi que la réponse immune vis à vis des infections virales, qui sont toutes deux diminuées par rapport à la normale. Ces observations suggèrent que les interactions de Nef avec la p56<sup>lck</sup> participent également aux mécanismes d'échappement du virus.

Par ailleurs des virus défectifs pour nef ont été identifiés chez des patients asymptomatiques à long terme. Cependant, on ignore actuellement dans quelle mesure nef est responsable du non-développement de la maladie.

### **Vpu (Viral protein U)**

Vpu est une protéine de 9,2 kDa associée avec les membranes internes des cellules infectées. Sa première fonction biologique identifiée est la dégradation de la molécule CD4 dans le réticulum endoplasmique. Au cours de l'infection par VIH, des complexes CD4/gp160 se forment dans le réticulum. Vpu interagit avec la queue cytoplasmique du CD4 entraînant la dégradation du CD4 et la libération de la gp160.

Sa deuxième fonction supposée consiste à faciliter le bourgeonnement des virions à partir des cellules infectées. En effet les oligomères de Vpu forment des canaux à travers la membrane plasmique.

### **Vif (Virion infectivity factor)**

Le gène vif est situé entre le gène pol et le gène env et code pour une protéine basique de 23 kDa. Bien que celle-ci soit cytoplasmique de façon prédominante, elle existe aussi sous forme associée à la membrane. Deux fonctions spécifiques ont été rapportées au cours des événements précoces de l'infection. La première concerne le transport du virus dans le noyau. Vif est associée aux protéines du cytosquelette qui relie la membrane plasmique et la membrane nucléaire. Vif jouerait également un rôle dans la formation du provirus, et notamment au niveau de la stabilisation de l'ADN nouvellement synthétisé.

### **Vpr (Viral protein R)**

Vpr est une protéine de 15 kDa, incorporée dans les particules virales par un mécanisme spécifique.

L'évolution du VIH a permis la mise en place de mécanismes de transport du complexe d'intégration au noyau, indépendants de la rupture de la membrane nucléaire. La première fonction de Vpr consiste à accompagner le complexe viral de préintégration dans le noyau des cellules quiescentes (Popov et al., 1998). L'entrée de ce complexe dans le noyau est nécessaire pour l'intégration du génome proviral dans le génome hôte.

La seconde fonction de Vpr serait de bloquer les cellules en division en phase G2 du cycle cellulaire. L'activité du LTR viral serait optimale à ce stade du cycle cellulaire (Goh et al., 1998).

## **(3) Les gènes structuraux**

### **Le gène gag**

les protéines **gag** sont issues du clivage par la protéase virale d'un précurseur polypeptidique de 55 kDa synthétisé à partir du messenger génomique. Elles sont constituées de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale par la protéine de matrice **p17**, la protéine de capsid **p24** et une protéine **p15** qui sera clivée dans un

second temps pour produire la protéine de nucléocapside **p9** et une protéine distale **p6**. L'extrémité N-terminale myristylée du précurseur, puis de la **p17** entraîne l'ensemble des constituants **gag**, **pol** et l'ARN génomique dans la particule virale. Le précurseur **gag** possède la capacité de se multimériser et d'assurer à lui seul le bourgeonnement des virions. C'est l'association des précurseurs entre eux qui active la protéase et autorise la synthèse des produits matures. La **p24** assure au nucléoïde sa forme caractéristique qui circonscrit l'ARN génomique et les enzymes nécessaires à sa réplication.

### **Le gène pol**

les produits du gène **pol** fournissent au virion l'ensemble des enzymes qui sont classiquement nécessaires à sa réplication, la **protéase p10**, la **transcriptase inverse p66/p51** et l'**intégrase p32**.

La transcriptase inverse est constituée de deux-sous unités de 66 ou 51 kDa, la plus courte dérivant de la plus longue par troncation de l'extrémité C-terminale, sous l'effet de la protéase rétrovirale. La forme de 66 kDa possède en plus de l'activité ADN polymérase ARN dépendante présente dans la forme de 55 kDa, une activité endonucléase capable de dégrader l'ARN des hybrides ADN/ARN. Les étapes de transcription inverse sont effectuées au sein de la gangue de p24 lors du transfert vers le noyau. Au cours du passage des deux ARNs virioniques à une seule molécule d'ADN provirale, l'absence d'activité de vérification de la correspondance entre matrice et ADN synthétisé conduit à un taux d'erreur élevé. On considère qu'*in vitro*, la transcriptase inverse effectue 1 mésappariement pour 1 700 à 4000 nucléotides. A titre de comparaison, d'autres rétrovirus ont un taux d'erreur de 1 pour 9 000 à 17 000.

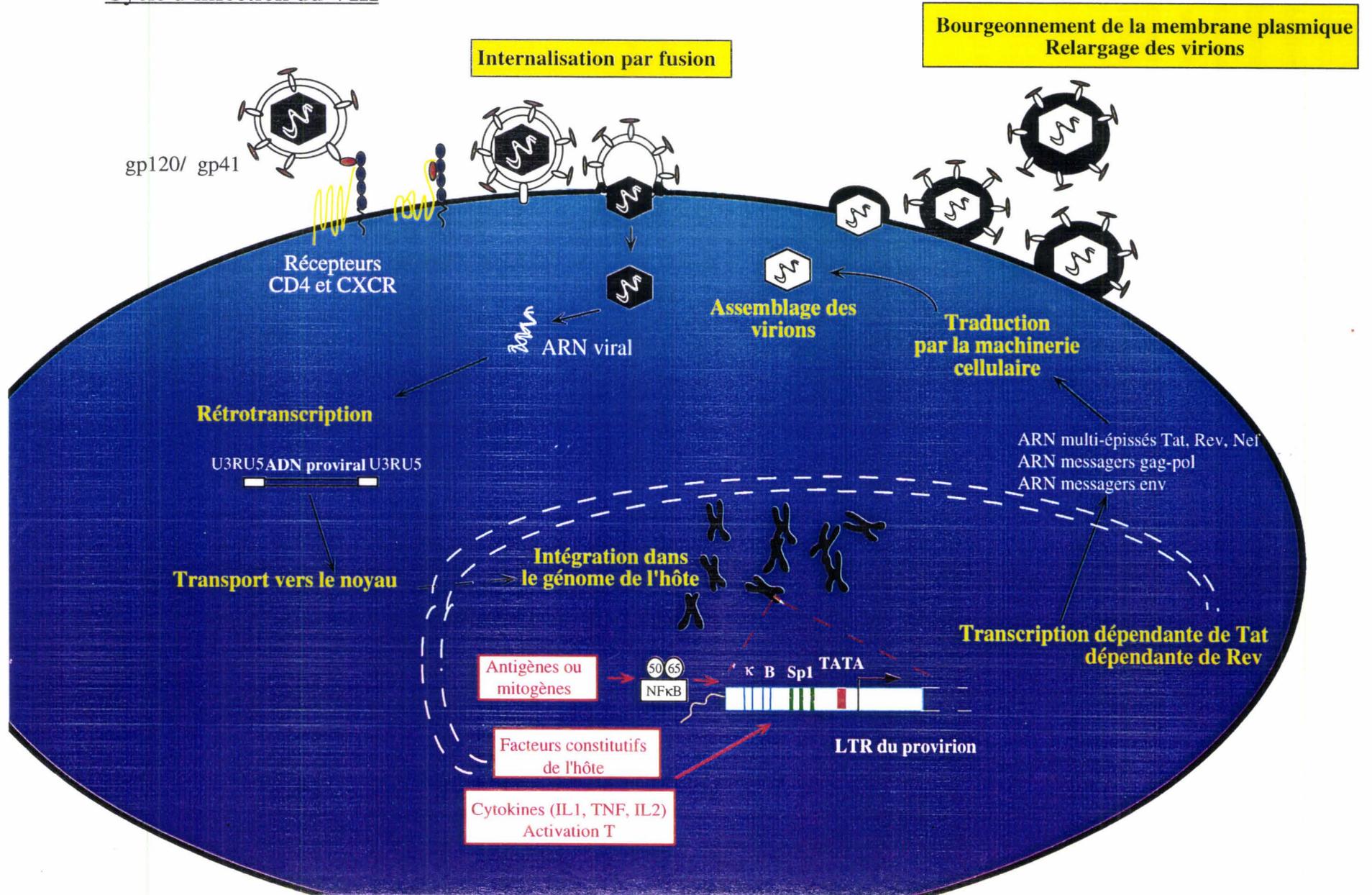
Compte tenu de ce taux d'erreur très élevé, il est évident que la transcriptase inverse joue un rôle majeur dans la génération de nouveaux virus et donc au niveau des mécanismes d'échappement du virus vis à vis système immunitaire.

L'intégrase **p32** est la protéine distale du gène **pol**. Elle autorise l'insertion du génome viral n'importe où dans le génome cellulaire.

### **Le gène env**

Du produit de traduction du gène **env** dérivent les glycoprotéines d'enveloppe de surface **gp120** et transmembranaire **gp41**. Ces deux glycoprotéines restent associées entre elles par des liaisons non covalentes et s'apparient à des protéines homologues pour constituer des complexes oligomériques, présents à la surface de la cellule et du virion, qui expriment les déterminants nécessaires à la reconnaissance du récepteur et à la fusion membranaire. Cette organisation en multimères est un phénomène général et essentiel des glycoprotéines d'enveloppe virales. Les glycoprotéines d'enveloppe de VIH assurent la pénétration du virus dans la cellule en interagissant spécifiquement avec la molécule CD4 à la surface des cellules cibles.

**Fig 9**  
**Cycle d'infection du VIH**



Il est important de noter que l'association entre la gp120 et la gp41 étant non covalente, une dissociation spontanée peut se produire. De ce fait, il est possible de détecter de la gp120 soluble, en circulation.

## 2. cycle de réplication du VIH-1 (cf figure 9)

### a) fixation du virus

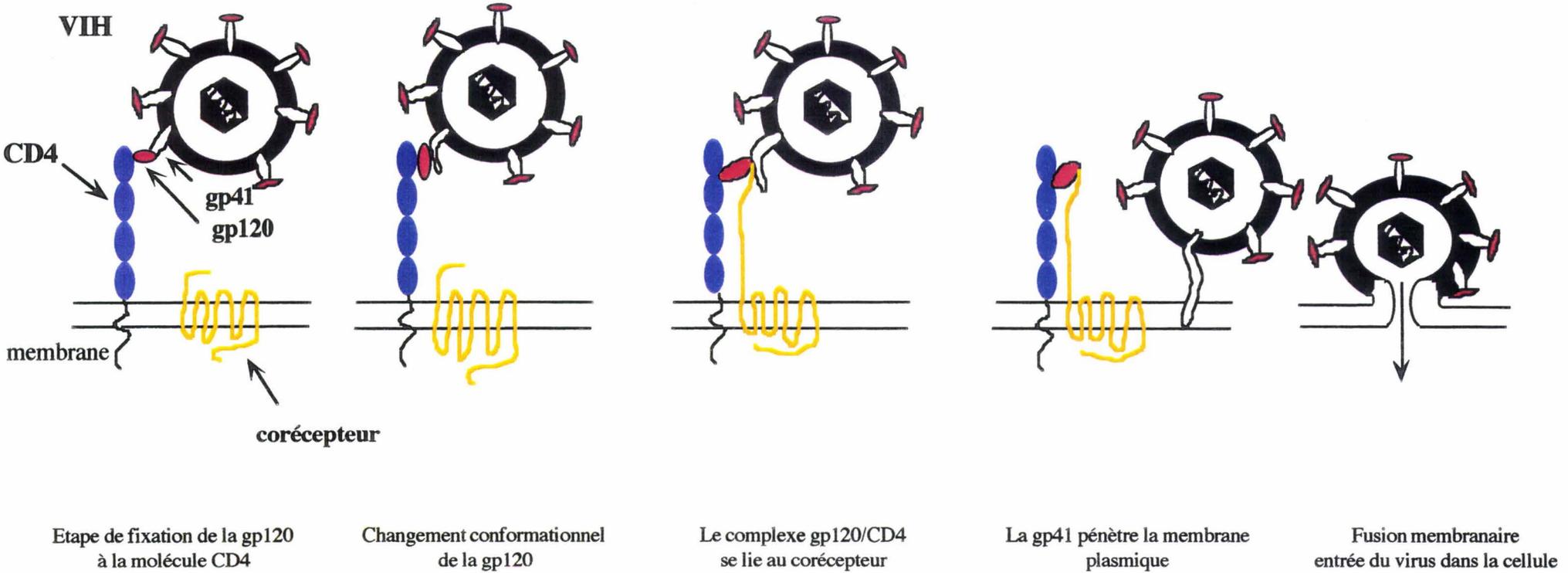
La première étape du cycle de réplication du VIH est la fixation du virus sur la cellule cible. Comme il est décrit dans un autre paragraphe, cette étape de fixation fait intervenir la molécule **gp120** virale et la molécule **CD4** exprimée à la surface des cellules cibles. Des études de mutagenèse dirigée ont montré que le site de liaison au CD4 implique un ensemble d'acides aminés éloignés les uns des autres sur la structure primaire de la molécule mais qui se retrouvent proches sur la structure tertiaire de la gp120. Cette région comprend entre autres les acides aminés Thr-257, Asp-368, Glu-370, Trp-427 et Asp-457.

### b) les étapes postérieures à la fixation et précédant la fusion

Le changement conformationnel consécutif à l'interaction de la molécule **CD4** avec la **gp120** aboutit à l'interaction du complexe gp120/CD4 avec l'un des co-récepteurs **CCR5** ou **CXCR4** pour former un complexe trimoléculaire (Trkola et al., 1996; Wu et al., 1996) (voir aussi p20). La modification de conformation de gp120 et de CD4 démasque sur les deux protéines des sites de liaison pour CCR5 qui permet la formation du trimère. Cette interaction fait intervenir un site complexe et non linéaire de gp120 qui comprend notamment la boucle V3. Un nouveau changement conformationnel de la gp120 expose alors la protéine gp41 qui déclenche la fusion proprement dite entre les membranes virales et cellulaires (cf figure 10). Ce dernier mécanisme reste cependant mal compris à l'heure actuelle.

### c) la fusion

L'entrée du VIH dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> est indépendante du pH, et se fait par fusion des membranes. La protéine gp41, et notamment une région hydrophobe homologue aux peptides de fusion des paramyxovirus, joue un rôle crucial dans ce processus. Le mélange des lipides de membranes qui accompagne la fusion est détectable après 1 à 2 minutes pour la fusion virus-cellule et après 10 à 90 min de contact entre une cellule infectée et une cellule cible. Il a été possible de mettre en évidence par microscopie électronique et par extinction de fluorescence des modes de pénétration rapide. Néanmoins, on considère généralement que les processus de fusion peuvent durer



**Fig:10**

**Cascade hypothétique des changements conformationnels du complexe gp(41+120) env/CD4/CCR depuis l'étape initiale de la liaison du VIH jusqu'à la fusion.**

Les structures tridimensionnelles réelles sont actuellement inconnues.

Adapté de Med.Sci. 1997: 13. 264-6



plusieurs heures. Les événements de fusion ont lieu à la surface cellulaire mais des formes virales fusionnantes ont été observées en microscopie électronique dans des vésicules d'endocytose de lignées lymphoïdes. Ces caractéristiques autorisent la propagation du génome viral par l'infection d'une cellule non infectée par une particule virale ou par le recrutement de cellules indemnes qui s'agrègent à une cellule infectée, fusionnent et forment des syncytia.

#### *d) la rétrotranscription*

La rétrotranscription est la première phase du cycle de réplication virale. Elle s'effectue dans la capsid virale, à l'intérieur du cytoplasme de la cellule hôte et fait intervenir les deux molécules d'ARN génomique. Le mécanisme est schématisé *figure 11*.

Dans un premier temps, la transcriptase inverse interagit physiquement avec un ARN-t Lys,<sup>3</sup> cellulaire et l'utilise comme amorce. Celui-ci, présent dans le virion, est spécifiquement hybridé au niveau d'une séquence localisée au niveau de l'extrémité 5' du génome viral dimérique et appelée "PBS" pour "primer binding site".

La transcriptase inverse synthétise ensuite un petit ADN(-) complémentaire dit "strong stop" correspondant à la région R-U5 du LTR5'. Très rapidement l'activité RNaseH de la transcriptase inverse dégrade l'ARN matrice et découvre la courte région d'ADN nouvellement synthétisée. La synthèse du brin (-) se poursuit par "saut de brin", facilitée par la présence d'une région complémentaire, localisée dans la région R, entre l'extrémité 3' de l'ARN matrice et l'ADN complémentaire (ADNc) (-).

La synthèse du brin d'ADNc (+) s'initie à partir d'une région riche en résidus purine appelée PPT pour "poly purine track", localisée en bordure 5' de la région U3 du LTR et partiellement résistante à l'activité RNase H. La synthèse du LTR 5' aura lieu en utilisant comme matrice l'ADN(-). Il faut ensuite un second saut de l'enzyme, guidé par une complémentarité de séquence au niveau des régions PBS des ADNc(+) et (-). La synthèse du brin d'ADNc peut alors se poursuivre, toujours en utilisant l'ADN(-) comme matrice, jusqu'à son extrémité LTR3'. Quant au brin d'ADNc(-), sa synthèse se termine en recopiant son LTR5' à partir de celui du brin d'ADNc (+).

#### *e) l'adressage nucléaire*

L'ADN proviral synthétisé dans le cytoplasme migre immédiatement dans le noyau sous la forme d'un complexe nucléoprotéique de pré-intégration de haut poids moléculaire. La taille de ce complexe ne lui permet pas de traverser de façon passive les pores nucléaires. Le transport est actif et se fait sous le contrôle des séquences de localisation nucléaires (NLS) dans la protéine de régulation Vpr très probablement en interagissant avec des facteurs cellulaires de transport nucléaire (Popov et al., 1998). Ainsi le complexe de pré-

intégration du VIH, contrairement aux oncovirus, traverse la membrane nucléaire indépendamment de la division cellulaire (Lewis and Emerman, 1994).

### *f) l'intégration*

Le complexe nucléoprotéique de pré-intégration comprend l'intégrase qui peut à elle seule, *in vitro*, réaliser l'intégration. Sa région N-terminale est impliquée dans l'activité d'intégration et sa partie C-terminale dans la liaison à l'ADN. L'intégration peut se résumer en trois étapes:

- elle débute par le clivage endonucléotidique sélectif de l'ADN proviral, aux extrémités 5' et 3' des LTRs, ce qui produit des extrémités 3'OH libres
- elle se poursuit par le clivage de l'ADN cellulaire
- elle se termine par la ligation des extrémités provirales et cellulaires. Bien que l'ADN ait été retrouvé sous forme circulaire et linéaire dans le cytoplasme des cellules infectées, il semblerait que seul l'ADN linéaire dans une faible proportion puisse s'intégrer dans le génome sous la forme d'un provirus, pour revue: (McCune, 1995).
- le virus est capable de s'intégrer dans le génome des macrophages différenciés, ainsi que dans les cellules arrêtées en G1/S ou en G2, par contre cette intégration ne peut avoir lieu dans les cellules en G0 (Weinberg et al., 1991).

Une fois le virus intégré le virus pourra se répliquer et sera transmis comme un élément stable du génome de la cellule infectée.

Il faut noter que, dans les macrophages, le provirus peut rester intégré dans le génome, où il serait inaccessible au système immunitaire. Ainsi, cet état de latence virale décrit pour les macrophages, fait de ces cellules, avec les cellules dendritiques, le réservoir majeur du virus.

### *g) la transcription*

La phase tardive du cycle de réplication du VIH-1 commence avec la transcription des messagers viraux. L'expression des gènes viraux dépend, tout d'abord, de facteurs de transcription constitutifs ou inductibles de la cellule hôte qui viennent se fixer au niveau du promoteur du provirus intégré. Ce sont ces facteurs qui, en reconnaissant des sites de fixation spécifiques présents dans la région LTR du VIH-1, déterminent le niveau basal d'expression des gènes du virus en fonction de l'état d'activation de la cellule hôte.

La transcription des gènes du VIH-1 peut-être divisée en deux phases:

- la **phase précoce**, où les ARNm viraux d'une taille de 2 kb sont synthétisés de façon prédominante. Cette classe d'ARNm multiépissés code, entre autres, pour les protéines de régulation **Tat**, **Rev** et **Nef**.
- débute ensuite la **phase tardive**, pendant laquelle apparaissent des ARNm de tailles intermédiaires, monoépissés (4,2 kb) et non épissés (9 kb). On distingue parmi les

premiers de nombreux types d'ARNm différents, dont 9 codent pour les protéines **Env** et **Vpu** et 3 codent pour la protéine **Tat** formée seulement de son premier exon. Ces messagers contiennent la séquence **RRE** (Rev responsive element) et leur expression dépendra de la protéine **Rev**.

#### ***h) L'encapsidation***

L'assemblage des composants viraux nécessaires à la formation de particules virales infectieuses, commence par la formation d'un complexe ribonucléoprotéique dans le cytoplasme. Le précurseur **gag**, **Pr55gag**, est l'élément principal de ce complexe. Ce précurseur myristylé en N-terminal, s'ancre à la membrane cellulaire et permet alors l'incorporation du précurseur **gag-pol** ainsi que les molécules d'ARN viral qui vont former les nouvelles particules virales (Pal et al., 1990; Luban and Goff, 1991).

La maturation de particules virales a lieu après l'étape de bourgeonnement. Celle-ci est suivie de l'apparition des protéines **gag** matures.

### **3. Facteurs pouvant influencer la production virale**

#### ***a) Influence de l'activation cellulaire sur les étapes précoces du cycle***

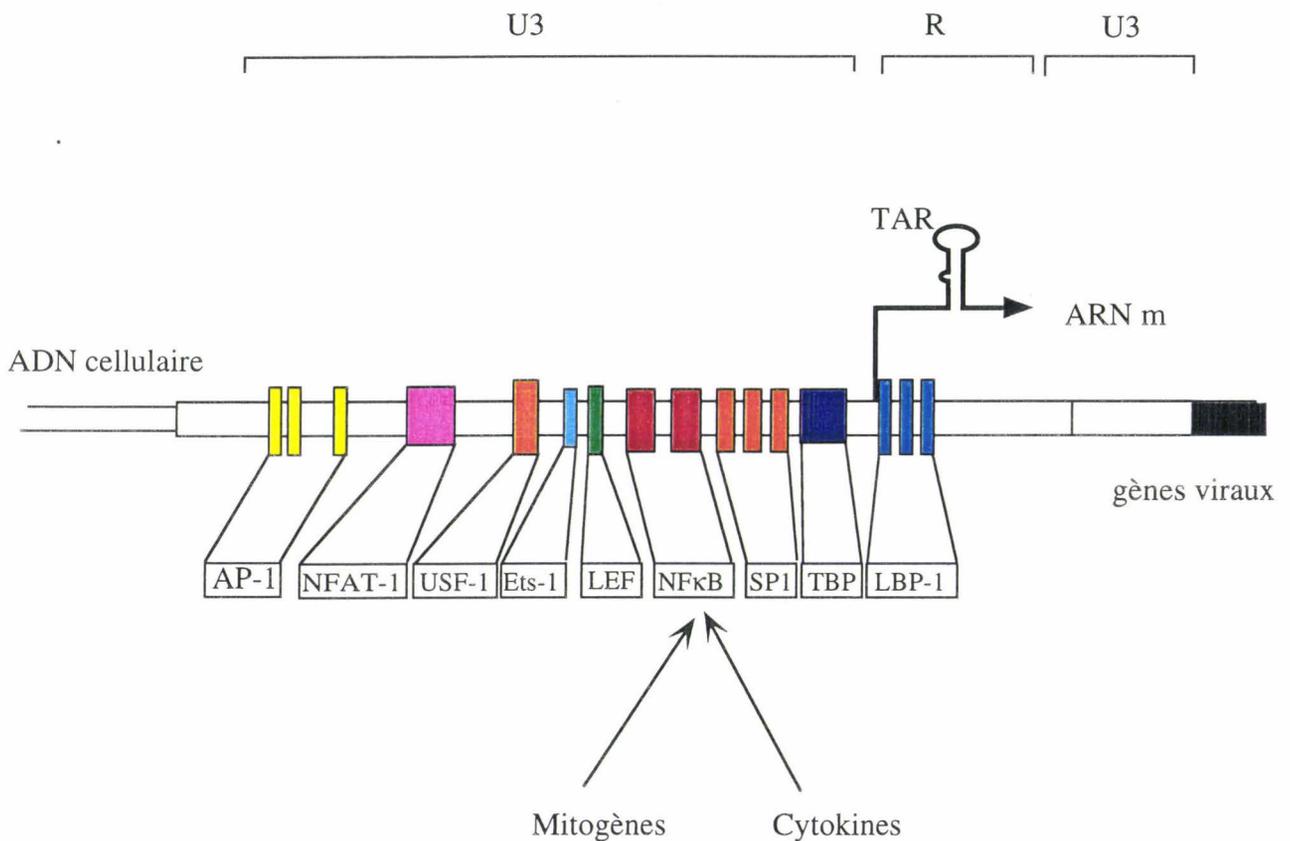
Les premières expériences d'infection des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par le VIH-1 ont montré que l'activation de ces cellules par des mitogènes est nécessaire à la production virale, de plus la cinétique de rétrotranscription est lente par rapport à la cinétique observable dans des cellules activées (Margolick et al., 1987; Zack et al., 1990).

Des données controversées montrent que l'ADN proviral non intégré pourrait servir de matrice pour la synthèse de protéines virales telles que l'enveloppe (Stevenson et al., 1990). De manière plus générale, il est admis que la production virale complète nécessite l'activation de la cellule infectée. La première infection d'un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> semble d'ailleurs ne pas être suffisante pour qu'il ait production virale. *In vitro*, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés restent en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. La formation de complexes gp120 -anti-gp120 circulants pourraient participer à l'activation cellulaire, conduisant à la translocation des facteurs NFκB et AP-1 ainsi qu'à la production virale (Briant et al., 1996).

#### ***b) Les facteurs modulateurs de la transcription des gènes du VIH***

#### **Rôle des différentes régions du LTR (cf fig 12)**

- Le LTR 5' a un rôle de promoteur fort et le LTR 3' est requis pour une terminaison efficace de la transcription.



**Fig 12**

### Éléments transcriptionnels du promoteur du VIH

Le promoteur viral est divisé en trois régions fonctionnelles distinctes: U3 (-453 à +1), R (+1 à +98), et U5 (+99 à 185)

Trois domaines transcriptionnels sont situés dans la région U3:

un domaine basique, un domaine activateur, et un domaine modulateur.

La transcription est initiée à la limite de la région U3 et R du LTR5' grâce aux sites de fixation pour les facteurs de transcription cellulaires situés dans le domaine basique.

La région activatrice du promoteur est formée de deux sites NFκB.

La région modulatrice contient plusieurs sites de fixation pour des facteurs cellulaires.

Les sites ainsi que leur rôle sont décrits dans le texte.

- Dans la région U3 du LTR se trouvent les séquences promotrices et régulatrices du virus: la boîte TATA qui comme ses homologues cellulaires joue un rôle essentiel dans la transcription des gènes par l'ARN polymérase II. Lors de la formation du complexe de transcription, un des premiers facteurs à se fixer sur cette région est la protéine TBP (TATA binding protein), qui associée au facteur de transcription TAF (TBP associated factor) va former le complexe TFIID. L'interaction de TFIID avec les autres facteurs du complexe d'initiation de transcription et l'ARN polymérase II va permettre l'initiation de la transcription. Pour le VIH-1, la séquence TATA est importante à la fois pour le niveau basal d'expression (en absence de Tat) et pour la transactivation par Tat.
- La région R contient :
  - une séquence régulatrice appelée TAR (Tat response element) qui sous sa forme ARN fixe Tat
  - le site de déclenchement de la transcription
  - le site de polyadénylation qui ne fonctionne qu'en 3' et où s'achève la transcription.

### **Les facteurs de transcription cellulaires pouvant se fixer sur le LTR.**

#### • **SP1**

A proximité de la boîte TATA, il existe 3 sites de fixation pour le facteur ubiquitaire **SP1**. Les mutations altérant un ou 2 des 3 sites SP-1 ont peu d'effet sur l'activité du LTR du VIH-1: en supprimant les 3 sites, le niveau basal de transcription et l'induction de celle-ci par Tat s'en trouvent très diminuées. Ce facteur est une métallo-protéine, qui se fixe sur des sites riches en GC, et augmente l'activité basale du promoteur en interagissant avec l'un des éléments du complexe de déclenchement de la transcription.

#### • **LBP1, USF**

D'autres facteurs cellulaires se fixent au niveau du promoteur mais leur rôle sur l'activité promotrice *in vivo* est encore controversé. Il s'agit en particulier des facteurs cellulaires **LBP1** (pour Leader binding protein 1) (Giacca et al., 1992) et **USF**.

#### • **NF-κB**

Le LTR 5' comprend également une séquence activatrice inductible qui contient deux séquences GGGACTTCC reconnues par les membres de la famille **NF-κB/c-Rel**. Cette région est essentielle puisque de sa présence découle en grande partie l'induction de l'expression du VIH-1 par des stimuli activateurs de la cellule aussi divers que l'IL-1, le TNFα, la stimulation par des mitogènes, par le TCR, par les esters de phorbol, ou l'irradiation UV, autrement dit, les activateurs cellulaires dont la transduction du signal passe par la PKC ou l'AMP cyclique.

NF- $\kappa$ B est un hétérodimère, constitué de 2 sous-unités p50 et p65, retenu dans le cytoplasme des cellules non activées par l'inhibiteur I $\kappa$ B $\alpha$ . L'activation de la cellule induit une phosphorylation de l'inhibiteur puis sa dégradation, ce qui démasque une séquence de localisation nucléaire (NLS) située sur p65. Le complexe p50/p65 migre alors dans le noyau où il se fixe par sa sous-unité p50 sur les motifs de fixation de NF- $\kappa$ B et induit l'expression de nombreux gènes cellulaires et viraux. La fixation au niveau des sites viraux stimule fortement la transcription du VIH et augmente la synthèse de nouveaux virions (Gaynor, 1992).

- **AP1, NFAT, COUP**

Des séquences spécifiques de la fixation d'autres facteurs cellulaires comme **AP1**, **NFAT** (Thompson et al., 1992), **COUP** (Cooney et al., 1991) ont été décrites sur la base d'homologies ou de travaux *in vitro*, mais la fonctionnalité de ces facteurs n'a pas été démontrée *in vivo*.

- **TCF1 $\alpha$**

Le facteur **TCF1 $\alpha$**  est indispensable car il permet la courbure de l'ADN et une interaction efficace entre les différents facteurs de transcription qui agissent en synergie lors du déclenchement de la transcription (Kim et al., 1993).

- En amont de -150 s'étend une région initialement décrite sous l'appellation de NRE pour Negative responsive element, ou Nef responsive element. Des délétions dans cette région entraînent une augmentation de l'activité de la transcription du LTR du VIH-1. Différents sites de fixation pour des protéines cellulaires ont été mis en évidence dans la région NRE (Rosen et al., 1985).

#### 4. le Syndrome de l'Immunodéficience Acquisée (SIDA)

Depuis les premiers malades recensés en 1981, le SIDA n'a cessé de s'étendre et est devenu la première pandémie touchant l'ensemble des 5 continents. Si les chiffres de la mortalité due au SIDA commencent à diminuer en Europe de l'Ouest, ils sont restés en hausse à l'échelle mondiale ces dernières années. A l'échelle mondiale, le nombre de cas de SIDA a augmenté de 19% de 1994 à 1995. Compte tenu du retard des déclarations, l'O.M.S a estimé à 4 500 000 le nombre de cas en 1995. A travers le monde, plus de 18 millions de personnes sont infectées par le VIH (séropositives) et toujours selon une projection de l'O.M.S., 30 à 40 millions de personnes auront contracté le virus d'ici l'an 2 000.

##### **Description clinique de la maladie**

L'infection par le VIH peut généralement être divisée en trois phases cliniques:

### **a) La période de primo-infection**

Elle correspond à un ensemble de manifestations cliniques et biologiques spécifiques du VIH, transitoires, guérissant habituellement spontanément, de gravité variable et laissant place à une infection chronique symptomatique ou non. Les signes cliniques sont assez proches des symptômes de la mononucléose infectieuse. C'est durant cette phase où la réplication virale est intense que la réponse immune se met en place. Ainsi, les réponses immunes cellulaires ou humorales sont détectables précocement dans l'infection. Elles comprennent la production d'anticorps neutralisants spécifiques du virus, la cytotoxicité dépendante d'anticorps, la production de CTL et de cellules NK, et l'activation de la lyse dépendante du complément. On observe durant cette phase, une chute du nombre des cellules T circulantes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> retrouvent ensuite leurs valeurs antérieures, alors que les cellules CD4<sup>+</sup> restent au dessous de leur niveau habituel, ce qui entraîne une inversion du rapport CD4/CD8.

### **b) phase d'incubation asymptomatique**

Cette période de séropositivité asymptomatique est définie comme la durée s'écoulant entre l'infection par le VIH et l'entrée dans le stade SIDA avéré. On l'évalue en moyenne à 10 ans. Pendant cette phase et celle de l'infection aiguë, le nombre de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> circulants décroît lentement (passant en quelques années de 500 à 350 par millimètre cube) et le pourcentage de cellules infectées est faible.

Durant la période qui précède le SIDA, dite de progression, on constate une activation chronique et anormale des cellules du système immunitaire. En quelques mois, la chute des cellules CD4<sup>+</sup> s'accélère pour passer en dessous du seuil de 200 par millimètre cube. La destruction progressive de l'architecture lymphoïde, et la disparition des cellules folliculaires empêchent le piégeage des particules virales dans les ganglions et provoque l'augmentation de la charge virale dans le sang (Embrentson, 1993). Cette destruction a pour conséquence l'entrée dans la troisième phase.

### **c) SIDA**

Cette troisième phase est la période de maladie clinique proprement dite durant laquelle de nombreuses pathologies, dont certaines infections opportunistes, se manifestent (pneumonies à *Pneumocystis carinii*, toxoplasmose, sarcome de Kaposi, lymphomes non hodgkiniens, infections à mycobactéries atypiques). L'infection est extensive, et touche à la fois les cellules du système intestinal, du foie et celles du cerveau. L'extension de l'infection par VIH aux cellules du cerveau conduirait au syndrome démentiel associé au SIDA, caractérisé par divers troubles neurologiques incluant les neuropathies périphériques et les myopathies.

### **C. *Physiopathologie et effets cytopathogènes du VIH***

Après avoir cru, peu après le début de l'épidémie, que l'infection par le VIH était latente avec une réaction virale tardive, on sait maintenant qu'il s'agit d'une infection chronique active, au cours de laquelle le VIH échappe progressivement au système immunitaire (Ho et al., 1995; Wei et al., 1995).

Pour mieux comprendre le déficit fonctionnel et quantitatif des cellules T CD4<sup>+</sup>, et dans quelle mesure il est responsable de l'immunodéficience caractéristique des stades tardifs de la maladie, il est important:

- d'une part de replacer ce déficit dans le cadre des relations complexes du virus avec le système immunitaire de l'hôte
- d'autre part d'étudier les effets du virus au niveau cellulaire.

#### **1. Effets du virus sur le système immunitaire**

Les études de l'immunopathogénèse de la maladie ont donné lieu à de nombreuses hypothèses pour expliquer la destruction d'un système immunitaire initialement fonctionnel, mais aucun consensus n'est établi. Cependant, chaque modèle proposé met en évidence l'aspect paradoxal des mécanismes qui conduisent à l'effondrement du système immunitaire. D'une certaine manière, il apparaît que l'activation de la réponse immune elle-même conduit au déficit fonctionnel puis à l'autodestruction du système immunitaire.

Il est possible de distinguer trois types d'hypothèse:

- la première s'appuie sur l'idée que le virus n'étant jamais éliminé de l'organisme, il épuise progressivement les défenses immunitaires
- la deuxième met en cause un dysfonctionnement du renouvellement cellulaire au niveau des cellules précurseurs elles-mêmes
- la troisième implique une anomalie dans la présentation de l'antigène par les CPA

##### **a) *La persistance de la réplication virale et l'épuisement du système immunitaire***

Dès le début de l'infection, le système immunitaire est activé par le virus. Il semble même, que dans un premier temps, il le soit de manière efficace, puisque dans les 3 mois suivant la contamination, il n'est plus possible de détecter l'antigène p24 (dans la plupart des cas). Une période asymptomatique vient ensuite (cf p40). Durant cette période, le virus reste présent dans l'organisme et particulièrement dans les organes lymphoïdes où le VIH continue de se répliquer activement. Sa diffusion est probablement en partie réprimée par les réponses spécifiques humorales ainsi que par les cellules cytotoxiques. Néanmoins, il semble que cette charge virale, durant la phase asymptomatique, beaucoup

plus importante qu'on ne le pensait initialement, pourrait presque à elle seule expliquer les déficits quantitatifs et qualitatifs apparaissant au cours de l'infection par le VIH. D'après le modèle de Ho, chaque jour,  $10^8$  à  $10^{10}$  nouvelles particules virales sont produites,  $10^7$  à  $10^9$  cellules T CD4<sup>+</sup> meurent et sont régénérées (Ho et al., 1995). Les capacités de renouvellement n'étant pas illimitées, le système immunitaire s'essouffle peu à peu, alors que la réplication virale reste constante. Celle-ci prend finalement le dessus, et accélère le processus de déclin des cellules CD4<sup>+</sup>.

D'autres résultats sont à rapprocher du modèle de Ho, et contribuent à expliquer l'épuisement du système immunitaire:

- dans certains modèles de tolérance périphérique, malgré une activation correcte préalable, les cellules T deviennent anergiques si l'antigène n'est pas éliminé; la stimulation chronique des précurseurs T par les antigènes viraux ou par des germes opportunistes peut induire leur différenciation en cellules effectrices activées qui répondraient moins bien à de nouveaux stimuli. Ainsi, la persistance de grandes quantités de virus dans l'organisme pourrait induire l'activation continue des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> avec épuisement de leurs capacités prolifératives (Moskophidis et al., 1993; Sprent and Tough, 1994).

- au cours de toute réponse immune, la plupart des cellules effectrices n'évoluent pas en cellules mémoire et meurent par apoptose évitant ainsi une prolifération incontrôlée. La persistance virale, en induisant une différenciation massive des lymphocytes T en cellules effectrices à durée de vie courte, contribuerait donc à la déplétion des cellules CD4<sup>+</sup> mais aussi des cellules CD8<sup>+</sup> spécifiquement dirigées contre le virus.

Finalement, la charge virale d'un côté et l'hyperactivation de l'autre s'auto-entretiennent, ce qui pourrait expliquer l'aggravation progressive et irréversible du déficit immunitaire.

### ***b) Perturbation de l'homéostasie lymphocytaire.***

Une autre hypothèse qui n'est pas forcément contradictoire avec celle de Ho postule que le VIH interfère avec la production de nouvelles cellules, et que la déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> découlerait d'un déficit central de production (Fauci, 1988). Cette perturbation du renouvellement cellulaire pourrait s'expliquer par l'infection des cellules souches hématopoïétiques ou la destruction de l'architecture thymique (Valentin et al, 1994). Cependant le VIH n'a pu être mis en évidence dans les cellules progénitrices prélevées à partir de patients séropositifs, suggérant l'intervention d'un mécanisme indirect d'altération de l'hématopoïèse. Les anticorps anti-gp120 circulants pourraient en être en partie responsables.

Pourtant, l'atteinte des cellules souches hématopoïétiques par le VIH n'est pas à exclure puisque certaines équipes ont montré la permissivité au VIH des cellules CD34<sup>+</sup> *in vivo*,

chez l'homme, associée à la perte de leur potentiel clonogénique (Stanley, 1992). L'infection possible des progéniteurs implique que les cellules T CD4<sup>+</sup> éliminées par le virus seraient remplacées par la multiplication des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> matures non infectés plutôt que par l'accélération de la différenciation thymique. Ce phénomène, à long terme, participerait à l'élimination des cellules T dirigées spécifiquement contre le VIH.

Une autre explication à l'altération de l'homéostasie lymphocytaire s'appuie sur le fait que la désorganisation de la structure des ganglions et, en particulier, la destruction des cellules dendritiques folliculaires entraîne une perturbation profonde des mécanismes de présentation des antigènes exogènes. Les réponses immunes spécifiques en seraient profondément altérées, de même que la régénération des précurseurs T.

c) *Défaut des fonctions présentatrices des monocytes et déséquilibre des sous-populations T CD4<sup>+</sup>*

(Il ne sera abordé, dans ce paragraphe, que l'aspect sécréteur de cytokines des CPA. D'autres aspects seront abordés plus loin.)

Plusieurs observations suggèrent qu'une altération de la fonction des CPA participe au dysfonctionnement général du système immunitaire.

-Tout d'abord, l'infection *in vitro* de monocytes est corrélée à une inhibition de la production d'IL-12, et, dans des expériences de co-cultures avec des lymphocytes T issus de donneurs sains, à une diminution de la réponse proliférative et de la production d'IL-2 des lymphocytes T. Dans ce cas, l'apport d'IL-2 restaure la prolifération lymphocytaire.

-Dans le cas de macrophages prélevés chez des individus infectés, des défauts de production d'IL-12 ou d'IL-2 après stimulation, ont également été observés.

Le déséquilibre de production des cytokines IL-10 et IL-12 par les macrophages infectés pourrait être à la base de la perte sélective des fonctions lymphocytaires T. Ainsi, le défaut de production d'IL-12 pourrait conduire à la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> non différenciés en lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th-2 et pourrait être associé à un défaut de différenciation en lymphocytes CD4<sup>+</sup> Th-1 (les définitions des sous-populations sont en page 6). Le défaut de production d'IL-12 observé très tôt lors de l'infection par VIH conditionnerait donc une réponse immunitaire à médiation humorale en défavorisant les réponses cellulaires (Romagnani and Maggi, 1994). Une fois la réponse immune engagée dans cette voie, des mécanismes auto-amplificateurs, ajoutés à l'action des protéines virales, rendent cette orientation relativement irréversible. Par analogie avec l'étude de la réponse dans le cas d'une infection par leishmanie, la réponse prépondérante Th2 contribuerait au déclin de l'efficacité du système immunitaire à éliminer le virus (Clerici et al., 1997; Clerici and Shearer, 1993).

Les différentes hypothèses exposées ne sont pas vraiment contradictoires, il se pourrait même qu'elles se complètent, aucune pourtant ne fait l'unanimité, et d'une manière générale il n'existe aucune explication consensuelle quant aux mécanismes conduisant à la désorganisation du système immunitaire.

## 2. Effets cytopathogènes du VIH

L'étude des effets cytopathogènes viraux vise à comprendre par quels mécanismes les cellules T CD4<sup>+</sup> viennent à disparaître, au niveau cellulaire, et non plus au niveau du système immunitaire. On peut en effet considérer que c'est la somme des effets du virus sur les cellules d'un organisme infecté qui conduit au dysfonctionnement du système immunitaire dans sa globalité.

Les mécanismes proposés pour expliquer la mort des cellules T CD4<sup>+</sup> sont de deux types:

- ils peuvent être directs, et dans ce cas, sont liés à la présence du virus dans la cellule
- ils peuvent être indirects et toucher des cellules non infectées.

### a) *Mécanismes directs entraînant la mort des cellules infectées.*

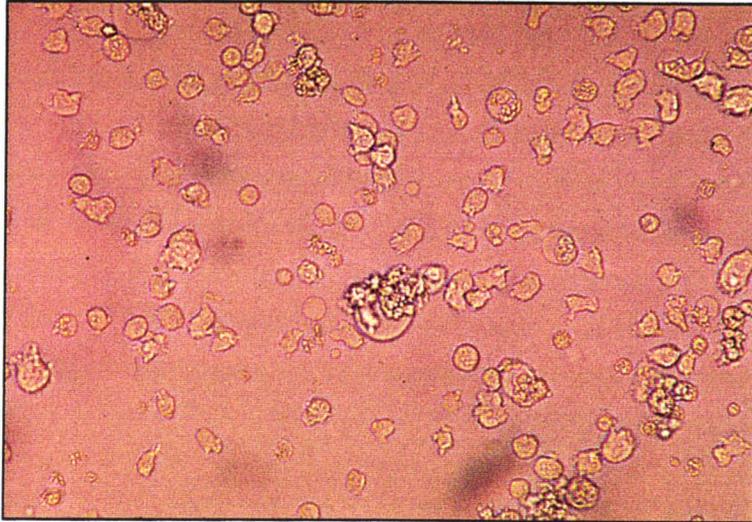
D'une manière générale toutes les défenses de l'organisme contribuent à tuer les cellules infectées par le virus, qu'il s'agisse des cellules T cytotoxiques, des cellules impliquées dans les mécanismes de cytotoxicité dépendante d'anticorps. Les mécanismes de lyse médiés par le complément sont également impliqués. Cette destruction massive des cellules infectées sans pour autant éliminer le virus conduit à une activation chronique du système immunitaire sans doute néfaste à long terme (cf p41).

Dans certaines conditions le virus peut lui même détruire la cellule qui l'accueille. Les mécanismes de cette destruction seraient liés à:

- **la perte de l'intégrité membranaire** lors de la production d'une trop grande quantité de virions et de leur bourgeonnement à la surface de la cellule (Stevenson et al., 1988)
- **l'accumulation de matériel viral dans la cellule**
  - **accumulation d'ADN viral non intégré**

Le taux d'ADN qui s'intègre effectivement dans le génome de la cellule hôte est très faible (cf p24) ce qui conduit à une accumulation de l'ADN viral non intégré. Par analogie avec des études faites chez les rétrovirus félin ou aviaire, ce phénomène est considéré comme responsable de la mort des cellules infectées (Shaw et al., 1984). Cependant ce mécanisme est actuellement controversé, puisque l'on considère que les copies non intégrées ont une durée de vie de une à deux semaines.

- **molécules d'ARN viral et protéines virales**



Cellules CEM infectées par VIH.  
Un exemple de formation de syncytia.



Dans le même ordre d'idée, la présence massive de molécules d'ARN, ainsi que de protéines virales dans le cytoplasme des cellules infectées pourraient conduire à la mort de ces cellules.

#### **-La formation de complexes enveloppe/CD4 intracellulaires**

Lors de l'infection des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, la synthèse simultanée de l'enveloppe virale et de la molécule CD4 dans le reticulum endoplasmique (RE) peut conduire à la formation de complexes retenus dans le RE. Cette rétention qui est le résultat d'un transport inefficace de la gp160 elle-même est toxique pour la cellule (Koga et al., 1990). Des études plus récentes ont montré que les complexes gp160-CD4 formés dans le RE incluent aussi la p56<sup>lck</sup> associée au domaine cytoplasmique de CD4. Il a été proposé que la mauvaise localisation de cette kinase vers le côté cytoplasmique du RE pourrait aussi entraîner des effets cytopathogènes.

#### ***b) Mécanismes indirects touchant également des cellules non infectées***

De nombreux éléments sont en faveur de l'existence d'effets indirects du virus conduisant à la mort cellulaire:

- tout d'abord, selon certains auteurs, la charge virale ne peut expliquer à elle seule la déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> (Phillips, 1994) et des modèles animaux ont montré que des souches virales non-cytopathogènes sont capables d'induire une forte déplétion lymphocytaire (Mosier et al., 1993).

- l'infection de chimpanzés par le VIH ne conduit pas à un SIDA malgré une infection normale des lymphocytes et une réplication virale importante.

- enfin, seul un faible pourcentage des cellules CD4<sup>+</sup> *in vivo* s'avère être infecté (moins de 0,01% des lymphocytes du sang périphérique et moins de 1% des lymphocytes ganglionnaires, lors de la phase asymptomatique), ce qui ne permet pas de rendre compte de la déplétion lymphocytaire CD4<sup>+</sup> observée.

L'apoptose constitue l'un des mécanismes indirects majeurs impliqués dans la cytopathogénèse du VIH. Elle sera abordée en détails (p65) après un rappel définissant la mort programmée.

Outre l'amorce de la mort cellulaire programmée, il est possible de distinguer deux principaux types de mécanisme indirect:

- l'agglomération de plusieurs cellules pour former des cellules géantes multinucléées (les syncytia). Ce phénomène est essentiellement observé *in vitro*, lors d'infection aiguë.

- l'action des protéines virales gp120 et Tat relarguées dans le milieu.

## • La formation de syncytia

Dès les premières études *in vitro* de l'infection par le VIH, la formation de cellules géantes multinucléées a été observée. D'autres études, par la suite, ont montré que les cellules infectées exprimant la protéine de l'enveloppe virale à leur surface pouvaient fusionner avec des cellules non infectées exprimant la molécule CD4 (Sodroski et al., 1986). (Un exemple de cellules formant des syncytia est présenté ci-contre.) On sait maintenant que les processus de formation des syncytia impliquent la fusion des membranes, initiée par l'interaction entre la gp120 et la molécule CD4 sur deux cellules distinctes et qu'hormis la présence nécessaire de certaines molécules d'adhésion (comme LFA-1) permettant la juxtaposition des deux cellules, la fusion s'effectue de la même façon que lors d'une infection (Hildreth and Orentas, 1989). Partant de ces observations, l'inclusion de cellules CD4<sup>+</sup> non infectées dans des syncytia à courte vie semblait constituer un mécanisme potentiel pour la déplétion des cellules CD4<sup>+</sup> non infectées.

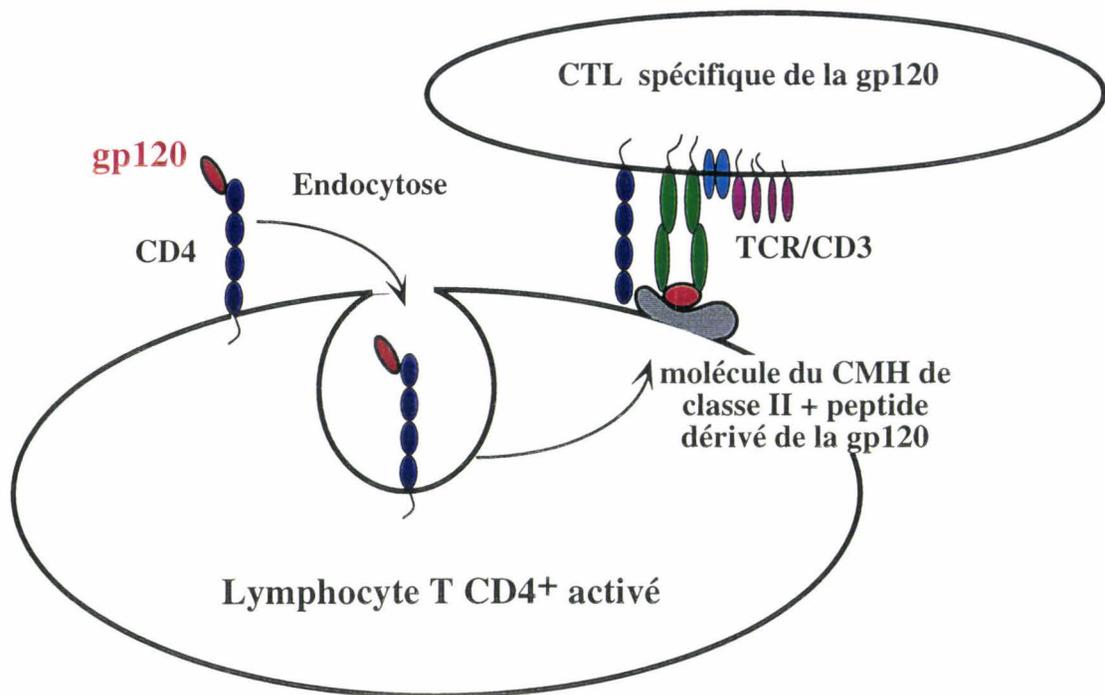
Plusieurs observations soutiennent de façon indirecte cette hypothèse:

- d'une part les isolats viraux obtenus avant les premiers symptômes ne sont pas cytopathogènes alors que les isolats pris après sont capables d'induire les syncytia ou la dégénérescence des cellules par gonflement (Cheng-Mayer et al., 1988).
- D'autre part il semble que les isolats capables d'induire les syncytia émergent avec la progression de la maladie chez certains individus.
- Enfin, les fortes répliquations *in vitro* semblent corrélées avec le phénotype SI (capables d'induire la formation de syncytia) et une rapide déplétion des lymphocytes CD4<sup>+</sup> *in vivo*. Rassemblées, ces différentes observations, pourraient s'expliquer par l'existence d'un lien entre la capacité du virus à former des syncytia et le caractère cytopathogène du virus en particulier pour les cellules CD4<sup>+</sup>. Plusieurs études ont d'ailleurs confirmé l'association du phénotype SI avec un rapide déclin du nombre des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et la progression vers un SIDA (Bozette et al., 1993; Richman and Bozzette, 1994).

Cependant, malgré ces résultats, l'idée selon laquelle la formation des syncytia serait un mécanisme majeur de déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> *in vivo* présentent certaines contradictions.

En effet, les études effectuées à partir des ganglions ou de la rate d'individus infectés montrent que les cellules géantes ne sont observées que rarement (Macher et al., 1988), mais cela peut s'expliquer par une détection difficile due à leur temps de vie très court.

De plus tous les isolats VIH-1 n'induisent pas de syncytia *in vitro* et dans 50% des cas la progression vers un SIDA n'est pas accompagnée par une transition du phénotype NSI (incapables d'induire la formation de syncytia) au phénotype SI (Tersmette et al., 1989). Enfin, la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> se produit durant la phase asymptomatique de l'infection quand les souches virales prédominantes sont les NSI.



**Fig:13**

**Lyse de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> cytolytiques spécifiques de la gp120.**

La gp120 soluble se fixe avec une forte affinité sur la molécule CD4 de lymphocytes non infectés. Elle est ensuite internalisée, puis sous forme de peptides, elle est associée aux molécules du CMHII et exprimée à la surface cellulaire.

Ces lymphocytes peuvent alors être lysés par des CTL CD4<sup>+</sup> spécifiques des peptides dérivés de la gp120. Ce mécanisme n'est possible qu'avec des lymphocytes activés, les cellules quiescentes n'exprimant pas le CMHII.

D'après R. F Siliciano

Le rôle précis de la formation des syncytia dans la pathogénèse de VIH reste donc encore à clarifier.

- **Le rôle des protéines virales relarguées par le virus ou par les cellules infectées**

Si l'idée de l'existence d'anticorps dirigés contre la molécule CD4, par production d'anticorps anti-gp120 (anti-idiotype) a été abandonnée, les effets de la gp120 soluble restent d'actualité. On a, en effet, jamais pu montrer l'existence d'anticorps (en quantité significative) qui participeraient au syndrome d'immunodéficience. Par contre, de nombreux résultats sont en faveur d'une participation de la gp120 dans les mécanismes de cytopathogénèse du VIH. Et même s'il est difficile d'évaluer le rôle que joue, *in vivo*, la gp120 libre, il est probable qu'au niveau des ganglions, en raison de la forte concentration cellulaire, le relargage de gp120 ait lieu (cf p28), et ne soit pas sans conséquence.

Plusieurs hypothèses de destruction ou d'inactivation des cellules CD4<sup>+</sup> non infectées dépendent de l'existence d'un phénomène de relargage de la gp120 de la surface des cellules infectées ou des virions et de la fixation de cette gp120 aux molécules CD4 sur les cellules non infectées.

### **ADCC**

la fixation de la molécule gp120 sur le récepteur CD4 à la surface des lymphocytes peut servir de cible pour la lyse de ces lymphocytes par un mécanisme de cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Dans le cadre d'une réponse immune normale, ce mécanisme contribue à la destruction des cellules infectées exprimant des protéines virales à la surface cellulaire (Lanzavecchia et al., 1988).

### **Lyse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dépendante de la gp120 par des lymphocytes CD4<sup>+</sup> cytolytiques spécifiques de la gp120.**

Lorsque la gp120 se fixe à la molécule CD4 sur des lymphoblastes CD4<sup>+</sup>, elle subit une endocytose puis un "processing" à l'intérieur de la cellule pour s'associer avec les molécules du CMH de classe II. Ces cellules peuvent ensuite être lysées par des CTL CD4<sup>+</sup> spécifiques de la gp120. Ce mécanisme est décrit par la *figure 13*, d'après R. F. Siliciano (Siliciano, 1996).

### **Cytotoxicité dépendante du complément**

Dans la même optique, les cellules CD4<sup>+</sup> ayant fixé à leur surface la gp120 soluble pourraient devenir la cible de cellules NK qui les détruiraient par cytotoxicité dépendante du complément (Lyerly et al., 1987; Speth et al., 1997).

## V. L'apoptose

### A. Définitions historiques

Au siècle dernier, peu de temps après avoir admis que les organismes sont constitués de cellules, les observations faites sur des métamorphoses d'amphibiens ont conduit les biologistes du développement à impliquer la mort cellulaire dans le développement animal. Plus tard, l'utilisation d'inhibiteurs de synthèse de l'ARN et de protéines a permis de montrer que cette mort nécessite la synthèse de macromolécules. Comme dans certains cas, il apparaissait qu'elle pouvait aussi être bloquée par des substances libérées par d'autres tissus, il en ressortait que cette mort n'est pas inévitable. Avant même la définition moléculaire de l'apoptose, ce phénomène de mort cellulaire, intervenant à des endroits et des moments prédictibles durant le développement d'un organisme a été appelé "mort cellulaire programmée", pour insister sur le caractère préétabli de ce phénomène.

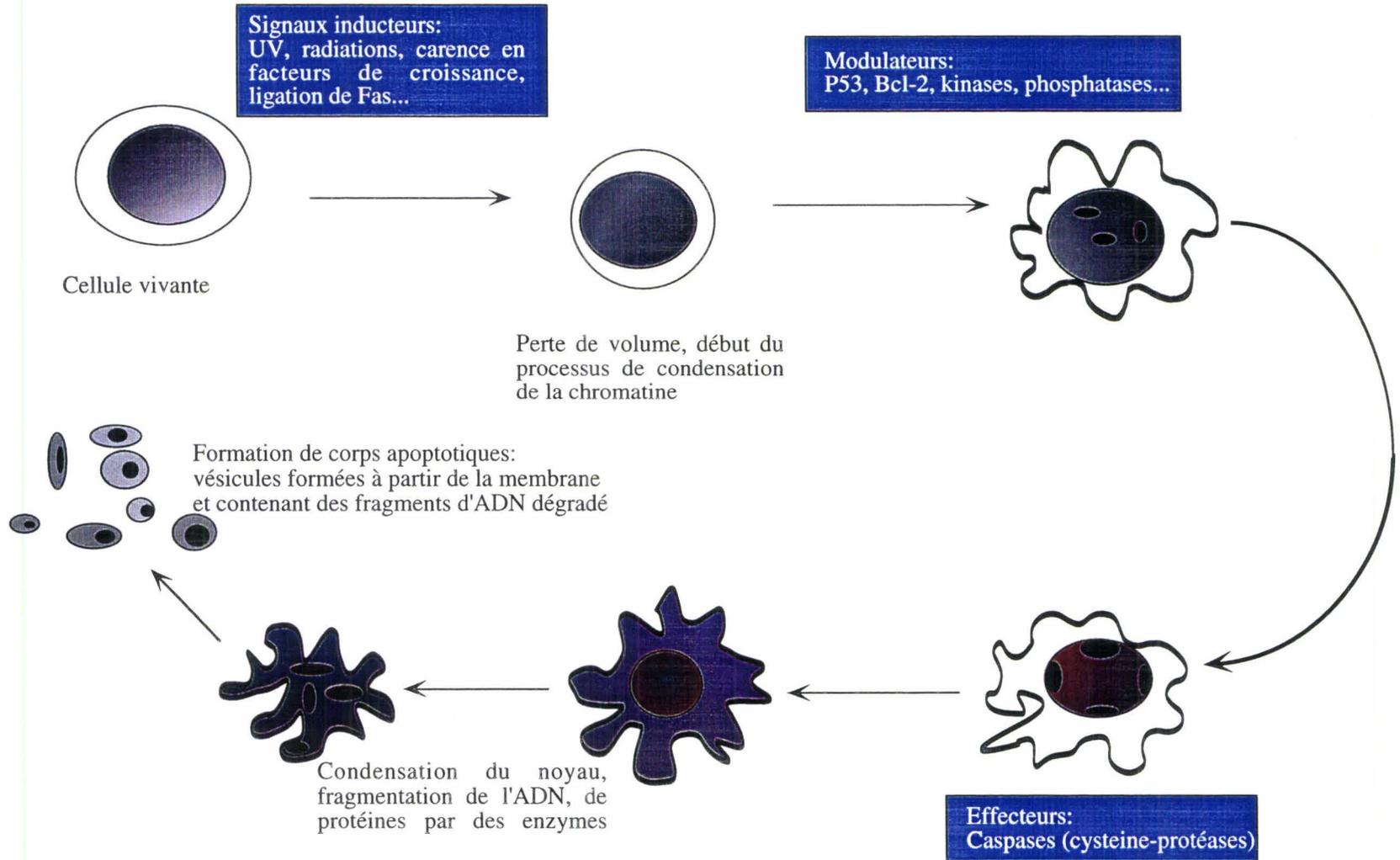
En 1972, Kerr, Wyllie et Currie (Kerr et al., 1972) montrent à partir d'éléments morphologiques qu'il existe une distinction claire entre la mort intervenant d'une part lors du développement animal, lors de l'homéostasie tissulaire ainsi que lors de pathologies, et d'autre part la mort des cellules intervenant au centre de lésions aiguës comme le trauma et l'ischémie. Dans ce dernier cas, le cytoplasme et les organelles commencent par gonfler puis la membrane plasmique est lysée dans un processus appelé **nécrose cellulaire**. Le contenu cellulaire est alors libéré dans le milieu extracellulaire, ce qui conduit à une inflammation caractéristique de la nécrose. Au contraire, lors du premier cas cité, les cellules prennent un aspect granuleux, se condensent, les organelles et la membrane plasmique gardent leur intégrité dans un processus que Kerr et ses collègues ont appelé **apoptose** (Kerr et al., 1972). Les cellules mortes sont ensuite rapidement phagocytées par les cellules voisines ou les macrophages avant qu'il n'y ait libération du contenu des cellules, ainsi, la réponse inflammatoire n'a pas lieu.

Parce que la mort par apoptose semble souvent similaire de tissu à tissu et d'un animal à l'autre, Kerr et ses collaborateurs ont proposé que cette mort reflète l'opération d'un programme actif intracellulaire de mort qui peut être activé ou inhibé par divers stimuli physiologiques et/ou pathologiques.

Cependant, il aura fallu 20 ans et la découverte de gènes impliqués dans la régulation du programme de mort chez le nématode *Caenorabditis elegans* pour que l'idée de l'existence d'un programme de mort ou de suicide inclus dans le génome de chaque cellule soit acceptée de tous. Par la suite, les gènes mis en évidence chez *Caenorabditis elegans* ont permis l'identification d'homologues chez les mammifères (Peter et al., 1997).

Fig 14

## Différentes étapes de l'apoptose



A l'heure actuelle, le terme de mort cellulaire programmée a pris un sens différent du sens originel, il se rapporte en général à n'importe quelle mort cellulaire médiée par un programme intracellulaire de mort, peu importe ce qui la déclenche.

Employé au sens strict, le terme apoptose désigne le phénotype des cellules en train de mourir. Mais le terme est aussi utilisé dans une acception plus large pour désigner la mort cellulaire programmée. C'est dans ce sens élargi, que nous l'utiliserons au cours de ce travail.

## **B. Caractérisation morphologique, génétique et biochimique de l'apoptose.**

Lors du processus de mort cellulaire programmée, il est possible de distinguer différentes étapes (*cf figure 14*):

-La **phase précoce** correspond au stimulus inducteur d'apoptose. Ce peut être un signal externe délivré par des récepteurs de surface situés sur une cellule distincte de celle qui va mourir, ou un signal d'origine intracellulaire, notamment lors d'action de drogues, de toxines ou de radiations.

-La phase suivante inclut la **détection du signal** (qui peut être un état métabolique) et la **transduction** de ce signal qui active les effecteurs de la mort cellulaire.

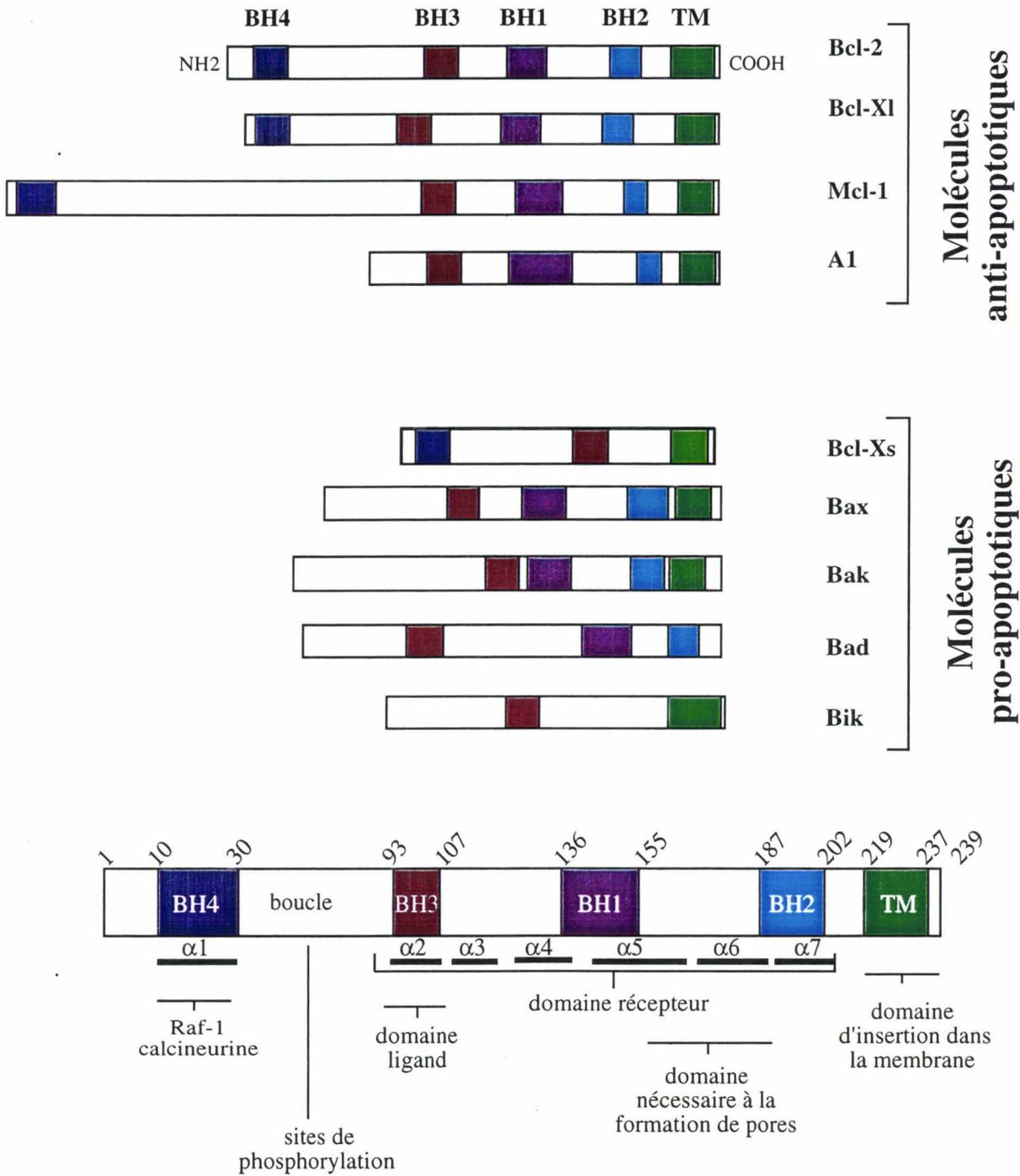
-La **phase effectrice** met en jeu les protéases activées durant l'apoptose, de même que leurs régulateurs positifs ou négatifs. Ces protéases contribuent par le clivage de substrats spécifiques à donner les caractéristiques biochimiques et morphologiques de l'apoptose. En particulier, elles permettent l'externalisation de la phosphatidylsérine, qui permet aux macrophages de reconnaître la cellule apoptotique pour la phagocyter. Ce phénomène de phagocytose, qui peut être précoce, explique la difficulté de détection des cellules en apoptose *in vivo*.

-La dernière phase se produit après la mort en elle-même. La chromatine se condense et **l'ADN est dégradé** par des endonucléases spécifiques.

### **1. morphologie**

Comme cela a été expliqué antérieurement, l'identification d'une cellule apoptotique repose avant tout sur des critères morphologiques stéréotypés dominés par la condensation de la chromatine nucléaire, la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques et leur phagocytose par les cellules voisines. Contrairement à ce que l'on observe pour la nécrose, la chromatine ne flocule pas, les mitochondries ne gonflent pas, la membrane cellulaire n'est pas perméable aux colorants vitaux.

## Quelques membres de la famille de Bcl-2



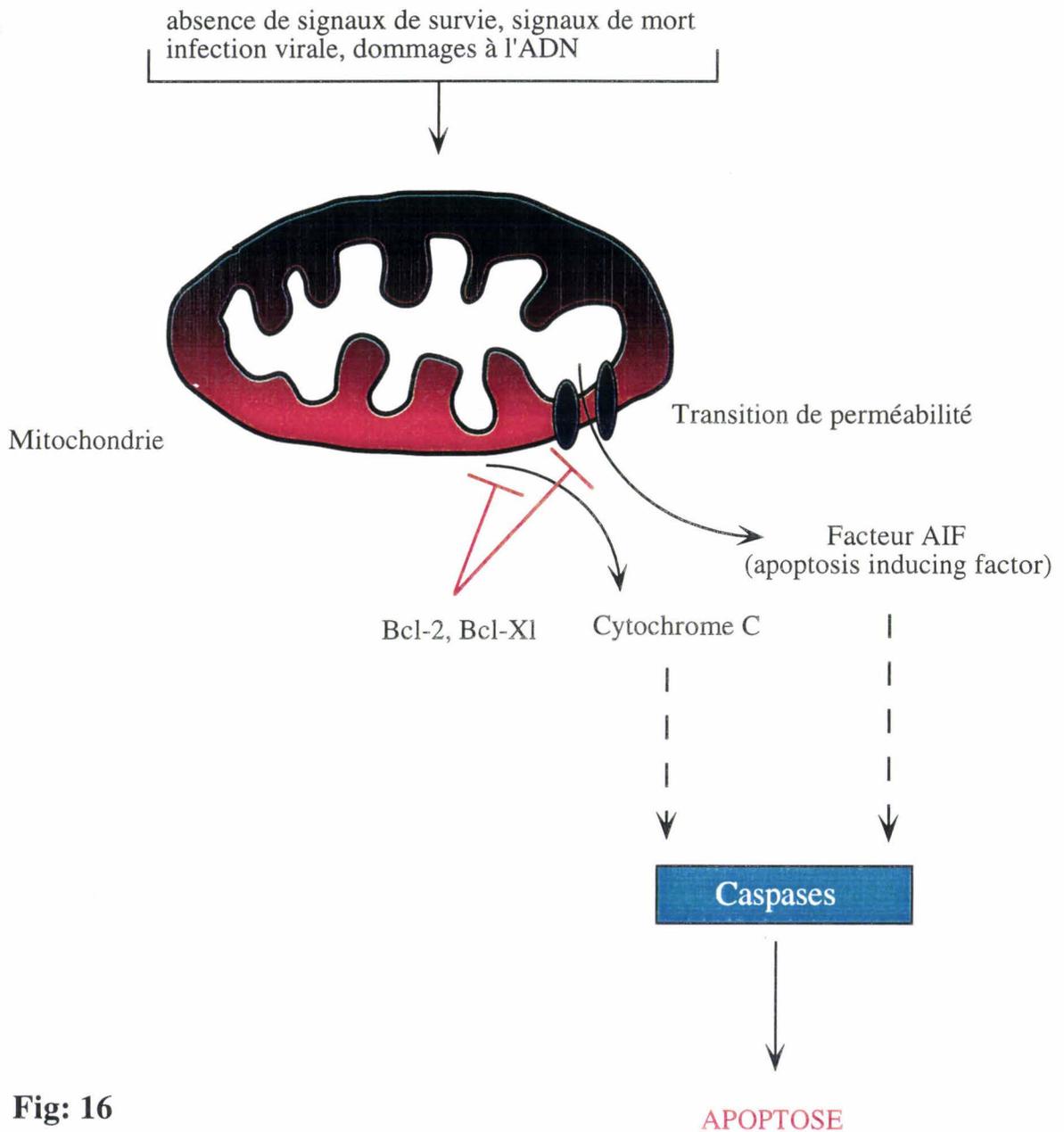
### Structure de Bcl-2

Structure générale valable pour Bcl-XL

Mcl-1

A1

Fig 15



**Fig: 16**

**Action de Bcl-2 au niveau des mitochondries.**

Elle s'exercerait à deux niveaux: la régulation des échanges ioniques au niveau de canaux transmembranaires responsable de la perméabilité de la mitochondrie, et au niveau de l'ancrage de protéines impliquées dans la transduction de signaux apoptotiques.

D'après Mignotte et al 98.

## 2. Quelques gènes de l'apoptose.

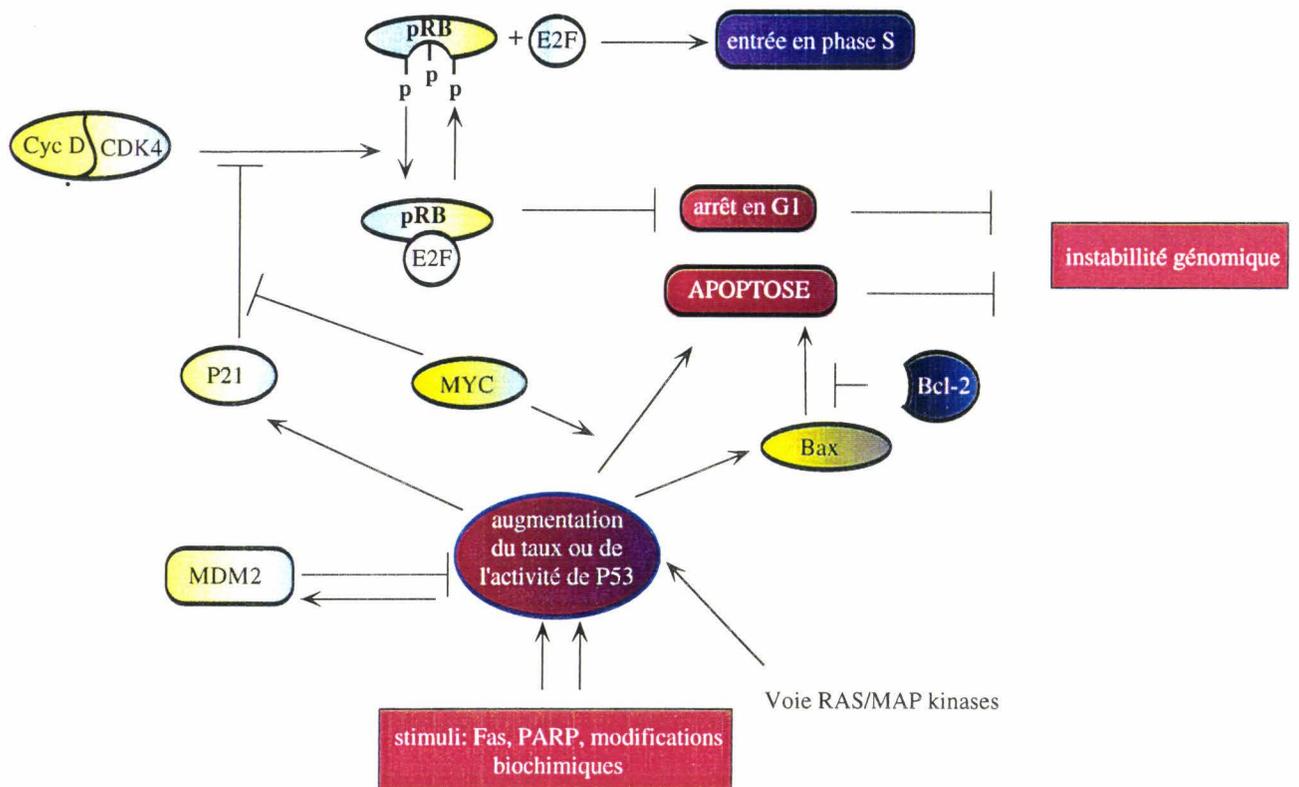
Historiquement, les premiers gènes impliqués dans la mort cellulaire programmée ont été décrits chez *Caenorabditis elegans* à partir de mutants. Il s'agit de 3 gènes : 2 gènes inducteurs de mort, *ced* (pour cell death) 3 et *ced-4*, et un gène protecteur de mort *ced-9* (Chinnaiyan et al., 1997). Les gènes *ced-3* et *ced-9* partagent des homologies de séquence avec 2 gènes de mammifères: ICE pour interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (Nicholson et al., 1995) et *bcl-2*. L'homologue de *ced-4* chez les mammifères est nécessaire à l'activation des caspases-3 (Zou et al., 1997). ICE peut induire l'apoptose de certaines cellules de mammifères alors que *bcl-2* prévient la mort programmée de cellules mammifères et peut se substituer à *ced-9* chez *Caenorabditis elegans* (Vaux et al., 1992). Ces deux premiers gènes sont les membres de deux grandes familles: ICE fait partie des Cysteines protéases qui constituent des effecteurs inducteurs de l'apoptose, *bcl-2* est un proto-oncogène associé à la membrane mitochondriale, nucléaire et du reticulum endoplasmique, qui possède dans sa séquence en acides aminés des zones conservées avec *ced-9* mais aussi avec nombre de protéines de mammifères qui peuvent être protectrices ou inductrices d'apoptose (Kroemer, 1997).

Cette famille étant la seule à posséder des protéines anti-apoptotiques, elle sera la première décrite. Les principales protéines inductrices d'apoptose seront exposées ensuite.

### a) La famille de *bcl-2*

Les protéines de la famille de Bcl-2 sont codées par une famille de gènes présentant des régions de séquences conservées, appelées BH pour *bcl-2* homology domain (*cf fig 15*). Cette famille est constituée de protéines à activité anti-apoptotique (Bcl-2, Bcl-Xl, Bag-1, Mcl-1, A-1) ou pro-apoptotique (Bax, Bak, Bcl-Xs, Bad). Les molécules anti-apoptotiques possèdent un domaine BH4 qui leur est spécifique. Le mécanisme d'action de ces protéines est encore mal connu, mais il semble établi que la décision que prend une cellule de s'engager ou non dans la voie de l'apoptose est le résultat d'un équilibre fragile entre les formes pro-apoptotiques et les formes anti-apoptotiques, *via* des jeux multiples d'homo ou d'hétérodimérisation (Oltvai et al., 1993; Gajewski and Thompson, 1996). D'autre part, l'analyse tridimensionnelle de Bcl-xl a révélé une similarité frappante avec les domaines de toxines bactériennes responsables de la formation de pores dans les membranes cellulaires. Les structures qui se rapprochent le plus de celle de Bcl-xl sont celle de la toxine diphtérique et celle des colicines bactériennes qui forment toutes deux des pores.

Ces observations, ainsi que d'autres travaux, suggèrent que les protéines de la famille de Bcl-2 forment des canaux ioniques ou protéiques ou les deux. Ainsi, il a été montré par des expériences de transfection, et des études à partir de membranes lipidiques



**Fig: 17**  
**contrôle du cycle cellulaire et induction d'apoptose**

p53 est accumulé, modifié et activé en réponse aux signaux produits à la suite de certains stress.

Plusieurs protéines incluant fas et PARP sont impliquées dans son activation, mais les voies qui conduisent à sa modification sont inconnues. la voie Ras/MAP kinases est impliquée dans l'établissement du niveau basal de p53, et affecterait aussi son fonctionnement.

Certaines des fonctions cellulaires de p53 peuvent être perturbées par la dérégulation de l'expression de MYC, Bcl-2 ou E2F.

Le contrôle de l'activité de P53 comprend une boucle d'autorégulation impliquant MDM2.

Les voies dépendantes de p53 contribuent au maintien de l'intégrité génomique par élimination des cellules endommagées. p53 régule aussi l'entrée en mitose.

D'après Agarwal et al, 98

synthétiques, que Bcl-2 aurait une fonction de transport membranaire avec des effets sur le flux calcique et la translocation à travers certaines membranes intracellulaires, en particulier mitochondriales (Newmeyer et al., 1994; Zamzami et al., 1996). Par ailleurs, Bax, un membre pro-apoptotique de la famille de Bcl-2 a la propriété, comme Bcl-Xl et Bcl-2, de former des canaux *in vitro*. Cette protéine peut s'hétérodimériser avec Bcl-2 et Bcl-Xl pour donner des canaux hétéromériques intégrés à la membrane du RE, mitochondriale ou nucléaire. L'hétérodimérisation empêcherait Bcl-2 et Bax de subir les changements conformationnels nécessaires à leur intégration dans les membranes, bloquant ainsi la formation des canaux, ce qui permettrait la survie cellulaire. Les canaux formés dans les membranes mitochondriales rendraient possible le passage d'un facteur inducteur d'apoptose (AIF) dont l'activité peut être neutralisée par un peptide inhibiteur de caspase (Susin et al., 1996) (*cf fig 16*).

Les dernières connaissances et références bibliographiques sont résumées dans deux revues de Kroemer et Reed (Kroemer, 1997; Reed, 1997).

### *b) les gènes régulateurs du cycle cellulaire*

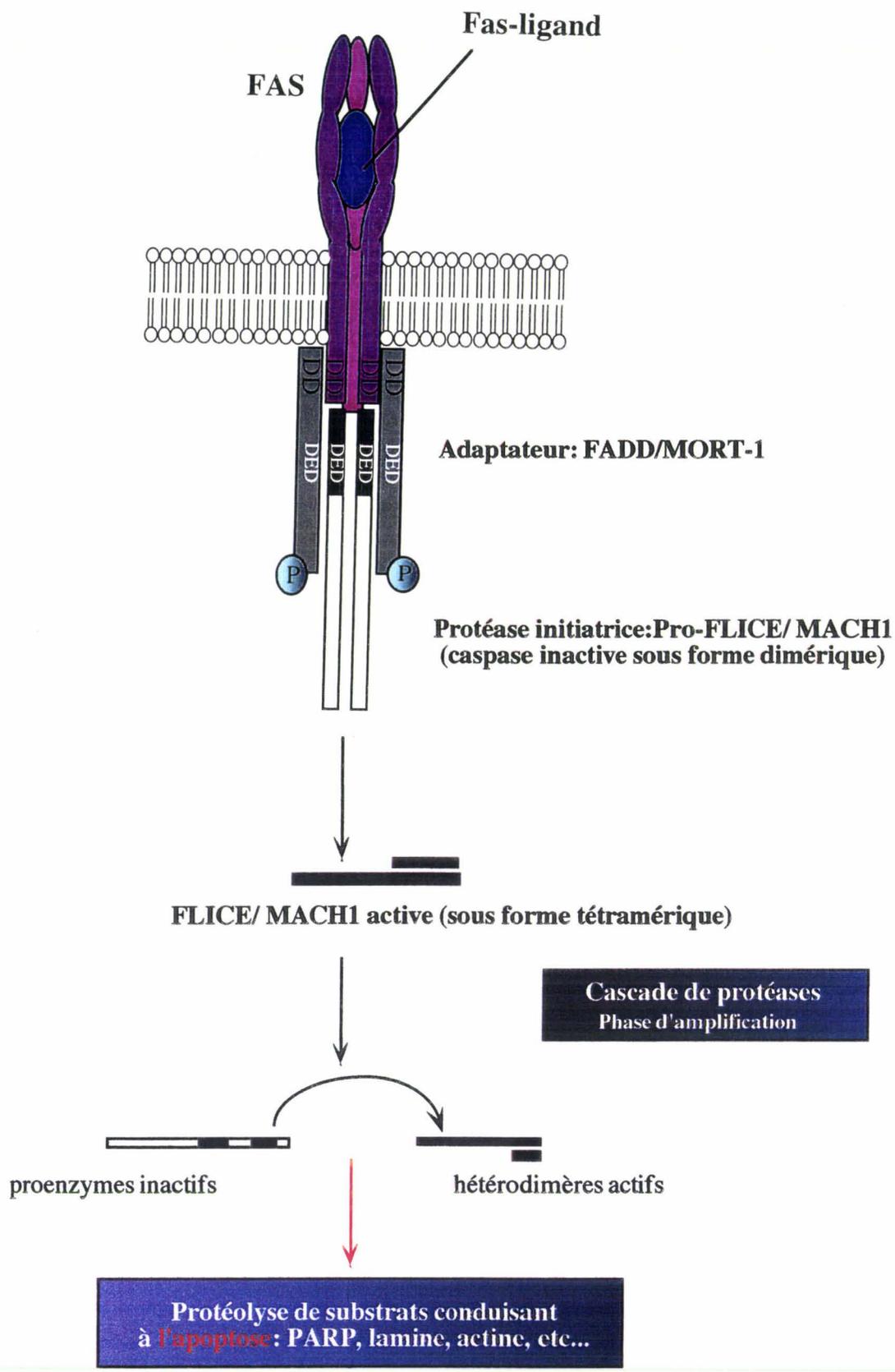
Parmi les tout premiers gènes décrits comme étant impliqués dans l'apoptose, le proto-oncogène c-myc et le supresseur de tumeur p53 ont très vite été caractérisés comme des molécules pro-apoptotiques dans certaines conditions comme la déprivation de facteurs de croissance, pour revue: (Levine, 1997; Agarwal et al., 1998). Cependant, il faut préciser que l'induction d'apoptose par c-myc ou p53, dans des cellules normales, semble nécessiter un double stimulus.

L'induction d'apoptose par c-myc et p53 a été partiellement corrélée à leur capacité d'activateur transcriptionnel de certains gènes régulateurs du cycle cellulaire.

c-myc transactive plusieurs produits de gènes incluant l'ornithine decarboxylase, cdc25A et B (cdc25 régule l'entrée en mitose en déphosphorylant une tyrosine de cdc2). La surexpression de ces molécules miment la réponse apoptotique induite par c-myc.

Tout récemment, l'apoptose induite par c-myc a été reliée à d'autres voies classiques de l'apoptose: les caspases (dans le cas étudié une caspase de la famille de CPP32) (Kagaya et al., 1997) et le ligand de Fas (Hueber et al., 1997). Il semble que ce type d'apoptose nécessite l'interaction à la surface membranaire de Fas et de son ligand, d'autre part l'induction de cette mort est bloquée par des inhibiteurs de caspases.

L'apoptose induite par p53 s'expliquerait par des mécanismes à la fois dépendant et indépendant de la transcription (*cf fig 17*). Parmi les gènes cibles de p53 impliqués dans l'activation de l'apoptose: bax (Miyashita and Reed, 1995) et, de façon plus faible, Fas (Owen-Schaub et al., 1996). Les éléments en faveur de signaux apoptotiques indépendants de la transactivation proviennent d'expériences dans lesquelles la traduction ou la transcription sont bloquées par de la cyclohexamide ou de l'actinomycine D et lors



**Fig :18**  
**Cascade consécutive à l'activation Fas.**  
 Les caspases impliquées sont les caspases 8, 3 et 7  
 Adapté de Nicholson et Thornberry.

desquelles l'apoptose a lieu normalement. Il a été suggéré que dans ce cas p53 interagirait avec les hélicases par l'intermédiaire de sa partie C-terminale (Wang et al., 1996), ou pourrait aussi signaler par son domaine N-terminal (Haupt et al., 1995), pour induire l'apoptose.

p53 serait également impliquée dans l'apoptose déclenchée par une autre protéine responsable du contrôle du cycle cellulaire: E2F-1 (Qin et al., 1994).

E2F-1 est un autre facteur de transcription qui régule à la fois l'entrée en mitose et l'induction d'apoptose. E2F-1 est complexé avec pRB déphosphorylé pendant la phase G0-G1. La libération de E2F-1 après la phosphorylation par des CDKs avant l'entrée en phase S permet l'activation de certains gènes nécessaires à l'entrée en phase S incluant c-myc. Des souris mutantes pour E2F-1 sont déficientes pour l'apoptose dans certains tissus. Cependant, on ignore encore si ce phénotype est dû à une expression de c-myc ou de cdc25.

### c) *l'antigène Fas et son ligand*

#### • *FAS (cf fig 18 adaptée de Nicholson et Thornberry, 97)*

Fas (connu aussi sous le nom de APO-1 ou CD95), le récepteur pour Fas-ligand, appartient au groupe des protéines membranaires de type I ainsi qu'à la famille du TNF récepteur. Il s'agit d'une protéine transmembranaire de 319 aa. Comme les membres de la famille du TNF récepteur, Fas possède dans sa région extra-cellulaire des sous-domaines de cystéines répétées. Les régions cytoplasmiques des différents membres sont peu homologues entre eux sauf pour Fas, TNFR1, DR3 qui possèdent un domaine de 68 aa en commun que l'on appelle "domaine de mort" car sa délétion supprime l'induction de mort cellulaire. Ce domaine d'interaction protéine/protéine permet la transduction du signal apoptotique et l'activation du facteur nucléaire NF $\kappa$ B. La fixation de Fas-ligand à Fas ou la ligation de Fas par un anticorps agoniste induit l'apoptose des cellules qui expriment Fas à leur surface. Les principales caractéristiques et propriétés de l'antigène Fas sont résumées dans une revue de Nagata (Nagata, 1997).

Grâce aux techniques biochimiques et du double hybride, de nombreuses molécules intervenant dans le signal de mort induit par Fas ont pu être caractérisées. Parmi les protéines identifiées: FADD/MORT-1 interagit avec le domaine de mort du récepteur Fas. Cette protéine possède un domaine effecteur de mort (DED), qui est suffisant si on le surexprime pour induire l'apoptose. Récemment une molécule se fixant au domaine DED de la protéine FADD a pu être identifiée. Cette protéine, FLICE/MACH1 (Boldin et al., 1996; Medema et al., 1997), possède des similarités avec la famille des caspases et plus particulièrement la branche de CPP32. Une phosphatase interagissant avec le domaine intracytoplasmique de Fas (FAP-1) a aussi été mise en évidence par le double hybride (Sato et al., 1995), elle posséderait une fonction inhibitrice de l'apoptose.

La molécule Fas est exprimée de manière assez ubiquitaire dans le thymus, le coeur, les ovaires, le foie, les poumons, les reins, les ganglions lymphatiques. Dans le système lymphoïde, elle est exprimée sur de nombreuses lignées T ou B.

- **Le ligand de Fas**

Le ligand de la molécule Fas (Fas-L) a été récemment isolé chez la souris et chez l'homme. Il s'agit d'une molécule de 40kDa qui appartient à la famille du TNF. C'est une protéine transmembranaire de type II qui compte 280 acides aminés. L'homologie entre Fas-L et le TNF $\alpha$  (qui est un trimère) suggère que Fas-L existe sous forme trimérique et que par conséquent, Fas est aussi un trimère. Fas-L existe aussi sous forme soluble par un clivage effectué par une metalloprotéase.

Fas-L est exprimé très fortement dans les testicules, plus faiblement dans les ganglions lymphatiques, la rate, les poumons. Dans le système lymphoïde, l'expression de Fas-L est limitée aux cellules de la lignée lymphocytaire T incluant les lymphocytes T cytotoxiques, les lymphocytes T auxiliaires (surtout Th1 et plus rarement Th0 et Th2). *In vitro*, une stimulation par un anticorps anti-CD3 conduit à l'expression de Fas-L sur les lymphocytes T normaux préactivés.

- **Mécanisme**

La mort par Fas et son ligand pourrait faire intervenir 2 types de mécanisme.

Le premier mécanisme consiste en un suicide d'une cellule exprimant à la fois Fas et son ligand. Fas-L agirait alors soit sous forme soluble autocrine (résultant d'un clivage protéolytique ou d'une sécrétion) soit par contact à la surface de la même cellule.

Le deuxième mécanisme met en jeu deux cellules distinctes. Fas-L agirait alors sous forme soluble paracrine, soit sous forme membranaire par contact cellulaire direct.

#### *d) les protéines kinases*

- **Les tyrosines kinases**

Les domaines cytoplasmiques de nombreux récepteurs de facteurs de croissance sont des protéines tyrosine kinases (le récepteur à l'EGF, au PDGF). Le TCR comme cela a déjà été dit, ne possède pas par lui même d'activité tyrosine kinase, par contre la partie intracytoplasmique du complexe est en contact avec des PTK (Fyn, Lck, ZAP70) qui s'activent après ligation du TCR. Compte tenu de la position charnière des PTK, entre le signal inducteur et les cascades de serine/thréonine kinases, il est probable qu'elles contribuent à la transduction de message de mort, comme de prolifération.

Le cas de la p56<sup>lck</sup> a été étudié dans différents modèles, en utilisant en général des cellules exprimant une p56<sup>lck</sup> constitutivement active ou déficientes en p56<sup>lck</sup>. De nombreux résultats montrent que la p56<sup>lck</sup> transduit un message de mort lorsque l'on induit l'apoptose par activation du TCR (Chung et al., 1997; Di Somma et al., 1995; Oyaizu et

al., 1995). Par contre l'existence d'un lien entre l'apoptose induite par Fas et la p56<sup>lck</sup> semble sujet à controverse (Oyaizu et al., 1995; Schraven and Peter, 1995).

#### • Les sérine/thréonine kinases

En aval, deux voies parallèles de cascades de kinases intègrent les signaux extracellulaires de croissance ou inhibiteurs: la voie "ERK" et la voie "JNK". Les deux voies sont impliquées dans l'activation par le TCR (cf p12). La voie ras/raf/MKK/ERK est engagée par une variété de récepteurs mitogéniques, notamment ceux dont les domaines cytoplasmiques sont des tyrosines kinases. En résumé, les signaux de croissance transmis par des mitogènes extracellulaires activent une cascade comprenant Ras, la sérine protéine kinase Raf-1, les MAP kinases kinases (MKK1 et MKK2) et les MAP kinases p42 et p44 connus sous le nom de ERK1 et ERK2. ERK1 et 2 activés induisent la production de protéines nécessaires pour la croissance cellulaire par phosphorylation de facteurs de transcription et de traduction.

L'autre voie, celle de la réponse au stress, conduit à l'activation de kinases telles que JNK et SAPK.

L'intégration des signaux délivrés en amont de ces cascades conduit soit à la survie et la prolifération, soit à la mort cellulaire. La ligation de Fas par exemple entraîne l'activation de JNK/SAPK et p38 qui conduiront à la mort (Toyoshima et al., 1997). Ras et Raf-1 peuvent interagir avec certains membres de la famille de Bcl-2 (Wang et al., 1996) et à l'inverse, contribuerait au maintien de la survie cellulaire; de plus l'anergie des cellules T induite par une activation sans second signal (cf p 19) pourrait s'expliquer par une inhibition de l'activité de Ras (Fields et al., 1996).

Même s'il semble y avoir un antagonisme entre la voie des ERK et la voie de JNK/ p38, l'une transduisant des signaux de croissance, l'autre des signaux inhibiteurs comme dans les exemples cités ci-dessus, il semble que suivant le modèle et le stimulus employés ce schéma ne soit pas toujours respecté. SEK, qui fait partie de la voie de JNK empêche l'apoptose des thymocytes induite par Fas ou CD3 (Nishina et al., 1997), pour d'autres encore la voie des JNK ne serait pas impliquée dans la mort par Fas (Lenczowski et al., 1997).

Enfin, l'interprétation que l'on se fait du rôle de ces cascades risque d'être d'autant moins simple que de nombreux travaux tendent à montrer des interactions possibles entre les kinases des différentes voies.

#### e) La famille ICE

C'est l'analyse génétique de *C.elegans* et la découverte du gène ced-3 qui a permis l'identification de son homologue ICE ou caspase-1 (cysteinyl Aspartate-specific proteinase-1) chez les mammifères. Cette enzyme, (l'Interleukine-1 $\beta$  Converting

### Super Famille des Protéases ICE Humaines

Protéases	autres noms	séquence reconnue	Substrat
<b><u>caspase-1</u></b>	ICE	YVAD	pro-IL-1 $\beta$ , pro-caspase 3 et 4
caspase-4 caspase-5	ICErel-II, TX, ICH-2 ICEre-III, TY		
<b><u>caspase-2</u></b> caspase-9	ICH-1 ICE-LAP6		PARP PARP
<b><u>caspase-3</u></b>	CPP32, Yama, apopain	DEVD	PARP, DNA-PK, SRE/BP, rho-GDI
caspase-6 caspase-7 caspase-8 caspase-9 caspase-10	Mch2 Mch3, ICE-LAP3, CMH-1 FLICE, MACH, Mch5 ICE-LAP6, Mch6 Mch4	VEID	lamine A PARP, pro-caspase 6  PARP PARP

La famille des caspases peut être divisée en trois sous familles: caspase-1 (ICE), caspase-2 (ICH1), et caspase- 3 (CPP32), d'après Alnemiri et al (1996).

Enzyme) fait partie des cystéines protéases. Elle est impliquée dans le clivage de substrats spécifiques tels que la polymérase Poly-ADP-ribose ou PARP dont le clivage protéolytique est l'un des premiers événements détectables pendant l'apoptose (Casciola-Rosen et al., 1996). Parmi les autres caspases identifiées, CPP32 (ou YAMA) clive aussi PARP. Il est important de noter que les inhibiteurs spécifiques de CPP32 empêchent à la fois le clivage de PARP et l'apoptose. Les caspases clivent aussi d'autres polypeptides connus durant l'apoptose, notamment les enzymes impliqués dans l'entretien du génome: la sous unité catalytique de 460 kDa de la protéine kinase dépendante de l'ADN, la protéine de 70kDa composant de la petite ribonucléoprotéine U1, la ribonucléoprotéine hétéronucléaire C et le composant de 140 kDa du complexe de réplication C.

Des régulateurs du cycle cellulaire sont aussi clivés, incluant la protéine du rétinoblastome (Jänicke et al., 1996) et de PKC $\delta$ . MDM2 qui fixe et retient p53 dans le cytoplasme est clivé ce qui permet à p53 d'entrer dans le noyau, l'arrêt en G1 dépendant de p53 et l'activation transcriptionnelle de gènes pro-apoptotiques comme bax.

Les protéines de structure du noyau et du cytosquelette qui sont clivés incluent les lamines, l'actine, GAS2. La dissociation du cytosquelette du noyau est aussi facilitée, au moins en partie, par le clivage de NuMA (nuclear mitotic associated protein). Enfin, les caspases participent à la phase finale de l'apoptose en activant par protéolyse DFF, le facteur de fragmentation de l'ADN. Les différents membres de la famille des caspases sont regroupés dans le tableau ci-contre, leur rôle dans l'apoptose par Fas est aussi décrit dans la *figure 18*.

## **C. Rôle de l'apoptose.**

### **1. Origines de la mort programmée**

Quel que soit le degré d'évolution et de complexité des organismes, qu'il s'agisse du règne animal, végétal ou fongique, de nombreux phénomènes de mort peuvent être rapprochés du programme de mort cellulaire et/ou du phénotype de l'apoptose tels qu'ils l'ont été décrits précédemment (Ameisen, 1996). Néanmoins, dans beaucoup de cas on ignore tout des mécanismes qui conduisent à cette mort et l'analogie reste superficielle. On s'accorde pourtant à dire que l'existence d'une possibilité d'induction de mort existe à la fois chez les procaryotes (dans le cas d'une carence ou d'une infection par exemple) comme chez les organismes dits supérieurs. Il semble que ce programme se soit d'abord développé comme stratégie de défense ou plutôt de survie de la population, puis que ce mécanisme se soit étendu au développement et à l'homéostasie des organismes multicellulaires. Chez les métazoaires, l'apoptose est à la fois un moyen d'élimination des cellules dangereuses pour l'ensemble de l'organisme comme un moyen de contrôle du

développement et de l'homéostasie de l'organisme dans son ensemble (Jacobson et al., 1997).

## 2. Une protection contre l'extension de la maladie

### a) *un moyen d'élimination des cellules dangereuses*

L'un des moyens pour un organisme complexe d'éviter le développement d'une maladie, la dissémination d'un pathogène et notamment d'un virus, consiste à éliminer les cellules infectées. Si l'on se restreint au cas de l'infection virale, la capacité qu'ont les cellules de se suicider lorsqu'elles sont infectées limite la production virale et réduit ou élimine l'expansion de la maladie. Cette idée a initialement été proposée par Clouston et Kerr (Clouston and Kerr, 1985) qui avaient observé l'apoptose de cellules, infectées par un virus, cibles des cellules T cytotoxiques. D'autres observations, comme le fait que des endonucléases caractéristiques de l'apoptose s'attaquent, à des stades précoces de l'infection, au génome viral, confirment l'idée que l'apoptose peut être considérée comme une stratégie de défense antivirale (Clem and Miller, 1993). Actuellement, de nombreux virus sont connus pour induire l'apoptose des cellules qu'ils infectent. On peut citer pour exemple le virus de Sindbis, le virus Influenza, le virus de l'anémie du poulet. D'autres exemples et leur référence sont exposés dans les revues de Shen et Shenk et Teodoro et Branton (Shen and Shenk, 1995; Teodoro and Branton, 1997).

### b) *Détournement du programme de mort par les virus*

De nombreux virus animaux, afin de produire suffisamment de virions pour infecter d'autres cellules ou de rester dans la cellule hôte à l'état de latence ont développé des stratégies de retardement de l'apoptose. Ces mécanismes, contrairement aux mécanismes d'induction, sont mieux connus, et de nombreux gènes viraux codant pour des inhibiteurs spécifiques de l'apoptose ont été décrits. Les virus bloquant le programme de mort incluent le virus Epstein-Barr qui code pour des homologues de l'IL-10 et Bcl-2 (Moore et al., 1990; Henderson et al., 1993); l'adénovirus qui code pour les produits E1B19K, E3-14-7K, E3-10-4K/14.5 qui inhibent l'apoptose médiée par le TNF (Krajcsi et al., 1996), ainsi que par Fas pour le dernier produit cité (Shisler et al., 1997), l'adénovirus produit aussi une autre protéine, E1B-55K, qui comme la protéine E6 de Papillomavirus inhibe l'apoptose en modulant l'activité de p53 (Scheffner et al., 1992; Yew and Berk, 1992); le cow pox virus qui code pour la serpine (produit du gène crmA) qui inactive ICE (Ray et al., 1992); Myxoma virus qui code T2 un homologue soluble du TNFR (Macen et al., 1996); le virus herpes simplex de type 2 inhibe l'apoptose en bloquant l'expression

du ligand de Fas (Sieg et al., 1996); le virus parainfluenza de type 3 bloque l'apoptose en induisant la production d'IL-10 (Sieg et al., 1996).

Le VIH, quant à lui, fait partie des virus inducteurs d'apoptose. Les résultats obtenus à partir de singes tendent à démontrer que le VIH n'a aucune nécessité de destruction du système immunitaire pour se répliquer et donc assurer sa diffusion. Il est donc probable que la destruction, et plus particulièrement l'induction d'apoptose de cellules non infectées, des cellules du système immunitaire humain par le VIH soit explicable par une inadaptation du virus à son hôte et réciproquement.

## **VI. APOPTOSE ET VIH**

La faible fraction de cellules T CD4<sup>+</sup> infectées, (qui de ce fait ne répondent pas normalement aux stimulations par le TCR), ne pouvant pas expliquer le déclin de la population T CD4<sup>+</sup>, des mécanismes indirects ont été proposés, (voir aussi p45).

La mort des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par induction mal appropriée du programme de mort cellulaire constitue l'une des principales hypothèses d'effets indirects du virus (Ameisen and Capron, 1991; Gougeon et al., 1991). Depuis la formulation de cette hypothèse, de nombreux résultats expérimentaux ont validé l'importance de l'apoptose dans la cytopathogénèse du VIH.

### **A. observations**

Expérimentalement, il a été possible de mettre en évidence, à la fois un état de non réponse (anergie) des cellules qui reflète le déficit qualitatif des premiers stades du SIDA, et l'apoptose de certaines populations cellulaires qui contribue au déficit immunitaire caractéristique du SIDA.

#### **1. l'anergie**

Dès la phase asymptomatique de l'infection par le VIH, la fonctionnalité des cellules T présente des défauts qualitatifs (Miedema et al., 1988; Clerici et al., 1989; Brinchman et al., 1991):

- d'abord, un déficit de production d'interleukine-2 (IL-2) en réponse à une stimulation par des antigènes de rappel,
- puis une altération de l'alloréactivité des cellules T,
- suivie de la perte des réponses aux mitogènes T .

Il est généralement admis que la stimulation de cellules anergiques par des anticorps anti-TCR, anti-CD3 ou par des super antigènes conduit à leur mort par apoptose.

Cette mort peut cependant être évitée par l'addition d'IL-2 dans le milieu de culture ou d'anticorps anti-CD28 (voir aussi p19).

## 2. l'apoptose

### a) *populations cellulaires touchées*

Un pourcentage anormal de cellules en apoptose prélevées chez des patients, par rapport à des cellules prélevées à partir de personnes saines, est aussi observable dès la phase asymptomatique.

Contrairement à l'hypothèse d'origine (Ameisen and Capron, 1991), l'apoptose ne touche pas uniquement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, elle concerne aussi d'autres populations cellulaires moins permissives au virus: les cellules neuronales (Everall et al., 1991; He et al., 1997), et d'autres encore, considérées comme non permissives: les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Meyaard et al., 1992; Lewis et al., 1994) et les lymphocytes B (Berberian et al., 1994; Samuelson et al., 1997).

Les mécanismes de l'apoptose de ces différentes populations cellulaires au cours de l'infection par VIH sont mal connus. Le taux anormal d'apoptose des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou B pourrait être une conséquence de la réponse proliférative (cf p41). D'autres mécanismes proches de ceux que l'on peut observer pour les cellules T CD4<sup>+</sup>, qui impliquent l'enveloppe virale, ont aussi été mis en évidence pour les cellules B (Berberian et al., 1994).

Cependant, malgré la détection d'un taux anormal de ces cellules en apoptose, on ne constate pas de diminution de ces populations, *in vivo*, (au moins à un stade précoce de la maladie), contrairement à ce qui est observé pour la population lymphocytaire T CD4<sup>+</sup>.

Ce paradoxe pourrait s'expliquer par le renouvellement moins rapide des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par rapport aux lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou aux lymphocytes B, pour des raisons intrinsèques ou à cause du VIH (Bonyhadi et al., 1993). La déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> apparaîtrait donc plus précocément par rapport aux autres populations sensibles à l'apoptose.

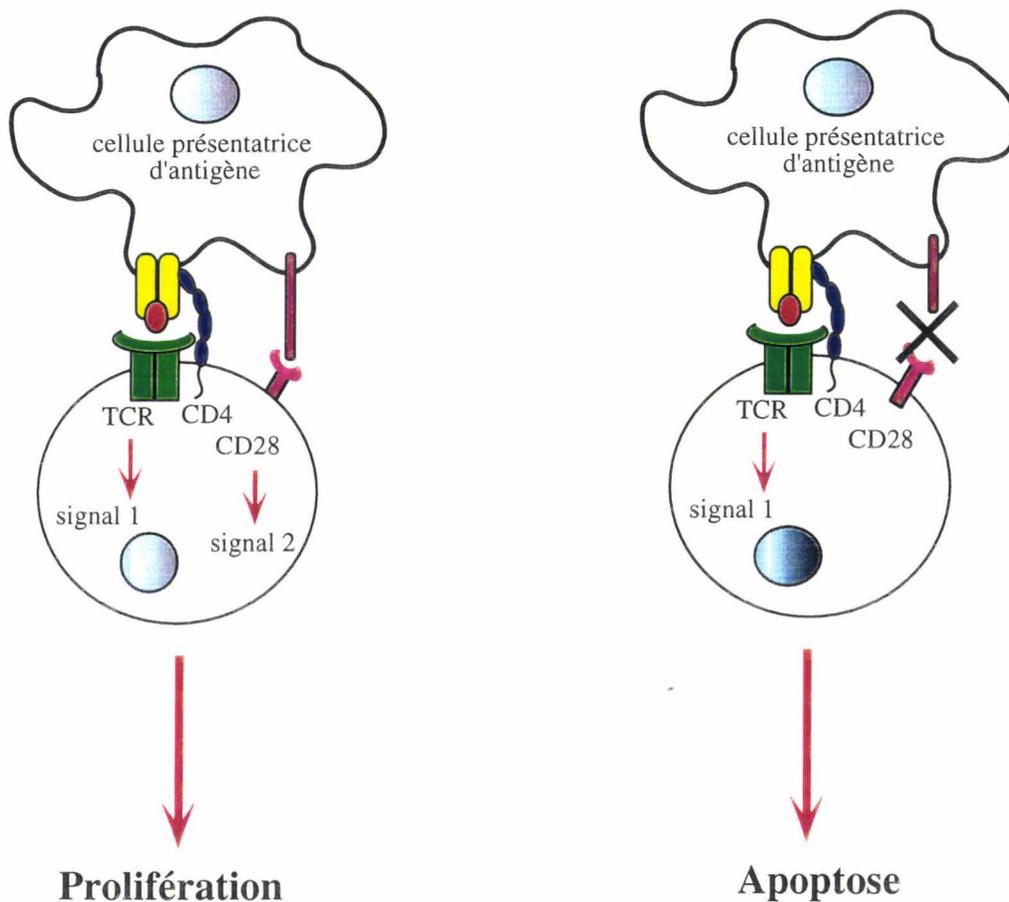
### b) *mise en évidence in vitro et in vivo*

Dans un premier temps, l'apoptose des cellules T CD4<sup>+</sup> de patients a été mise en évidence *in vitro*, ou *ex vivo* après stimulation par des mitogènes ou des super antigènes (Groux et al., 1992).

Par la suite, un taux anormal d'apoptose spontanée des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> a également pu être observé, toujours par rapport à des cellules prélevées à partir d'individus sains.

Fig: 19

**Explication du dysfonctionnement des CPA par la théorie du second signal**



**Prolifération**

Le lymphocyte T et la cellule présentatrice d'antigène sont normaux, l'antigène provoque une activation qui conduit à la prolifération

**Apoptose**

La cellule présentatrice d'antigène est infectée par le VIH et ne délivre pas le second signal. Ce dysfonctionnement conduit à l'apoptose du lymphocyte qui reçoit le signal.

La validité des observations faites *in vitro* s'est trouvée confirmée par des expériences effectuées à partir de coupes de ganglions lymphatiques ou de tissus intestinaux prélevés à partir de patients (Finkel, 1995; Muro-Cacho et al., 1995).

Il est d'ailleurs intéressant de noter que le taux anormal des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en apoptose observé *in vitro*, l'est aussi sur des coupes d'organes.

Compte tenu de ces observations, il est probable que l'apoptose participe à la cytopathogénèse du VIH et en particulier à la déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

Dans un souci de clareté, la suite de ce chapitre ne concernera que les cellules T CD4<sup>+</sup> qui constituent le sujet de cette thèse. Il faut toutefois garder à l'esprit le rôle central des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (cf p 8) et le fait que l'apoptose concerne aussi d'autres populations cellulaires, et qu'il est donc peu probable que la cytopathogénèse du VIH s'explique simplement avec pour seule hypothèse l'apoptose des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

## **B. Mécanismes inducteurs d'apoptose**

Les mécanismes proposés pour expliquer la mort des cellules non infectées sont de deux types et ne s'excluent pas l'un l'autre.

### **1. dysfonctionnement des Cellules Présentatrices d'Antigène**

Une première hypothèse s'appuie sur le fait que les CPA sont infectables et sur l'idée que la présence du virus dans ces cellules les rendrait incapables de délivrer les signaux nécessaires à l'activation et la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

#### **a) éléments de preuve**

Les indications qui permettent de penser que les CPA, et en particulier les macrophages, jouent un rôle important dans l'induction de la déplétion de la population T CD4<sup>+</sup> proviennent des modèles animaux.

- Le chimpanzé est infectable expérimentalement par le VIH, le virus est capable de se répliquer efficacement, mais l'infection ne conduit pas à un SIDA. Il est apparu que le virus semble ne pas pouvoir infecter les macrophages de ce primate (alors qu'il le peut chez l'homme). De plus, on n'observe pas d'apoptose des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de cet animal. Ces informations suggèrent une implication des macrophages dans l'induction de la mort des cellules T CD4<sup>+</sup> (Schuitemaker et al., 1993; Gougeon et al., 1997).

- Dans le cas d'infection de souris SCID humanisées, seules les souches monocytopiques, et non lymphocytotropiques, de VIH conduisent à la déplétion des cellules T (Mosier et al., 1993).

Le dysfonctionnement des CPA induit par le VIH pourrait se manifester de deux façons:

- d'une part, une stimulation inappropriée des cellules T CD4<sup>+</sup>
- d'autre part, un déséquilibre dans la sécrétion des cytokines.

### ***b) stimulation anormale des cellules T CD4<sup>+</sup>***

*(cf figure 19)*

Cette stimulation anormale correspondrait à une incapacité des CPA à délivrer le second signal nécessaire à l'activation T complète lors de la présentation de l'antigène (cf p19): en effet, une diminution de l'expression de la molécule B7 à la surface des CPA infectées a pu être observée (Meyaard et al., 1993). De plus, l'addition de co-signaux sous la forme d'anticorps anti-CD28 empêche l'apoptose de lymphocytes de patients et restaure leur prolifération (Groux et al., 1992; Tuosto et al., 1995).

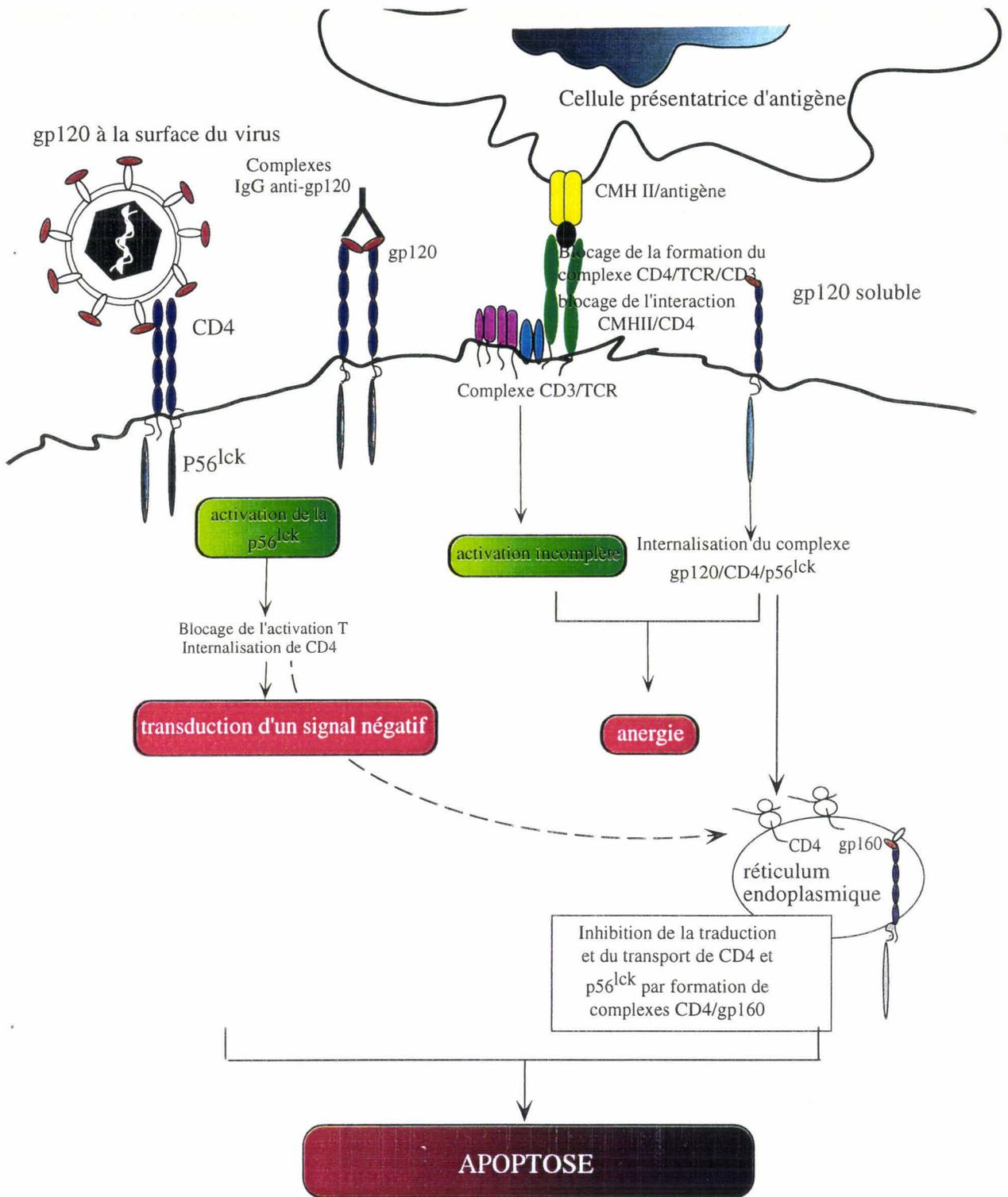
### ***c) sécrétion anormale de cytokines***

La production de cytokines des macrophages oriente la différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en sous-population Th1 ou Th2, et de fait, le type de réponse immunitaire (cf p8). Le déséquilibre du rapport de ces sous-populations pourrait contribuer à la désorganisation du système immunitaire, ainsi qu'à la déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup>. Ainsi, il a été observé que la progression vers un SIDA s'accompagne de la perte progressive de la réponse médiée par les Th1. Or il a aussi été montré que les cytokines de type Th1 (en particulier l'IL-12) protègent de l'apoptose induite par activation, alors que les cytokines de type 2 (en particulier l'IL-10) ne protègent pas, mais augmentent l'apoptose de cellules de certains patients (Clerici et al., 1994; Estaquier et al., 1995).

## **2. effets directs du virus**

*In vitro*, le virus peut induire l'apoptose des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de façon directe, sans que cela ne fasse intervenir les CPA. Toutefois, *in vivo*, il est impossible de dissocier les CPA des lymphocytes CD4<sup>+</sup>, puisque leur interaction est nécessaire pour la réponse immunitaire. Il est donc probable que les différents mécanismes d'induction d'apoptose se renforcent l'un l'autre.

Les effets directs du virus sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mettent en jeu diverses protéines produites par le virus, lorsque les cellules sont infectées ou pas.



**Fig: 20**  
**Induction de l'apoptose par la gp120, récapitulé**  
**des différentes hypothèses.**

La gp120 peut être inductrice d'apoptose qu'elle soit associée au virus, sous forme de complexes immuns, ou soluble.

D'après Bour et al, 95.

D'après les nombreux résultats obtenus jusqu'à maintenant, il apparaît que la protéine de l'enveloppe virale joue un rôle majeur dans l'induction de l'apoptose de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> par son interaction avec CD4. D'autres protéines viennent ensuite, leurs effets sont plus controversés que celui de la gp120. Il s'agit de la protéine transactivatrice Tat, et aussi, dans une moindre mesure, de la protéase virale et de Vpr.

### a) *interaction gp120 / CD4*

#### (1) Résultats préliminaires

De nombreux travaux, y compris *in vivo*, ont montré que la ligation de CD4 par des anticorps anti-CD4, suivie d'une activation du TCR entraîne l'apoptose des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou de cellules de lignée T CD4<sup>+</sup>. Cette mort peut être bloquée par des co-signaux (sous la forme d'anticorps dirigés contre CD28), ce qui suggère que la ligation de CD4 agit comme une activation T incomplète (sans cosignal délivré par les CPA) (Newell et al., 1990; Banda et al., 1992; Howie et al., 1994).

#### (2) Les effets de la gp120

(cf *figure 20*)

Par analogie, compte tenu de l'affinité de l'enveloppe du VIH pour la molécule CD4, et le rôle de cette molécule dans la réponse T, la possibilité d'un effet apoptotique dû à l'interaction de la gp120 avec la molécule CD4 a été envisagée.

Les nombreuses expériences réalisées jusqu'à maintenant démontrent que la gp120 et la réponse immune dirigée contre elle participent à l'induction d'apoptose des CD4<sup>+</sup> (Bour et al., 1995).

Il est important de distinguer deux cas:

- 1) lorsque l'enveloppe virale induit la mort de cellules non infectées sans infection
- 2) lorsqu'il y a infection

- Dans le premier cas cité, l'induction d'apoptose peut se produire de deux façons
  - d'une part, les cellules T CD4<sup>+</sup> non infectées peuvent subir l'apoptose au contact de cellules exprimant la gp120 à leur surface (CPA ou lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés) (Cohen et al., 1992; Heinkelein et al., 1995; Laurent-Crawford et al., 1993). Ce cas de figure pourrait se présenter dans les ganglions lymphatiques où la densité cellulaire est importante.
  - d'autre part, les cellules T CD4<sup>+</sup> non infectées, à distance de cellules infectées, peuvent subir l'apoptose après fixation de complexes gp120-anti gp120 sur la molécule CD4.

Il faut, en effet, préciser que ni la gp120 soluble seule, ni le virus inactivé par la chaleur ne peuvent induire l'apoptose des cellules CD4<sup>+</sup> (Corbeil and Richman, 1995).

Références biblio	Type de cellules exprimant la gp120	Mode de transfection, contrôle d'expression	type de cellules cibles	Technique de détection de l'apoptose	temps avant observation
Laurent-Crawford et al 93	CEM + gp120 + gp41	transfections transitoires par le virus de la vaccin	CEM	Profil d'histones, microscopie électronique	16 heures
Schwartz et al, 94	Hela	transfections stables par le phosphate de calcium, contrôle en WB cytométrie	SPB21 Clone T CD4 <sup>+</sup> IL-2 dépendant	acridine orange	2 jours
Maldarelli et al, 95	H9 (lignée T CD4 <sup>+</sup> )	infection chronique	H9	échelles d'ADN iodure de propidium	24 heures
Corbeil et Richman 95	supT1 (lignée T CD4 <sup>+</sup> )	infection	SupT1	iodure de propidium Microscopie électronique	2-3 jours
Kruger et al, 96	BJAB (lymphome B)	électroporation transfections stables, contrôle par immunofluorescence	BJAB, Hela CD4 <sup>+</sup>	observation de syncytia en microscopie optique	48 heures

Dans chacune de ces situations la gp120 pourrait amorcer l'apoptose:

-soit en envoyant un signal négatif à la cellule

-soit en interférant avec les signaux d'activation T, en provoquant une stimulation incomplète qui amorce l'apoptose.

Ces deux hypothèses de mécanisme sont en accord avec des résultats qui montrent que l'apoptose induite par la gp120 (comme l'apoptose induite par des anticorps anti-CD4) est blocable par des anticorps mimant un second signal d'activation d'activation (Tuosto et al., 1995). Elle peut aussi être bloquée par des inhibiteurs d'activation T ou des anti-CD4 qui n'empêchent pas la fixation gp120/CD4 mais modifieraient la transduction des signaux médiés par CD4 (Laurent-Crawford et al., 1993).

- cellules infectées

S'il est possible de détecter facilement l'apoptose de lymphocytes primaires ou de CEM infectées (Laurent-Crawford et al., 1991), le stimulus déclencheur de cette mort est encore sujet à controverses.

Deux principaux phénomènes sont généralement désignés comme responsables de l'induction d'apoptose des cellules infectées:

- la réplication virale

- ou/ et l'accumulation dans la cellule, l'expression à la surface cellulaire, de certains produits viraux (en particulier la gp120).

Un grand nombre de travaux ont maintenant été réalisés dans le but de mieux comprendre ce phénomène et différents systèmes ont été utilisés pour mettre en évidence le rôle de l'expression de la gp120 dans les cellules infectées.

Des résultats de transfection de la gp160 clivable par le virus de la vaccine ont mis en évidence l'apoptose des cellules transfectées (Laurent-Crawford et al., 1993). Néanmoins, le système est un peu délicat dans la mesure où le virus de la vaccine est connu pour lui-même induire de l'apoptose.

Un autre système utilisé a consisté à mettre des cellules chroniquement infectées en présence de cellules non infectées, puis à mesurer l'apoptose après un laps de temps ne permettant pas la transcription. En bloquant la réplication par la zidovudine, les cellules subissent l'apoptose, par contre si les cellules sont cultivées en présence d'anticorps anti-CD4, les cellules ne subissent plus l'apoptose (Maldarelli et al., 1995).

Corbeil et Richman, en utilisant des inhibiteurs de la réplication virale, sur des cellules SupT1 infectées montrent qu'un seul cycle de réplication est nécessaire, ainsi que l'expression de l'enveloppe virale et le contact avec CD4 (Corbeil and Richman, 1995).

En plus de ces expériences, il a aussi été rapporté que la gp120 pourrait perturber le cycle cellulaire, et induire un blocage en phase G2 qui conduirait à l'apoptose (Kolesnitchenko et al., 1995).

Ensemble, ces résultats suggèrent que les cellules infectées subissent l'apoptose par l'engagement de la gp120, qui doit d'abord être exprimée, à la surface de la cellule, et le contact CD4/gp120.

#### En résumé:

la gp120 induit l'apoptose des cellules qui l'expriment par contact avec d'autres cellules CD4<sup>+</sup>;

la gp120 exprimée à la surface d'une cellule induit l'apoptose des cellules non-infectées CD4<sup>+</sup>;

La gp120 induit l'apoptose des cellules non infectées CD4<sup>+</sup> par formation de complexes gp120/anti-gp120.

Qu'il s'agisse de cellules infectées ou non infectées, l'expression de la gp120 joue un rôle majeur dans l'induction d'apoptose. Cependant, le mécanisme par lequel se fait cette induction reste à déterminer.

D'autres effets cytotoxiques de la gp120 ont été rapportés p45. La mort que subissent les cellules après la formation de complexes CD4/gp120 dans le réticulum endoplasmique n'est jamais clairement désignée comme de étant l'apoptose, pour cette raison ce phénomène n'est pas abordé ici.

#### *b) Tat*

La protéine transactivatrice du VIH (cf p26) peut avoir des effets sur la survie des cellules infectées qui expriment la protéine Tat ou sur des cellules voisines infectées ou non, quand Tat est relarguée.

Son action sur les cellules infectées ou non, suivant les conditions d'expérimentation, reste actuellement sujet à controverses. Tour à tour, la protéine peut protéger de l'apoptose ou induire la mort:

#### Tat protège de l'apoptose:

elle rend les cellules résistantes à l'apoptose induite après activation lorsqu'elle est transfectée (Zauli et al., 1993).

#### Tat est une protéine anergisante:

à des concentrations nanomolaires, elle inhibe la prolifération des cellules T en réponse à certains stimuli antigéniques (Viscidi et al., 1989).

### Tat sensibilise les cellules à l'apoptose:

en présence de Tat exogène, les cellules deviennent sensibles à l'apoptose induite par activation (Westendorp et al., 1995; Zauli et al., 1996; Katsikis et al., 1997; McCloskey et al., 1997).

### Tat est inductrice d'apoptose:

elle provoque l'apoptose des cellules dans lesquelles elle a été transfectée ou simplement lorsque des cellules sont en culture dans un milieu contenant la protéine recombinante et sans aucun autre stimuli (Chiang et al., 1995; Purvis et al., 1995).

Pour tenter d'expliquer ces divergences de vues, différents auteurs ont émis l'hypothèse d'un double effet de Tat. Les effets contradictoires observés suivant les modèles dépendraient notamment de la quantité de Tat:

l'induction d'apoptose serait déclenchée par des niveaux nanomolaires, alors que des niveaux picomolaires sembleraient protéger de l'apoptose (Gibellini et al., 1995).

D'autre part dans le cas où Tat serait immobilisée, l'activation des cellules par un anti-CD3 également immobilisé provoquerait la prolifération des cellules alors qu'une incubation en présence de la molécule Tat soluble suivie de la même activation entraînerait l'apoptose (Zauli et al., 1996).

Enfin, l'équipe de MacCloskey (McCloskey et al., 1997) montre que l'addition de Tat exogène induit l'apoptose des cellules T infectées, alors que les cellules qui expriment Tat stablement sont protégées de l'induction d'apoptose par des stimuli tels que des anti-CD3.

### *c) la protéase du VIH*

Peu d'articles décrivent clairement d'autres protéines du VIH comme possédant des propriétés apoptotiques. Cependant des expériences effectuées sur la protéase du VIH (cf p26) ont montré que cette protéine est toxique pour la cellule qui l'exprime, et qu'elle pourrait induire une mort cellulaire par apoptose (Kräusslich, 1991). Cette toxicité serait induite par le clivage de composants du cytosquelette de la cellule hôte (Shoeman et al., 1990).

### *d) Vpr*

Une autre protéine virale pourrait contribuer à la déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup>. Il s'agit cette fois de la molécule accessoire Vpr (cf p27).

Il a d'abord été montré que la transfection du gène de Vpr, induit le blocage des cellules en G2 qui finissent par mourir par apoptose. Vpr a alors été désigné comme responsable de cette apoptose (He et al., 1995; Re et al., 1995; Stewart et al., 1997).

Néanmoins des résultats récents nuancent cette hypothèse. Certains auteurs considèrent, en effet, que le blocage des cellules en phase G2 permet une expression optimale du virus sans effet spécifique d'induction d'apoptose (Goh et al., 1998). Un autre groupe a même montré que Vpr serait une protéine anti-apoptotique: en modulant l'expression de Bax et Bcl-2, elle protégerait les cellules infectées de l'apoptose (Conti et al., 1998).

Le rôle exact de Vpr dans l'induction de l'apoptose en G2 reste donc à déterminer. En favorisant la réplication virale, il pourrait n'être responsable que de façon indirecte.

### **3. effets du virus sur l'expression de gènes cellulaires liés à l'apoptose**

L'infection de cellules T CD4<sup>+</sup> par VIH, ou la présence de cellules infectées avec des cellules non infectées est corrélée, dans de nombreuses études, à la variation d'expression de protéines telles que Fas ou son ligand ou dans une moindre mesure Bcl-2. Il est possible que ces variations soient imputables à la présence du virus et entraînent la mort cellulaire, mais on ne peut pas exclure actuellement que ces variations d'expression ne soient que la conséquence de l'induction de la mort.

#### **a) effet sur l'expression de Fas**

##### **(1) à la surface des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>**

Tout d'abord, de nombreux travaux ont mis en évidence une augmentation de l'expression de la molécule Fas à la surface des lymphocytes provenant de patients infectés par le VIH (Katsikis et al., 1995; Gehri et al., 1996), ainsi qu'une sensibilité plus élevée pour la mort induite par la ligation de Fas. Cette sensibilité, en particulier des cellules CD4<sup>+</sup>, a aussi été corrélée avec la progression de la maladie (Estaquier et al., 1996; Gougeon et al., 1997).

- Fas est surexprimé après ligation de CD4

Plusieurs expériences ont permis d'établir un lien entre la ligation de CD4 et la mort induite par Fas:

tout d'abord des résultats d'expériences effectuées sur des souris homozygotes pour la mutation *lpr* (défectives pour l'expression de Fas) montrent que les lymphocytes sont insensibles à la mort induite par la ligation de la molécule CD4 (Wang et al., 1994).

Au moyen d'autres modèles murins, il a aussi été montré que cette ligation induit une augmentation de l'expression de Fas, et la mort *via* cette molécule (Desbarats et al., 1996).

D'autres travaux confirment ces résultats, en corrélant la ligation du TCR ou de CD4 à une augmentation de l'expression de l'ARN messager du ligand de Fas.

Comme pour les expériences effectuées avec des anticorps anti-CD4, les résultats montrent que la ligation de la molécule CD4 par le VIH ou par la gp120 "cross-linkée" induit l'apoptose par l'intermédiaire d'une surexpression de la molécule Fas et d'une sensibilisation à la mort par Fas (Westendorp et al., 1995; Mitra et al., 1996).

Ces résultats suggèrent une corrélation entre CD4, Fas et Fas-L. Cependant le phénomène responsable de l'expression de Fas-L est encore inconnu.

Dans le cas de cellules infectées par VIH, il a été proposé que la ligation de CD4 par la gp120 augmenterait l'expression de Fas, et l'activation en présence de la molécule Tat serait responsable de l'expression de Fas-L (Krammer et al., 1994). Ainsi, l'activation de lymphocytes en présence de protéine Tat, de gp120 et d'anti-gp120 induit une apoptose importante inhibée par des anticorps anti-Fas antagonistes.

- Tat induit une augmentation de l'expression du ligand de Fas

D'autres résultats appuient l'hypothèse de Krammer, démontrant que Tat augmente l'expression du ligand de Fas (Westendorp et al., 1995).

## (2) à la surface des macrophages

Certains auteurs ont suggéré que l'induction d'apoptose des cellules non infectées observée notamment dans les ganglions lymphatiques pourrait être le fait de cellules accessoires comme les macrophages. Le mécanisme de cette induction d'apoptose passerait par une augmentation de l'expression du ligand de Fas ainsi que celle du TNF $\alpha$  et le contact de ces ligands avec leur récepteurs situés à la surface des lymphocytes non infectés (Badley et al., 1996; Badley et al., 1997).

### *b) Effets sur l'expression de Bcl-2*

En tant que gène de survie, Bcl-2 a été très étudié dans le cadre de différentes infections virales et notamment VIH. Malgré le nombre important d'études et de résultats obtenus, il reste difficile actuellement de corréler la diminution d'expression Bcl-2 avec l'apoptose induite par VIH ou l'augmentation d'expression avec l'installation d'une infection chronique. De nombreux résultats contradictoires ont en effet été publiés.

Les études effectuées *ex vivo*, d'une part avec des cellules de chimpanzés infectés par VIH, d'autre part avec des cellules de patients, soutiennent peu l'idée d'une modulation de bcl-2 comme explication de l'apoptose induite par VIH.

En effet, à partir des cellules de chimpanzés, il a été montré que l'expression de Bcl-2 dans les cellules CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> infectées est plus faible que dans les cellules témoins, les cellules ne subissent pas d'apoptose anormale pour autant (Gougeon et al., 1997).

Quant aux travaux effectués sur les cellules de patients, une diminution d'expression de Bcl-2 a bien été observée mais dans les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> alors qu'aucune modulation d'expression n'est détectable pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Boudet et al., 1996). Il semble donc que la baisse d'expression de Bcl-2 ne soit pas suffisante pour induire l'apoptose des cellules concernées.

- effet de Tat sur l'expression de Bcl-2

Les différents effets de Tat seraient explicables soit par une surexpression de Bcl-2 dans le cas d'un effet protecteur de Tat (Zauli et al., 1995) soit par une modulation négative dans le cas d'un effet inducteur d'apoptose (Sastry et al., 1996).

- effet de la protéase virale sur Bcl-2

Un seul effet direct du virus sur la protéine Bcl-2 a été observée à ce jour, il s'agit du clivage proto-oncogène par la protéase du VIH (Strack et al., 1996). Cependant, ces résultats ont été obtenus *in vitro*, et ne montrent pas que le clivage de Bcl-2 par la protéase du VIH induit l'apoptose de la cellule infectée.

### **C. voies moléculaires d'activation de l'apoptose par VIH**

Le fait qu'il soit possible d'observer des cellules T CD4<sup>+</sup> provenant de patients, en apoptose sous-entend qu'il y ait eu induction du programme de mort cellulaire, transduction d'un signal et activation de molécules cellulaires effectrices. De plus, de nombreux virus sont maintenant connus pour interagir avec des molécules régulatrices de l'apoptose. On a donc tenté d'explorer les voies qui pourraient conduire à l'apoptose dans le cadre de l'infection par VIH.

#### **1. p56<sup>lck</sup>**

Les mécanismes proposés pour expliquer le fonctionnement de l'apoptose induite par la gp120 impliquent soit un signal négatif transduit par la molécule CD4, soit une interférence des signaux physiologiques que devraient transmettre la molécule CD4, lors d'une activation T (Laurent-Crawford et al., 1993; Corbeil, 1996).

Compte tenu de l'importance des interactions p56<sup>lck</sup>/CD4 au cours de l'activation T (cf p16), ces hypothèses ont conduit naturellement à l'étude de ces interactions dans le contexte de l'infection par VIH.

Les résultats obtenus, après ligation de CD4 par la gp120, montrent une activation de la p56<sup>lck</sup>, mais pas de phosphorylation de la chaîne  $\zeta$  du CD3 qui se produit lors d'une activation T physiologique (Hivroz et al., 1993; Tian et al., 1995). En réponse à ce signal

incomplet, l'internalisation de la p56<sup>lck</sup> consécutive à son activation, sous forme de complexe avec CD4 et la gp120, ou seule conduirait à l'anergie de la cellule (Kanner and Haffar, 1995; Goldman et al., 1997). La dissociation du complexe p56<sup>lck</sup>/ CD4 et la séquestration de la p56<sup>lck</sup> par le cytosquelette pourrait constituer un signal négatif pour la cellule, amorce du programme de mort.

Par ailleurs, après son activation la p56<sup>lck</sup> pourrait aussi s'associer à Raf-1, et par cet intermédiaire jouer un rôle dans l'activation transcriptionnelle du provirus (Popik and Pitha, 1996).

Cependant, des résultats récents et les résultats présentés dans le chapitre suivant démontrent que la p56<sup>lck</sup> n'est pas nécessaire à l'induction de l'apoptose par VIH, néanmoins, elle en accélère le processus (Jacotot et al., 1997; Guillem et al., 1998).

## **2. la voie Fas/ Fas-L**

De nombreuses preuves indirectes sont en faveur d'une induction de l'apoptose par la voie Fas/Fas-L, après la ligation de la molécule CD4 par l'enveloppe virale. Cela pourrait impliquer que l'apoptose induite par activation du TCR ou par Fas partagent une voie effectrice commune, ou encore que l'apoptose des cellules de patients induite par activation du TCR passe par une voie médiée par Fas.

Pourtant le lien qui existerait entre l'interaction CD4/gp120, la surexpression de Fas et de son ligand ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules en apoptose semble toujours à établir.

En effet, des équipes comme celles de Katsikis et al (Katsikis et al., 1996; Katsikis et al., 1997) n'établissent pas de corrélation entre l'expression plus importante de Fas à la surface de cellules provenant de patients infectés par le VIH et le taux d'apoptose par Fas. De plus Glynn et al, en bloquant les interactions Fas/Fas-ligand ont montré que:

- d'une part des cellules de lignée T infectées par VIH subissent l'apoptose
- d'autre part l'apoptose des cellules activées provenant de patients n'est pas liée à l'interaction entre Fas et son ligand (Glynn et al., 1996).

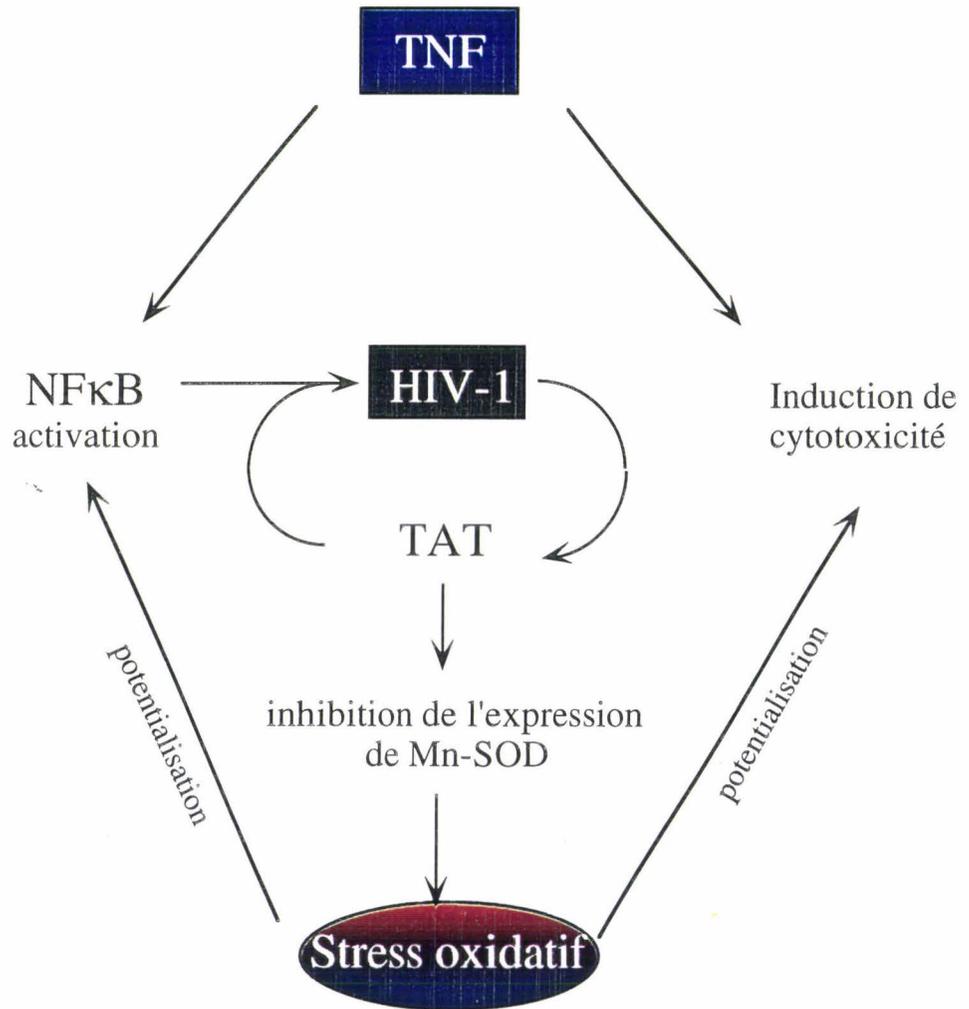
## **3. la famille ICE, des effecteurs probables**

Les caspases sont impliquées dans les mécanismes d'apoptose de bon nombre de types cellulaires, en réponse à différents stimuli (Enari et al., 1995; Los et al., 1995; Nicholson and Thornberry, 1997). L'activité de protéase des caspases entraîne le clivage de substrats cellulaires qui, à leur tour, conduisent aux caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose (Salvesen and Dixit, 1997; Hirata et al., 1998).

Les peptides inhibiteurs des caspases bloquent l'apoptose induite par la plupart des signaux apoptotiques mais pas tous (notamment pas la déprivation en cytokines).

## Le rôle du stress oxydatif dans la cytoxicité de Tat

Fig:21



d'après: Westendorp et al; 1995, EMBO.J 14: 546-554

Pour savoir si l'apoptose induite par VIH est dépendante des caspases, différents travaux ont été effectués avec ces peptides inhibiteurs sur des cellules infectées.

En préincubant avec des peptides inhibiteurs des caspases (z-VAD, YVAD et DEVD) des cellules de lignée T infectées, des cellules non infectées en coculture avec des cellules exprimant la gp120, ou des cellules de patients, différents auteurs montrent qu'il y a inhibition de l'apoptose induite par VIH. Les caspases sont donc impliquées dans l'apoptose induite par VIH (Sarin et al., 1994; Glynn et al., 1996; Ohnismus et al., 1997).

Si la plupart de ces groupes parvient à bloquer l'apoptose avec des peptides inhibiteurs des caspases, peu d'entre eux parviennent à le faire par des anticorps antagonistes de Fas (Estaquier et al., 1996). Il pourrait donc exister une voie effectrice, consécutive à l'activation de Fas, alternative de celle décrite p59. Les récepteurs TRAIL (pour TNF-related apoptosis-inducing ligand), récemment mis en évidence, pourraient participer à cette voie alternative (Katsikis et al., 1997; Schneider et al., 1997).

#### **4. le stress oxydatif**

Le stress oxydatif constitue l'un des signaux physiologiques majeurs de l'apoptose. Il n'existe que peu d'éléments en faveur de son implication dans la pathogénèse du VIH. Cependant, il semble que les propriétés apoptotiques de la molécule Tat puissent s'expliquer par un stress oxydatif dû à une potentialisation de l'activité du TNF $\alpha$ .

Des concentrations importantes de TNF $\alpha$  ont été observées dans des serums ou surnageants de cultures de PBMC ou de monocytes prélevés à partir de patients infectés par le VIH. Par ailleurs, le TNF $\alpha$  a été décrit pour amplifier la réplication du VIH-1 par induction de la translocation du facteur NF $\kappa$ B.

Il a été proposé que la protéine Tat pourrait potentialiser la translocation de NF $\kappa$ B induite par le TNF $\alpha$ , ainsi que la cytotoxicité médiée par le TNF $\alpha$ . Cet effet de Tat aurait pour conséquence l'altération de l'état rédox de la cellule (Westendorp et al., 1995).

Or des résultats récents montrent qu'en présence de Tat, l'expression de la manganèse superoxyde dismutase (Mn-SOD), qui fait partie du système de défense cellulaire contre le stress oxydatif, est nettement diminuée. L'état rédox de la cellule tend alors vers des conditions pro-oxydatives (*cf figure 21*) (Ehret et al., 1996; Katsikis et al., 1997).

L'idée d'une altération de l'état rédox serait peut-être à privilégier par rapport à l'hypothèse de l'expression du ligand de Fas dans l'induction de l'apoptose par Tat.

#### **D. L'inhibition de l'apoptose à des fins thérapeutiques et ses conséquences.**

Différentes stratégies ont été testées dans le but de bloquer l'apoptose induite par VIH:

d'une part la surexpression de gènes de survie  
d'autre part l'inhibition de protéines inductrices d'apoptose.

### **1. La surexpression de gènes de survie: Bcl-2 et E1B19K**

Le blocage de l'apoptose dans des cellules de lignées Jurkat infectées par la molécule de l'adénovirus E1B19K (Boyd et al., 1994) conduit à une production virale et un nombre de syncytia plus élevés que dans les cellules témoins, ainsi qu'à la mort cellulaire (Antoni, 1995). Les observations sont similaires lorsque des cellules A3.01, SupT1 ou Jurkat sont transfectées de façon stable avec Bcl-2. Les effets cytopathogènes du VIH, observables lors d'une infection aiguë, ont lieu et les cinétiques de production virale et de mort peuvent même être plus rapides que pour les cellules témoins. Ces effets pourraient être explicables par l'inhibition de l'apoptose dans les syncytia qui faciliterait la transmission du virus d'une cellule à une autre (Park et al., 1996; Sandstrom et al., 1996).

### **2. Inhibition de protéines inductrices d'apoptose: les caspases**

Le blocage des protéases effectrices de l'apoptose a également été tenté au moyen de peptides inhibiteurs tel que z-VAD-fmk qui inhibe l'activité des enzymes de la famille ICE. Cette fois encore, les auteurs ont observé une forte intensité de la réplication virale ainsi que la formation de syncytia, à la fois dans des cellules de lignée T en culture ou dans des PBMC provenant de patients (Chinnaiyan et al., 1997; Ohnimus et al., 1997).

### **Conclusion**

Le blocage de l'apoptose dans le cadre de l'infection par VIH pose plusieurs problèmes.

-d'une part, l'apoptose constitue un mécanisme de défense physiologique visant à éliminer les cellules infectées, dangereuses pour l'intégrité de l'organisme. Donc le blocage de l'apoptose des cellules infectées pourrait ne pas être opportun.

- D'autre part, dans le cas des cellules non infectées qui subissent l'apoptose, rien ne permet d'affirmer qu'en les empêchant de mourir elles retrouveront leur capacité de réponse et de prolifération.

- Enfin, il semble que les données expérimentales obtenues jusqu'à présent, montrent que le maintien de la survie cellulaire favorise la réplication virale.

Effectivement, à ce jour, toutes les tentatives de blocage de l'apoptose de cellules infectées ont abouti au même résultat:

- la survie cellulaire est prolongée par rapport à des cellules infectées dont le programme de mort n'est pas bloqué (cellules témoins)

- cette survie prolongée est accompagnée d'une production virale plus élevée que dans les cellules témoins

- enfin, la mort cellulaire se produit par un mécanisme qui se distingue de l'apoptose.

Ces résultats se sont vus confirmés quelques soient les gènes utilisés ou inhibés pour bloquer l'apoptose.

### **3. L'induction d'apoptose: Fas-L**

Dans un article récent, une autre stratégie a été suggérée. Elle consiste à faire exprimer le ligand de Fas (Sieg et al., 1997).

Les résultats, qui permettent d'en arriver à cette proposition, montrent qu'il existe un dysfonctionnement de ce ligand à la surface des macrophages. Le fait que le ligand ne puisse plus induire la mort pourrait être explicable par une mauvaise expression à la surface membranaire. En effet, les mêmes auteurs avaient démontré auparavant qu'un autre virus, Herpès simplex, bloque l'activité lytique du ligand de Fas en le séquestrant au niveau du cytoplasme de la cellule, ce qui permettrait au virus d'assurer sa réplication (Sieg et al., 1996).

Pour ces auteurs, la survie des macrophages infectés, due au dysfonctionnement du ligand de Fas, favorise la constitution de réservoirs viraux, et les effets cytopathogènes liés aux macrophages infectés. Ils proposent donc de reconstituer l'activité du ligand de Fas afin d'induire l'apoptose dans ces cellules.

Si la stratégie proposée paraît difficilement envisageable, ces résultats mettent en évidence les relations extrêmement complexes établies entre le virus et son hôte. Il faut rappeler que si dans le cadre précis de l'infection par le VIH, le caractère chronique des phénomènes d'apoptose et d'immunosuppression les rend pathogènes, ces phénomènes sont transitoires et physiologiques pour d'autres virus (Razvi and Welsh, 1993; Akbar et al., 1993). Finalement, la mauvaise adaptation apparente, réciproque, du virus à son hôte conduit à la perte du système immunitaire de l'hôte et rend particulièrement délicate une approche thérapeutique par blocage de l'apoptose.

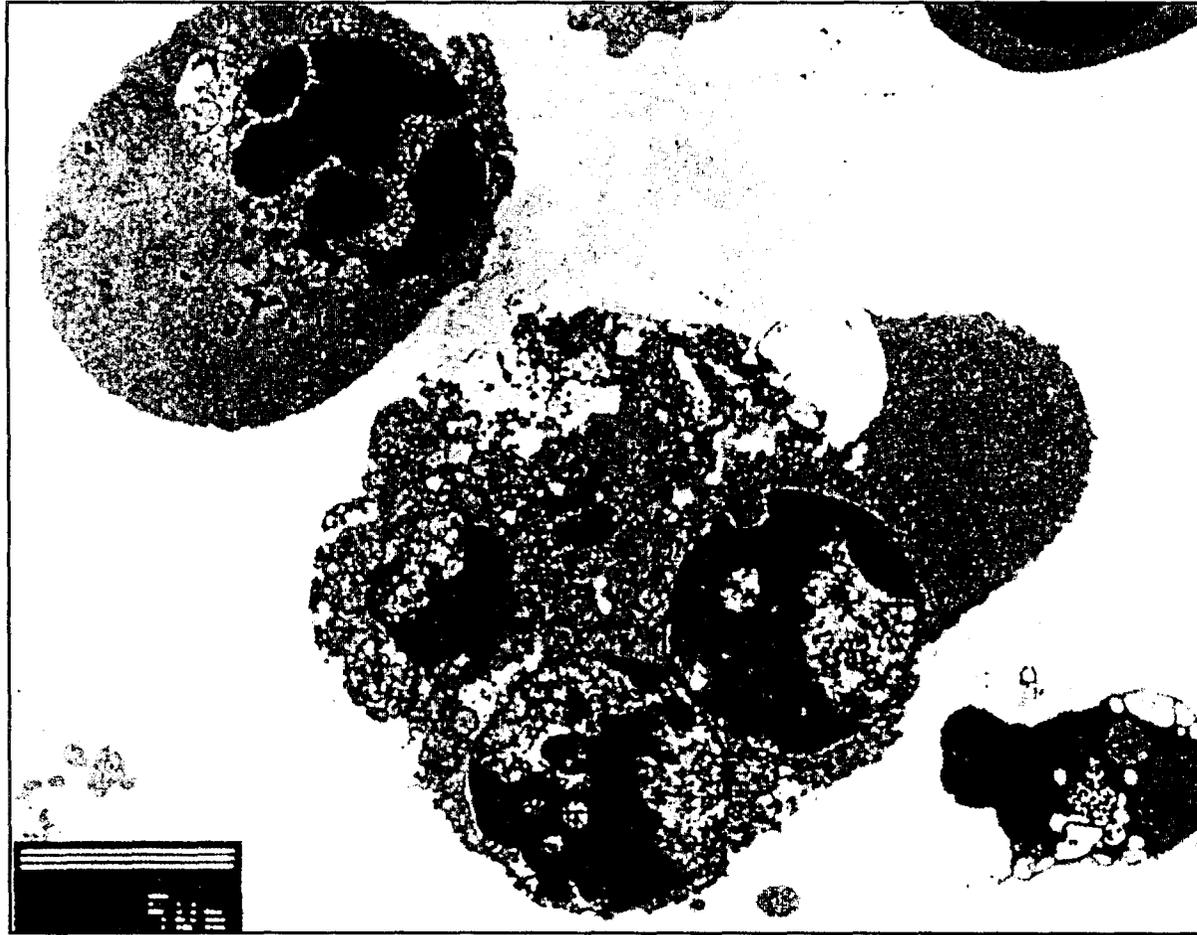
## **VII. Conclusion**

On connaît actuellement de nombreux exemples de virus capables de détourner le programme de mort cellulaire, on connaît aussi d'autres exemples de virus capables d'induire l'apoptose des cellules infectées et non infectées et quelques mécanismes ont été mis en évidence. Dans le cas précis de l'infection par VIH, les mécanismes qui conduisent à l'induction d'apoptose restent mal compris.

La molécule CD4, plus qu'un simple récepteur pour le virus, est une molécule clef de l'infection par VIH, puisqu'elle joue un rôle dans la plupart des étapes de la réplication virale. La fixation de l'enveloppe virale sur CD4 a souvent été désignée comme l'étape majeure de l'infection, d'une activation cellulaire peut-être nécessaire aux étapes suivant l'infection, et de l'apoptose. Pourtant le rôle de la molécule CD4 dans l'apoptose induite

par VIH demeure mal défini. Les travaux qui vont suivre portent sur cet aspect précis de l'infection par VIH.

DEUXIEME PARTIE:  
RESULTATS-DISCUSSION



Observation de cellules CEM en apoptose en microscopie electronique  
*d'après Laurent-Crawford et al.*

## VIII. Introduction de la partie expérimentale

Différents aspects du rôle de la molécule CD4 et de ses différents domaines dans le cycle de réplication du VIH-1 ont été abordés au laboratoire ainsi que par d'autres groupes. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au rôle joué par la molécule CD4 dans l'un des effets cytopathogènes du VIH: l'induction d'apoptose.

Dans un premier temps, nous nous sommes demandés si le domaine cytoplasmique de la molécule CD4 jouait un rôle dans la transduction du signal apoptotique. Pour cela, des cellules transfectées avec des constructions de CD4 tronquées au niveau du domaine cytoplasmique et de CD4 sauvage ont été infectées. L'expression du virus, ainsi que l'apoptose des cellules ont été étudiées sur une durée de 15 jours.

La suite de nos travaux a porté sur la capacité d'inhibition de l'apoptose d'un anticorps dirigé contre la partie CDR3 du domaine D1 de CD4 et connu pour bloquer la transcription virale.

L'exploration des mécanismes d'inhibition de l'apoptose induite par VIH par cet anticorps vise à mieux comprendre à la fois les modes d'action de cet anticorps et les processus d'induction de l'apoptose par VIH-1 dans des cellules CD4<sup>+</sup>.

Pour des raisons pratiques, les cellules utilisées au cours des travaux présentés, sont des cellules issues d'une lignée T CD4<sup>+</sup>: la lignée CEM.

Ces cellules T immatures possèdent à leur surface la molécule CD4 mais pas de TCR. Néanmoins, ces cellules sont décrites pour subir l'apoptose induite par VIH (Laurent-Crawford et al., 1993). Par ailleurs, la sensibilité de cellules dépourvues de TCR à cette apoptose a été rapportée comme étant comparable à celle de cellules exprimant à la fois le TCR et CD4 (Tian et al., 1995).

Comme les cellules d'autres lignées permissives au VIH, l'infection des cellules CEM *in vitro* par le VIH conduit à une infection aiguë et chronique. Dans les deux cas, le virus est produit et relargué par bourgeonnement de la membrane plasmique.

Dans un premier temps de l'infection, on observe un effet cytopathique typique qui se manifeste par un gonflement des cellules et la formation de syncytia, se termine par la mort cellulaire et qui correspond à l'infection aiguë.

Dans un deuxième temps, le taux de mortalité cellulaire diminue, la molécule CD4 n'est plus détectable à la surface des cellules et malgré cela, les cellules gardent leur capacité à produire des particules virales infectieuses. Cette deuxième phase correspond à l'infection chronique.

Les cellules utilisées pour l'étude du rôle du domaine cytoplasmique de CD4 ont été obtenues après transfection d'un clone (A2.01), dérivé de la lignée CEM et n'exprimant pas la molécule CD4, avec des vecteurs d'expression codant pour des formes mutées de CD4 ou CD4 sauvage.

## **IX. Le rôle du domaine cytoplasmique de la molécule CD4 dans l'apoptose induite par VIH-1**

### **A. introduction**

La molécule CD4 joue à la fois un rôle de molécule d'adhésion, en stabilisant le complexe CMH II/ Ag/TCR, et un rôle de molécule transductrice de signaux par l'intermédiaire de son domaine cytoplasmique. Ce domaine est associé à la protéine tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> qui s'autophosphoryle lorsque la molécule CD4 est reconnue par des anticorps anti-CD4 ou par la gp120 virale (Hivroz et al., 1993; Popik and Pitha, 1996; Tian et al., 1995). L'association CD4/p56<sup>lck</sup> est nécessaire au bon déroulement de l'activation T (Veillette et al., 1989). Ainsi des mutations dans la molécule CD4 qui empêchent l'interaction avec la p56<sup>lck</sup> inhibent la production d'IL-2 induite lors de la reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes T auxiliaires.

Depuis les premières observations d'un taux anormal de cellules en apoptose dans les lymphocytes provenant de patients atteints du SIDA, de nombreux travaux ont montré, *in vitro* ou dans des modèles animaux, que la fixation de la gp120 sur la molécule CD4 pouvait conduire à l'apoptose (Banda et al., 1992; Wang et al., 1994; Finco et al., 1997). Ces résultats, ainsi que la connaissance du rôle physiologique de CD4, ont naturellement conduit à s'interroger sur sa participation dans les mécanismes d'induction de l'apoptose, notamment en tant que molécule transductrice de signaux. Après fixation de la gp120, la molécule CD4 pourrait notamment transduire un signal négatif, ou des signaux qui interféreraient avec les signaux d'activation physiologiques (Laurent-Crawford et al., 1993).

Il est généralement admis que le domaine cytoplasmique de CD4 n'est nécessaire ni à la fixation du virus, ni à son internalisation, ni à la formation de virions et de syncytia. Par contre, ce domaine intervient dans la cinétique du cycle viral. En effet, l'infection de cellules exprimant une molécule tronquée, au niveau cytoplasmique à partir des résidus 401 et 403 (A2.01/CD4 401 et A2.01/CD4 403), est suivie d'une production virale retardée par rapport à la cinétique de production virale observée pour des cellules exprimant une molécule CD4 sauvage (A2.01/CD4) (Poulin et al., 1991).

D'autre part, la translocation du facteur de transcription NFκB, observable par la technique du gel retard, après fixation du virus inactivé sur la molécule CD4 sauvage, n'est pas observée après exposition des cellules A2.01/CD4 401 et A2.01/CD4 403 au VIH inactivé (Benkirane et al., 1994).

Au vu de ces résultats, il a été proposé que le domaine cytoplasmique de CD4 pouvait avoir un rôle dans la cinétique du cycle viral en permettant la translocation de NFκB, qui à son tour, pourrait activer la transcription virale en se fixant sur le LTR (Benkirane et al., 1994).

Dans cet article, nous avons comparé la cinétique d'infection et d'induction d'apoptose par le VIH dans des cellules A2.01/CD4 401 et A2.01/CD4 403 ainsi que A2.01/CD4 données par D. R. Littman.

Après 15 jours de culture, après infection, les cellules en apoptose ont été détectées par le YOPRO-1, un intercalant nucléaire qui pénètre spécifiquement dans les cellules en apoptose (Idziorek et al., 1995). Les résultats obtenus ont été confirmés par deux autres techniques de détection de l'apoptose: la technique du TUNEL et le marquage à l'iodure de propidium qui reste la technique la moins sensible et la moins spécifique des trois. En parallèle la production virale a été suivie à la fois par dosage de l'activité de la transcriptase inverse virale, et par détection de la présence de protéines virales dans les cellules.

**B.**

Delayed Human Immunodeficiency Virus Type 1-induced apoptosis  
in cells expressing truncated forms of CD4

Claire Guillem, Nolwenn Coudronnière, Véronique Robert-Hebmann, and  
Christian Devaux

Journal of Virology, Mars 1998, p 1754-1761

# Delayed Human Immunodeficiency Virus Type 1-Induced Apoptosis in Cells Expressing Truncated Forms of CD4

CLAIRE GUILLERM, NOLWENN COUDRONNIÈRE, VÉRONIQUE ROBERT-HEBMANN,  
AND CHRISTIAN DEVAUX\*

*Laboratoire d'Immunologie des Infections Rétrovirales, CRBM-CNRS ERS 155, Institut de Biologie,  
34060 Montpellier Cedex, France*

Received 15 August 1997/Accepted 10 December 1997

It has been reported previously that cells expressing a truncated form of CD4 which lacks the cytoplasmic tail of the molecule (truncation at position 402) were not sensitive to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-induced apoptosis in an acute-phase model of infection (J. Corbeil, M. Tremblay, and D. D. Richman, *J. Exp. Med.* 183:39-48, 1996). The role played by the cytoplasmic domain of CD4 in HIV-1-induced apoptosis was reexamined here with clones of A2.01 cells expressing different forms of CD4 and the DNA intercalant YOPRO-1 assay. Six days after virus exposure, we found evidence of apoptosis in A2.01 cells expressing the wild-type CD4 (A2.01/CD4), whereas enhanced apoptosis remained absent in cultures of A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells (A2.01 cells which express CD4.401 and CD4.403 molecules with truncations at positions 401 and 403, respectively). However, cell death by apoptosis measured with YOPRO-1 was found in cultures of A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells 15 days after virus exposure. This result was confirmed with a terminal dUTP nick end-labeling assay and propidium iodide staining. The long lag time postinfection required for apoptosis to be observed in cultures of infected cells expressing truncated forms of CD4 was due to the delayed viral replication in these cells, as shown by monitoring of the viral reverse transcriptase activity and HIV-1 p24<sup>gag</sup> antigen expression. These results emphasize the relationship between virus replication and cell death by apoptosis.

Gradual depletion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes is one of the major consequences of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection (29). Among the mechanisms contributing to CD4 cell depletion (2, 17, 21, 31), the cytopathic effects resulting from the infection of CD4<sup>+</sup> T cells by HIV-1 are considered to play an important role. Cytopathic effects may be ascribed to gp120-induced syncytium formation and HIV-1-induced single-cell killing by apoptosis. It has been proposed that HIV-1-induced apoptosis requires an initial round of virus gene expression followed by engagement of expressed gp120 with CD4 to complete the process (13, 22, 23).

Although the CD4 molecule is involved in virus binding and postbinding events leading to membrane fusion, its role during the latter stages of the HIV-1 replication cycle is not fully understood (11). It is generally admitted that the cytoplasmic tail of CD4 is not necessary for HIV-1 binding and subsequent internalization of virions but plays a role in controlling different steps of the virus replication cycle (4, 32). However, experiments aimed at investigating this role have given rise to divergent conclusions: cells expressing a CD4 molecule lacking the cytoplasmic tail can form syncytia, whereas cells expressing a CD4-CD8 hybrid remained insensitive to HIV-1-induced syncytium formation (28); however, if cultured for a longer time, A2.01/CD4-CD8 cells would form syncytia (15). We have also observed syncytium formation in infected cultures of A2.01/CD4-CD8, A2.01/CD4.401, and A2.01/CD4.403 cells associated with high virus production (16a).

Recently, cells expressing a truncated form of CD4 lacking

the cytoplasmic tail (truncation at position 402) were used to assess the involvement of the cytoplasmic tail in HIV-1-induced apoptosis. A2.01/CD4.402 cells were reported not to be susceptible to HIV-1-induced apoptosis 3 days after exposure to a high virus concentration (14). Since we have demonstrated previously a significant delay in HIV-1 replication in cells expressing a truncated cytoplasmic domain of CD4 that resulted from the inability of the receptor to stimulate the nuclear expression of NF- $\kappa$ B (4), we reinvestigated HIV-1-induced apoptosis in A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells, taking into account the delayed replication parameter.

In this study, we found that cells expressing truncated forms of CD4 lacking the cytoplasmic tail are sensitive to HIV-1-induced apoptosis, but only after a long lag time. Early stages (binding, infection, and retrotranscription) of the HIV-1 replicative cycle occur at the same rate in those cells compared to cells expressing the wild-type CD4, but despite this, virus gene expression and virus particle production are delayed (4). Altogether, our results suggest that the long lag time that passed between virus exposure and cell death by apoptosis is due to a delayed virus gene expression and emphasize the relationship that exists between viral load, virus replication, and cell death by apoptosis.

## MATERIALS AND METHODS

**MAb and reagents.** Purified anti-CD4 IOT4A/13B8.2 monoclonal antibody (MAb) was kindly provided by M. Hirn (Immunotech S.A., Marseille, France). Anti-Fas (CH-11) immunoglobulin M (IgM) MAb, anti-Fas (ZB4) IgG MAb, fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-Fas (UB2) MAb, and FITC-labeled F(ab')<sub>2</sub> goat anti-mouse Ig reagent were purchased from Immunotech. An FITC-labeled anti-p24<sup>gag</sup> MAb (KC57-FITC) was purchased from Coulter Corp. (Margency, France). An anti-p56<sup>lck</sup> MAb (3A5) was purchased from TEBU (Le Perray en Yvelines, France). The T4-4 rabbit anti-human CD4 antiserum (33) was provided by M. Benkirane (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Md.). DNA intercalant dye YOPRO-1 was purchased from

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire d'Immunologie des Infections Rétrovirales, CRBM-CNRS ERS 155, Institut de Biologie, 4 Boulevard Henri IV, 34060 Montpellier Cedex 1, France. Phone: (33)-4-67-60-86-60. Fax: (33)-4-67-60-44-20. E-mail: devaux@sc.univ-montpl.fr.

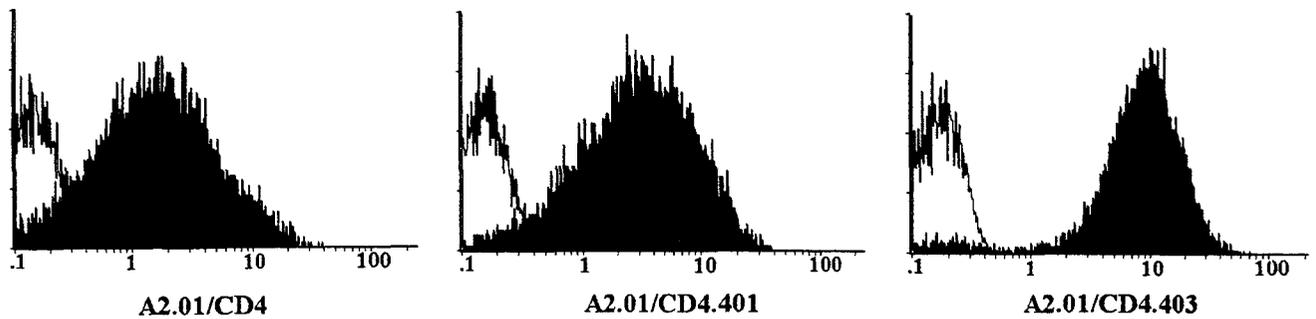


FIG. 1. Expression of the different forms of CD4 at the surface of transfected A2.01 cells. A2.01/CD4, A2.01/CD4.401, and A2.01/CD4.403 cells were incubated with saturating concentrations of anti-CD4 (13B8-2) MAb (black areas) or medium alone (white areas) and fluoresceinated goat anti-mouse Ig. The fluorescence intensity was measured on an EPICS XL4C cytofluorometer.

Molecular Probes (Eugene, Oreg.). Geneticin G-418, used at 1 mg/ml, was purchased from Gibco-Life Technologies (Eragry, France).

**Cells and viruses.** The CD4<sup>+</sup> lymphoblastoid CEM T-cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Bethesda, Md.). The A2.01 (a CD4<sup>+</sup> lymphoblastoid T-cell line derived from the CD4<sup>+</sup> T-cell line A3.01), A2.01/CD4 (A2.01 expressing the wild-type CD4), A2.01/CD4.401 (A2.01 expressing a mutant form of CD4 truncated at position 401), and A2.01/CD4.403 (A2.01 expressing a mutant form of CD4 truncated at position 403) cell clones have been previously described (3, 4) and were provided by D. R. Littman (New York Medical College, New York, N.Y.). Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with a 1% penicillin-streptomycin antibiotic mixture, 1% GlutaMAX, and 10% fetal calf serum (Gibco-Life Technologies) to a density of  $5 \times 10^5$  cells/ml in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The culture medium of transfected cells was supplemented with 1 mg of G-418 per ml. Viral stocks of HIV-1<sub>Lai</sub> were prepared from chronically infected CEM cell supernatants, as previously described (12), and kept frozen at -80°C until used.

**Assays for HIV-1 infection.** Cells ( $5 \times 10^5$ ) were incubated for 30 min at 4°C in flat-bottom, 96-microwell plates (TPP, Beynecix, Marseille, France) with 100  $\mu$ l of HIV-1 at a concentration of  $1,000 \times 50\%$  tissue culture infective dose (TCID<sub>50</sub>) per ml. Thereafter, cells were washed five times and cultured in 24-microwell plates (TPP). The amount of HIV-1 produced by CEM cells was monitored twice a week by measuring reverse transcriptase (RT) activity in 1 ml of cell-free culture supernatant with a synthetic template primer, as previously described (12).

**Flow cytometry.** Cells ( $10^6$ ) were incubated for 60 min at 4°C with saturating concentrations of anti-CD4 MAb or medium alone as control. After three washes with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.2% bovine serum albumin, bound MAb was detected by addition of 50  $\mu$ l of a 1/50 dilution of fluoresceinated goat anti-mouse Ig (Immunotech). After 60 min of staining, cells were washed with PBS-bovine serum albumin, and fluorescence intensity was measured on an EPICS XL4C cytofluorometer (Coulter, Coultronics, Margency, France). For the measurement of HIV-1 p24<sup>gag</sup> expression, the cells were fixed and permeabilized with methanol. HIV-1 p24<sup>gag</sup> antigen expression was monitored by direct immunofluorescence with MAb KC57-FITC (Coulter).

**Detection of apoptosis.** Different assays were used for the detection of HIV-1-induced apoptosis. First, the percentage of apoptotic cells was assessed by flow cytometry analysis with the impermeant DNA intercalant YOPRO-1 (10 mM) (excitation maximum/emission maximum 491/509 nm) as described previously (18). Second, the level of apoptotic cells in cultures was determined with an ApopDETEK kit (Enzo Diagnostics, Farmingdale, N.Y.) for the terminal dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay, which allows detection of double-stranded DNA (dsDNA) breaks by flow cytometry. Briefly, cells ( $2 \times 10^6$  cells/sample) were fixed in 1% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) containing 0.3% saponin for 15 min on ice. After being washed in PBS, cells were incubated at 37°C for 60 min with terminal deoxynucleotidyl transferase and biotin-16-dUTP. After being washed, cells were resuspended in 500  $\mu$ l of PBS containing streptavidin-FITC. After 30 min of incubation at 37°C, cells were washed and fluorescence intensity was measured. Third, to relate apoptosis to the cell cycle, cells ( $3 \times 10^5$  cells/sample) were washed in PBS and resuspended for 2 h at 20°C in a solution containing 0.1% Triton X-100, 0.1% sodium citrate, and 50  $\mu$ g of propidium iodide per ml. Cell cycle analysis based on DNA content per cell was performed with the MultiCycle AV version 3.0 program of the EPICS XL4C cytofluorometer. Apoptotic nuclei appeared as a broad hypodiploid DNA peak easily discriminable from the normal (diploid) DNA peak.

**Western blot assay.** Cells ( $5 \times 10^6$ ) were washed twice in PBS. The cell pellets were resuspended in 100  $\mu$ l of radioimmunoprecipitation assay buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8], 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM benzamide, 2  $\mu$ g of leupeptin per ml, 1 mM (phenylmethylsulfonyl fluoride) and lysed for 20 min at 4°C. After a 15-min centrifugation (10,000 rpm; Biofuge 13; Heraeus Instruments) at 4°C in a microcentrifuge, supernatants were harvested, and the protein concentration was measured. Cellular lysates were

electrophoresed onto sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10% polyacrylamide) (SDS-PAGE) and blotted to polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore). The blots were then incubated for 1 h at room temperature with a blocking solution (PBS containing 10% milk and 0.05% Tween 20) prior to addition of anti-p56<sup>lck</sup> MAb. After 1 h at 20°C, blots were washed three times with PBS-0.05% Tween 20 and incubated for 30 min with a 1:3,000 dilution of sheep anti-mouse Ig-peroxidase conjugate (Immunotech). After three washes, bound MAb was detected by incubation of the membrane for 1 min with enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (Amersham). The membrane was then exposed for 0.5 to 5 min to hyperfilms-ECL (Amersham).

**Coimmunoprecipitation of CD4 and p56<sup>lck</sup>.** Cell lysates (see above for details) were submitted to a round of preclearing with 30  $\mu$ l of Sepharose-protein A (Pharmacia CL-4B) for 60 min at 4°C. The samples were microcentrifuged (10,000 rpm) for 1 min at 4°C, and supernatants (1 ml each) were incubated for 16 h at 4°C with 2  $\mu$ g of anti-CD4 antibody (13B8-2 and BL4) and 30  $\mu$ l of Sepharose-protein A. After three washes in radioimmunoprecipitation assay buffer, precipitates were electrophoresed in a 6.5% polyacrylamide gel and blotted to PVDF membrane. CD4 and p56<sup>lck</sup> antigens were detected by addition of T4-4 antiserum and mAb 3A5, respectively.

## RESULTS

**Absence of enhanced apoptosis in cells expressing truncated forms of CD4 6 days after infection by HIV-1.** The role played by the cytoplasmic domain of CD4 in HIV-1-induced apoptosis was investigated with different clones of A2.01 cells, a CD4<sup>+</sup> derivative of the human T-cell leukemic line A3.01, expressing different CD4 constructs (3). After transfection, the clones of A2.01 cells expressing either the wild-type CD4 molecule (A2.01/CD4) or truncated forms of the CD4 receptor lacking the cytoplasmic domain of the molecule (A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403) were selected and shown to be fully infectable by HIV-1 (3, 4, 28). Delayed virus production was previously reported for cells expressing the truncated forms of CD4 (3, 4, 28). In contrast to wild-type CD4, the truncated forms of CD4 are predicted to be unable to deliver signals through association with p56<sup>lck</sup> or other cytoplasmic signaling proteins because of an inability of the receptor to stimulate nuclear translocation of transcription factors after HIV-1 binding to its receptor (4). Cell surface expression of the different CD4 molecules, the presence of cytoplasmic p56<sup>lck</sup>, and the ability of p56<sup>lck</sup> to associate with CD4 were assessed. As shown in Fig. 1, cell surface expression of CD4, CD4.401, and CD4.403 was high in all of the clones (although it was slightly lower for the wild-type CD4). The clones were also found to express similar amounts of p56<sup>lck</sup> protein (Fig. 2A). p56<sup>lck</sup> was coimmunoprecipitated with CD4 in A2.01/CD4 cell lysates but was absent from immunoprecipitates utilizing A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cell lysates (Fig. 2B).

We verified the ability of a known inducer of apoptosis (anti-Fas IgM) to activate the signal transduction machinery controlling cell death in A2.01 cells expressing different forms of CD4. The cells were treated with the CH-11 anti-Fas IgM

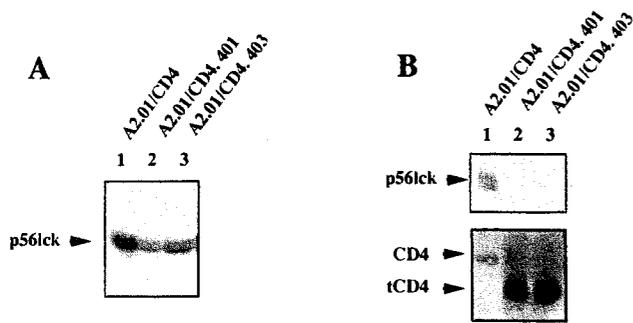


FIG. 2. Expression of p56<sup>lck</sup> in transfected A2.01 cells expressing different forms of CD4. (A) Western blot assay of p56<sup>lck</sup> expressed in A2.01/CD4, A2.01/CD4.401, and A2.01/CD4.403 cells. Cell lysates (50  $\mu$ g) were electrophoresed onto an SDS-PAGE (10% polyacrylamide) gel and blotted to a PVDF membrane. The blots were incubated with an anti-p56<sup>lck</sup> antibody, and bound MAbs were reacted with sheep anti-mouse Ig-peroxidase conjugate-ECL reagent. (B) Coimmunoprecipitation of CD4 and p56<sup>lck</sup>. Cell lysates were incubated with a mixture containing 2  $\mu$ g of anti-CD4 antibody (13B8-2 and BL4) and 30  $\mu$ l of Sepharose-protein A. After being washed, precipitates were electrophoresed in a 6.5% polyacrylamide gel and blotted to the PVDF membrane. CD4 (lower panel) and p56<sup>lck</sup> (upper panel) antigens were detected by addition of T4-4 antiserum and MAb 3A5, respectively. tCD4, truncated forms of CD4.

MAB or medium alone for 16 h before being stained with DNA intercalant YOPRO-1 in order to estimate the extent of apoptosis. As shown in Fig. 3, apoptosis was found in cultures of all clones treated with the CH-11 MAB, including A2.01/CD4 (52.5% cell death), A2.01/CD4.401 (43.1% cell death), and A2.01/CD4.403 (45.2% cell death) compared with that in cells treated with an isotype-matched control IgM, indicating that the signal transduction machinery that controls cell death by apoptosis can be recruited by the Fas signal in cells expressing truncated forms of CD4.

To determine the susceptibility of A2.01/CD4, A2.01/CD4.401, and A2.01/CD4.403 cells to HIV-1-induced apoptosis, cells were exposed to 100  $\mu$ l of HIV-1<sub>Lai</sub> (at 1,000  $\times$  TCID<sub>50</sub>/ml) and apoptosis was analyzed by cytofluorometry 6 days after virus exposure with YOPRO-1. As shown in Fig. 4,

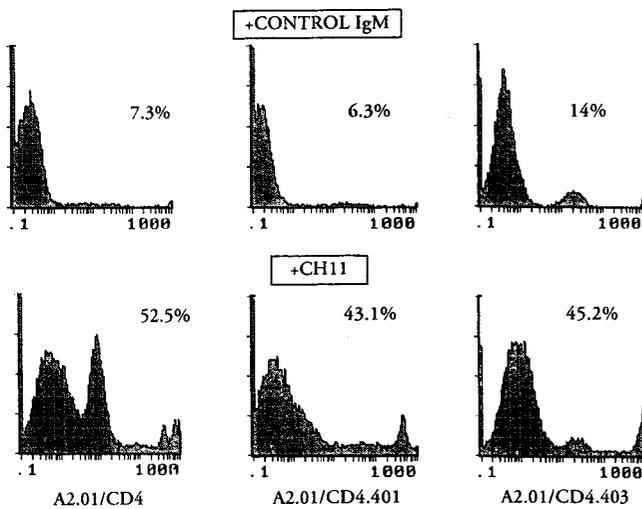


FIG. 3. Anti-Fas IgM-induced apoptosis of CD4-transfected clones. Cells were cultured in medium supplemented with 1  $\mu$ g of anti-Fas IgM MAB (CH-11) or an isotype-matched (IgM) MAB per ml. The percentage of apoptotic cells in cell cultures was assessed by flow cytometry analysis with YOPRO-1 at 16 h of culture. We provisionally included the peak number of dead cells in the calculation of the percentage of cells undergoing apoptosis.

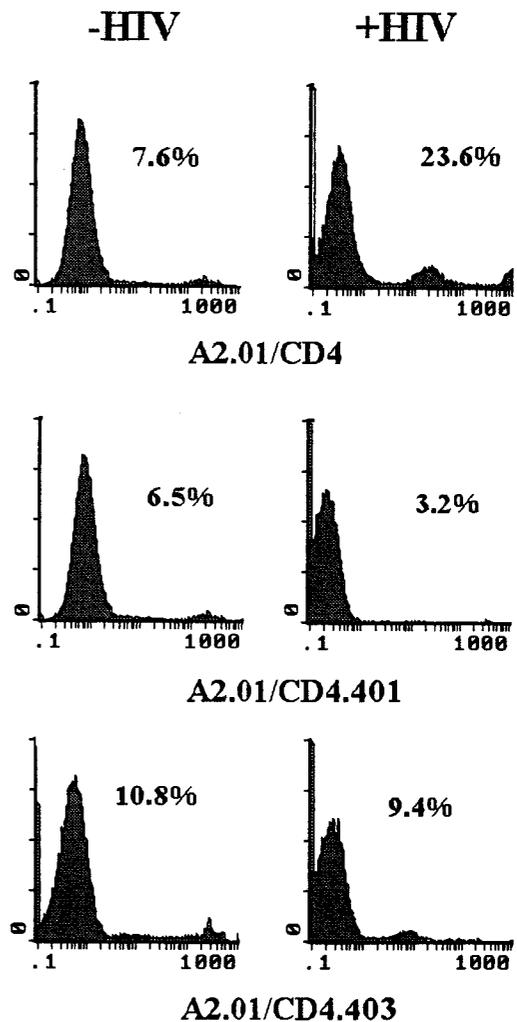


FIG. 4. Measurement of apoptotic cell death in A2.01-transfected clones 3 days after virus exposure. A2.01/CD4, A2.01/CD4.401, and A2.01/CD4.403 cells were exposed to 100  $\mu$ l of virus suspension containing 1,000  $\times$  TCID<sub>50</sub> of HIV-1<sub>Lai</sub> per ml, washed, and cultured for 3 days in medium alone. The percentage of apoptotic cells in cell cultures was assessed by flow cytometry analysis with the impermeant DNA intercalant YOPRO-1.

a background amount of apoptosis (ranging from 5 to 10%) occurred in uninfected control cultures (Fig. 4, left panel). Enhanced apoptosis was detected in A2.01/CD4 cells exposed to infectious particles (23.6% cell death compared to 7.6% cell death in the control culture). In contrast, HIV-1 exposure did not stimulate apoptosis in A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells at this time point. The CD4 phenotype of the cells and their ability to express the HIV-1 gene were investigated. Although the presence of HIV-1 DNA can be detected in truncated CD4 cells 24 h after HIV-1 exposure under these experimental conditions (data not shown and reference 4), cell surface expression of CD4 was strongly modulated in A2.01/CD4 cells but not in A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells (Fig. 5A). As expected, the extent of CD4 modulation was directly related to HIV-1 gene expression, as evaluated by p24<sup>gag</sup> antigen detection (Fig. 5B).

Our results indicate that HIV-1-induced apoptosis was not found in A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells 6 days after virus exposure, although all clones turned out to be readily

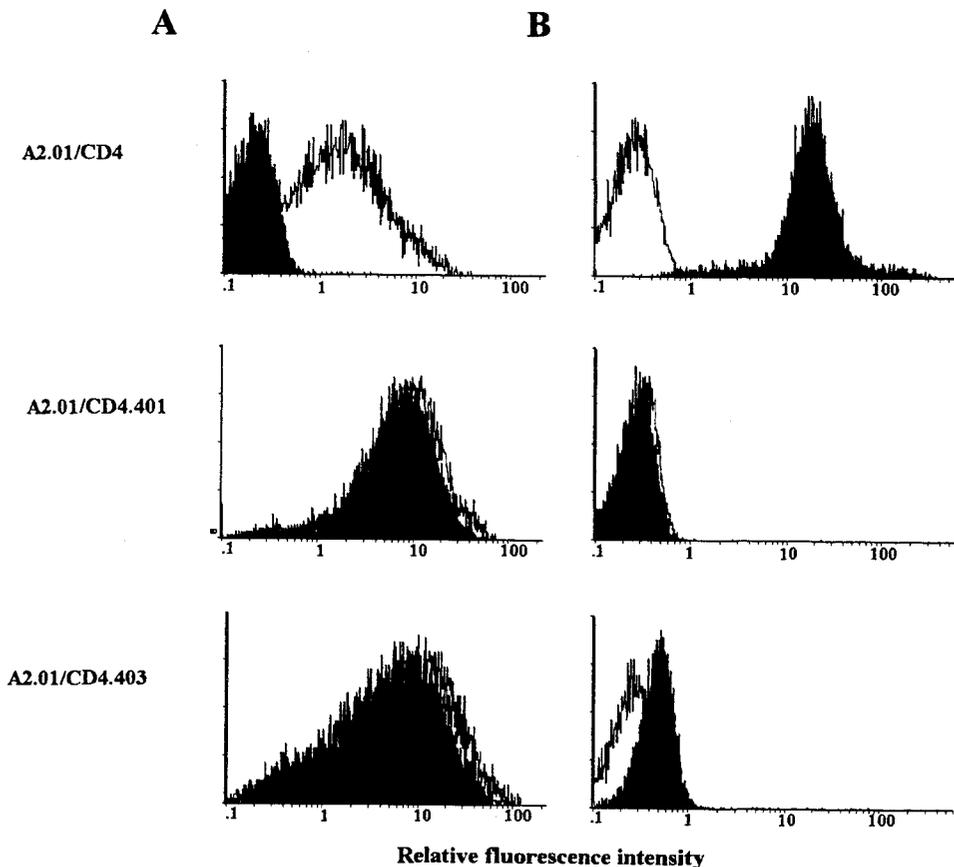


FIG. 5. Effect of infection on CD4 antigen modulation and p24<sup>gag</sup> antigen expression in A2.01 transfectant cells. A2.01/CD4, A2.01/CD4.401, and A2.01/CD4.403 cells exposed to HIV-1<sub>Lai</sub> were cultured for 3 days in medium alone. (A) The percentage of cells showing detectable expression of surface CD4 (black areas) was measured by indirect immunofluorescence with the anti-CD4 MAb 13B8.2 and an FITC-conjugated goat antimouse antibody probe. (B) HIV-1 p24<sup>gag</sup> antigen expression (black areas) was monitored on methanol-permeabilized cells by direct immunofluorescence with the MAb KC57-FITC. Levels of expression of CD4 and HIV-1 p24<sup>gag</sup> antigen in uninfected cells (white areas) are shown as a control.

infected (also see the results presented below). These observations corroborate previously published results by Corbeil and coworkers (14).

**Delayed HIV-1-induced apoptosis in culture of cells expressing truncated forms of CD4.** Previous studies have indicated that virion production was delayed in cells expressing truncated forms of CD4 which lack the cytoplasmic domain, although the kinetics of HIV-1 binding, fusion, and retrotranscription are similar in A2.01/CD4, A2.01/CD4.401, and A2.01/CD4.403 cells (3, 4, 28). By running time course experiments aimed at investigating the kinetics of HIV-1-multispliced mRNA expression in those cells, we previously reported that HIV-1 gene expression was observed on day 3 after exposure to 100  $\mu$ l of HIV-1<sub>Lai</sub> at 1,000  $\times$  TCID<sub>50</sub>/ml in A2.01/CD4 cells, whereas it was detected after day 10 in A2.01/CD4.401 cells (4). Figure 6A illustrates virus production in infected-cell cultures as measured by RT activity assay. In cells exposed to HIV-1<sub>Lai</sub> at 1,000  $\times$  TCID<sub>50</sub>/ml, virus production was detected 4 days after virus exposure and reached a plateau within 7 days of infection in A2.01/CD4 cells, whereas it was detected in A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells only after 10 days of culture. Cell death associated with virus replication was also delayed in A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells compared to that in A2.01/CD4 cells (Fig. 6B). Similar results were obtained when cells were exposed to 100  $\mu$ l of HIV-1<sub>Lai</sub> at 10,000  $\times$  TCID<sub>50</sub>/ml (Fig. 6C and D). To confirm the HIV-1

induction of apoptosis in A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells, a time course experiment was performed in which apoptosis was monitored with the YOPRO-1 assay. Figure 7 illustrates a representative experiment run 15 days postinfection; under such experimental conditions, we found that HIV-1 triggers apoptosis in the two clones that expressed truncated forms of CD4. The percentages of cell death by apoptosis were 41.9 and 47.2% for infected A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells, respectively, whereas the background amounts of apoptosis in uninfected control cultures were 8.5 and 7.3% respectively. Enhanced apoptosis was also present in A2.01/CD4 cells (47.6% cell death compared to 8.2% cell death in the control culture). CD4 cell surface analysis indicated that all infected clones had downregulated surface expression of CD4 on day 15 postinfection (Fig. 8A). Moreover, levels of p24<sup>gag</sup> antigen synthesis were found to be equal in all clones on day 15 postinfection (Fig. 8B).

To make an unambiguous demonstration that HIV-1-induced apoptosis occurs in cells expressing mutated CD4 molecules lacking a cytoplasmic tail, we studied apoptosis by using two additional techniques. First, the early stages of the chromatin breakdown process were studied with TUNEL assay, which allows detection of dsDNA breaks by incorporation of biotin-labeled deoxynucleotides on the 3'-OH termini. Under these experimental conditions, we found chromatin damage in 39.8 and 42.3% of infected A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403

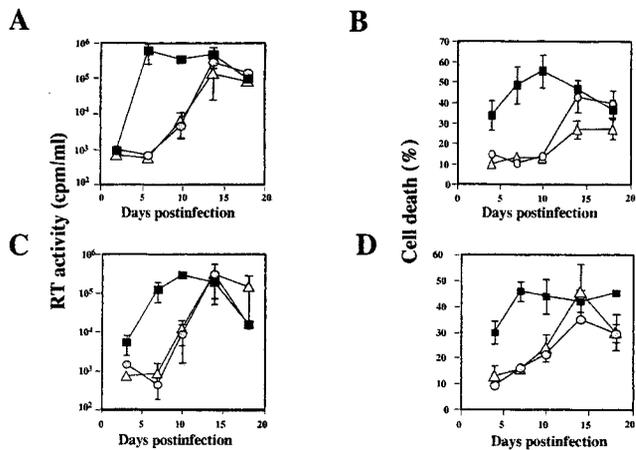


FIG. 6. Kinetics of virus production and cell death. A2.01/CD4 (■), A2.01/CD4.401 (○), and A2.01/CD4.403 (△) cells were exposed to 100  $\mu$ l of virus suspension containing either 1,000  $\times$  TCID<sub>50</sub> of HIV-1<sub>Lai</sub> per ml (A and B) or 10,000  $\times$  TCID<sub>50</sub> of HIV-1<sub>Lai</sub> per ml (C and D) washed and cultured in medium alone. Virus production was monitored by measuring RT activity (A and C). The percentage of cell death in cell cultures was assessed by trypan blue exclusion (B and D). Values represent means  $\pm$  standard deviations ( $n = 3$ ).

cells, respectively, whereas the background levels of apoptosis in uninfected control cultures were 13.5 and 7.6%, respectively (Fig. 9A). These results agree with the percentage of apoptosis measured with YOPRO-1. Second, HIV-1 induction of apoptotic nuclei was studied by counting sub-G<sub>1</sub>-phase cells stained by propidium iodide. The numbers of A2.01/CD4, A2.01/CD4.401, and A2.01/CD4.403 cells infected by HIV-1 showing a broad hypodiploid DNA peak were 26.6, 19.5, and 18.9%, respectively, whereas the background levels were 8.4, 1.5, and 4.1%, respectively (Fig. 9B). It is worth noting that an important proportion of apoptotic cells may not be considered by this method, based on DNA content per cell, and this probably explains why the percentages of apoptosis measured by propidium iodide staining were lower than those measured by the YOPRO-1 and TUNEL assays.

Altogether, our results indicate that A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells are sensitive to HIV-1-induced apoptosis, the sensitivity being directly related to HIV-1 gene expression.

## DISCUSSION

CD4<sup>+</sup> T cells undergo apoptosis when infected by HIV-1. The aim of the present study was to investigate the role played by the CD4 cytoplasmic tail in HIV-1-induced apoptosis. In agreement with results previously reported by Corbeil and coworkers (14), we found that cells expressing truncated forms of CD4 which lack the cytoplasmic domain did not undergo cell death early after virus exposure. However, when cultures were kept for over 2 weeks, we found HIV-1-induced apoptosis. The long lag time that passed between virus exposure and the first evidence for HIV-1-induced apoptosis in cultures of A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells was directly linked to delayed HIV-1 gene expression in these cells. Finally, the observation that the cytoplasmic tail of CD4 is not required to mediate HIV-1-induced apoptosis suggests that the interaction between CD4 and p56<sup>lck</sup> is not essential for HIV-1-induced apoptosis.

The role played by the cytoplasmic tail of CD4 in virus binding, virus internalization, retrotranscription of the virus genome, expression of virus genes, and virus envelope-depen-

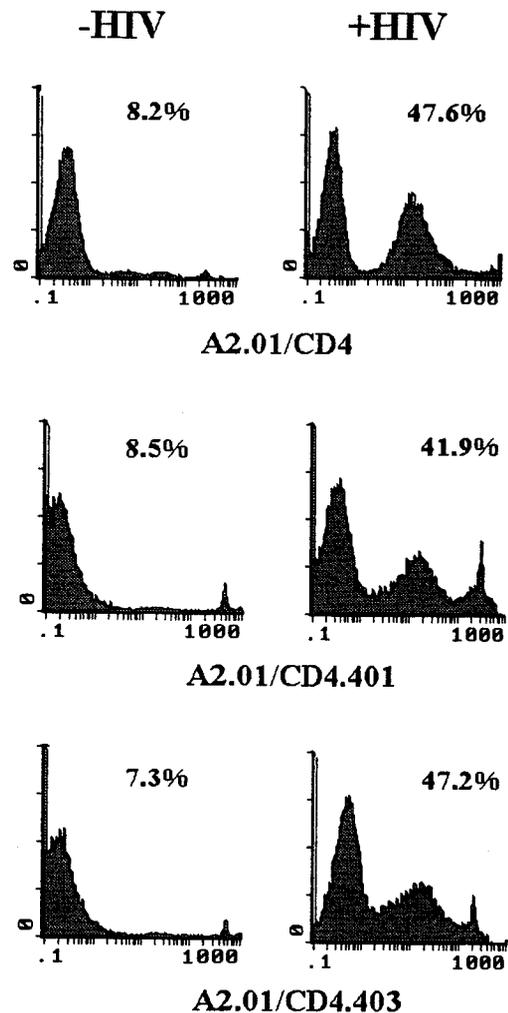


FIG. 7. Measurement of apoptotic cell death in A2.01-transfected clones 15 days after virus exposure by YOPRO-1 staining. A2.01/CD4, A2.01/CD4.401, and A2.01/CD4.403 cells were exposed to HIV-1<sub>Lai</sub>, and the percentage of apoptotic cells in cell cultures was assessed by flow cytometry analysis by YOPRO-1 labeling 15 days postinfection.

dent syncytium formation has been studied in depth. The cytoplasmic tail of CD4 is necessary neither for binding and subsequent internalization of HIV-1 virions (3, 4, 28, 32) nor for syncytium formation induced by the HIV-1 envelope (15, 16a). Although the cytoplasmic tail of CD4 is considered to be required for signal transduction via CD4 after HIV-1 binding (4, 5, 32), the results obtained by different laboratories have led to divergent conclusions which can probably be ascribed either to variations in technical approaches or to variations among the transfected cell clones used. It is worth noting that several reports describe activation by HIV-1 of cells expressing a wild-type CD4 (4, 6, 9, 10, 20, 27). Indeed, our previous studies have indicated that the cytoplasmic tail of CD4 is required for activation of signal transduction pathways, resulting in the nuclear translocation of transcription factors such as NF- $\kappa$ B, after HIV-1 binding to CD4<sup>+</sup> cells (4). Similar conclusions can be drawn from the results by Merzouki and coworkers (25), indicating that HIV-1 envelope glycoproteins expressed at the surface of stimulating cells induced activation of the HIV-1 promoter in CD4-positive p56<sup>lck</sup>-positive cells, whereas induction was not observed in CD4-positive p56<sup>lck</sup>-negative cells. These

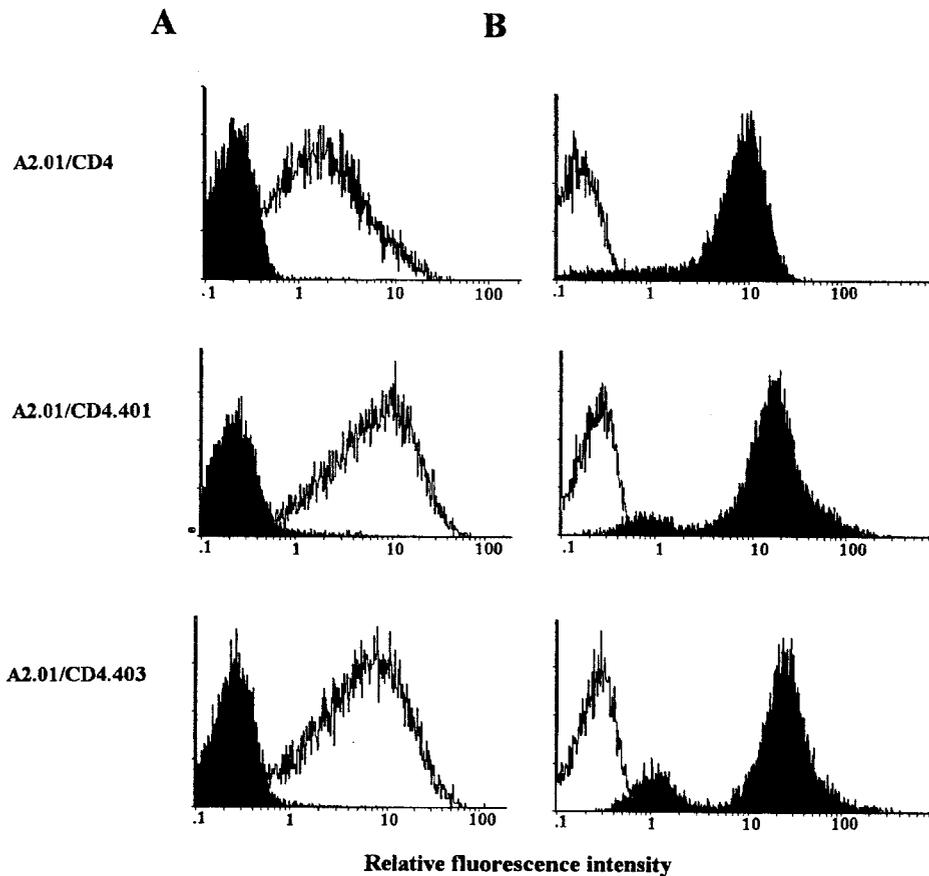


FIG. 8. Effect of infection on CD4 antigen modulation and p24<sup>gag</sup> antigen expression in A2.01 transfectant cells. A2.01/CD4, A2.01/CD4.401, and A2.01/CD4.403 cells exposed to HIV-1<sub>Lai</sub> were cultured for 15 days in medium alone. The percentages of cells showing detectable expression of surface CD4 (A) and HIV-1 p24<sup>gag</sup> antigen (B) were monitored as described in the legend to Fig. 5.

observations strengthen the hypothesis that the CD4 cytoplasmic tail, which is known for its ability to interact with p56<sup>lck</sup>, is involved in transduction of an activation signal consecutive to HIV-1 binding to the extracellular portion of the molecule. Consequently, a lack of signal transduction could explain the delayed virus production observed in cells expressing a truncated form of CD4 (3, 4, 7, 28).

Concerning HIV-1-induced apoptosis, the role played by the cytoplasmic tail of CD4 remains obscure. A study recently reported by Goldman and coworkers (16) suggested that CD4 ligation by gp120-anti-gp120 complexes uncoupled p56<sup>lck</sup> from CD4. This phenomenon possibly induces anergy, a first step toward apoptosis. According to Corbeil and coworkers (14), the expression of p56<sup>lck</sup> is not absolutely required for HIV-1 induction of apoptosis, but it may be required to prolong the cell surface expression of CD4, thereby permitting the delivery of the apoptotic signal. These authors have also reported that A2.01/CD4.418 cells (expressing a truncated mutant of CD4 at position 418 which does not associate with p56<sup>lck</sup>) and A2.01/CD4mut (expressing a dicysteine C420A, C422A mutant form of CD4 that disrupts CD4-p56<sup>lck</sup> association) underwent apoptosis upon HIV-1 infection (26). However, they did not find apoptosis in A2.01/CD4.402 cells (expressing a truncated mutant of CD4 at position 402), and therefore have suggested that transduction of the apoptotic signal involves amino acids located between positions 402 and 418 of CD4.

Here, we have reinvestigated the putative role played by the

cytoplasmic tail of CD4 in HIV-1-induced apoptosis by using an experimental model system similar to that described above, which consisted of cells expressing truncated mutants of CD4 at positions 401 and 403, respectively. These truncated forms of CD4 have lost the ability to interact with p56<sup>lck</sup>; therefore, the dissociation described by Goldman et al. (16) is not possible. Moreover, if these cells undergo apoptosis, the apoptotic signals cannot be transduced via the CD4 cytoplasmic tail. Although we could not find evidence for HIV-1-induced apoptosis in the A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells early after virus exposure, apoptosis was noticed 15 days after virus exposure (Fig. 7). It is worth noting that p24<sup>gag</sup> antigen was clearly detected in A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells 15 days after virus exposure (Fig. 8B) and that expression of CD4 was modulated in those cells (Fig. 8A). Most likely, downregulation of truncated forms of CD4 involves the formation of Env-CD4 complexes trapped within the endoplasmic reticulum (24), whereas several mechanisms, including those that involve the HIV-1 regulatory gene products (Nef and Vpu), probably contribute to the modulation of the surface expression of wild-type CD4 (8, 30). The long lag time that passed between virus exposure and the first evidence for HIV-1-induced apoptosis in cultures of A2.01/CD4.401 and A2.01/CD4.403 cells was directly linked to delayed HIV-1 gene expression in these cells (Fig. 6). Therefore, it is not clear at present why HIV-1-infected A2.01/CD4.402 cells were not found susceptible to HIV-1 apoptosis in the experiments reported by Corbeil and

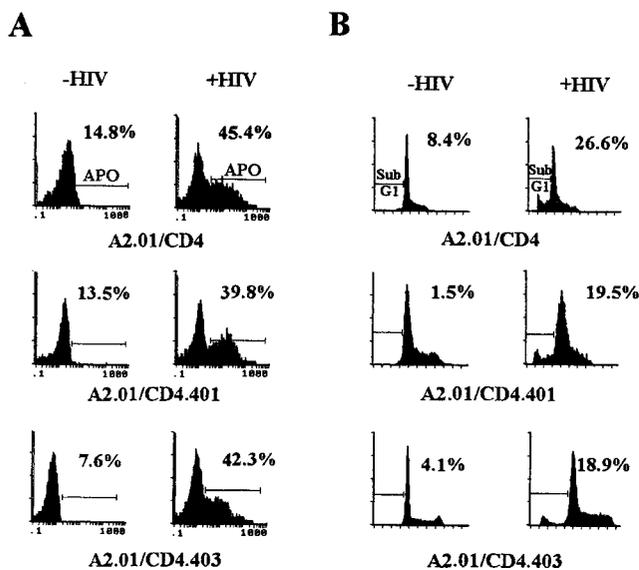


FIG. 9. Measurement of apoptotic cell death in A2.01-transfected clones 15 days after virus exposure with the TUNEL assay (A) and propidium iodide staining (B). (A) A2.01/CD4, A2.01/CD4.401, and A2.01/CD4.403 cells were exposed to HIV-1<sub>Lab</sub>, and the percentage of cells in cultures showing DNA strand breakage was measured at day 15 postinfection by flow cytometry analysis (TUNEL assay). (B) To relate apoptosis to the cell cycle position, cells exposed to HIV-1<sub>Lab</sub> and control cultures were stained with propidium iodide. Sub-G<sub>1</sub>-phase cells were counted by flow cytometry analysis.

coworkers (14). These authors used much more virus (0.5 < multiplicity of infection < 1) than we did (we used 100  $\mu$ l of virus at 1,000  $\times$  TCID<sub>50</sub>/ml to 10,000  $\times$  TCID<sub>50</sub>/ml, concentrations of HIV-1 that correspond to 0.002 < multiplicity of infection < 0.02), had a different infection protocol (3 h at 37°C instead of 30 min at 4°C), and investigated apoptosis within 3 days after infection by using propidium iodide, which is less sensitive than YOPRO-1 for quantification of apoptotic events. A possible explanation is that apoptosis of A2.01/CD4.402 cells induced by HIV-1 was slightly delayed compared to viral production (the reasons for delayed apoptosis are discussed below). Alternatively, it remains possible that the requirement for CD4 signaling differs between low- and high-viral-load models of infection. Although this problem remains to be elucidated, it can be concluded from our results that truncations of CD4 at position 401 or 403 do not abrogate HIV-1-induced apoptosis. This conclusion is strengthened by the work from Jacotot and coworkers (19), who have very recently reported apoptosis of A2.01/CD4.402 cells induced by HIV-1 infection or by coculture with chronically HIV-1-infected H9 cells. In their experiments, these authors have measured the occurrence of apoptosis in A2.01/CD4.402 cells by using a sensitive assay which consists of analysis of the presence of nucleosomal histones (H2A, H2B, H3, and H4) in the nucleoplasm of cells by quantitative densitometry of stained histones.

In agreement with Corbeil's proposal, our results confirm that the interaction between p56<sup>lck</sup> and CD4 is not necessary to induce apoptosis, but rather may accelerate the transmission of a cell death signal. It is worth noting that virus production begins 3 days before significant apoptosis can be detected in culture. Previous experiments by Corbeil and Richman (13) suggested that at least reverse transcription and possibly production of viral proteins must occur to render the cells susceptible to apoptosis. Using a different experimental model sys-

tem, we have recently observed that HIV-1-induced apoptosis of CEM cells was abrogated by addition to the cell culture medium 6 h postinfection of an antibody that inhibits HIV-1 transcription (16b). This result leads us to conclude that HIV-1-induced apoptosis requires HIV-1 gene expression. It has been hypothesized (13) that target cells would require to be infected and then would be resigned at the cell surface to undergo apoptosis. The fact that the present study demonstrates that the CD4 cytoplasmic tail is not required for delivery of the apoptotic signals indicates that the second step of the process does not involve recruitment of a signaling cascade through the cytoplasmic tail of CD4 but rather acts through another mechanism that remains to be elucidated. An interesting hypothesis has been recently proposed by Jacotot and coworkers (19), who suggest that the HIV-1 fusion cofactor CXCR4/fusin may be implicated in HIV-1-induced apoptosis by allowing optimal interactions between the gp120-gp41 and the CD4-CXCR4 complexes and/or by transducing specific heterotrimeric protein G-dependent signals during these interactions.

Uncontrolled and chronic immune activation triggered by HIV-1 (4, 6, 19, 25) is probably the primary mechanism responsible for the collapse of the immune system observed in AIDS patients (1, 16). It should involve transcription factors stimulating cell activation and virus replication but also triggering activation-induced apoptosis. It is admitted that the CD4 molecule plays a role in HIV-1-induced apoptosis, yet many aspects of the molecular interactions triggering this process remain to be elucidated. Although the situation in the primary CD4<sup>+</sup> T cell is fairly different from that in the lymphoblastoid T-cell line, the present study demonstrates that the cytoplasmic tail of CD4 is not required in this process.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Michel Hirn (Coulter-Immunotech, Marseille, France) and Dan R. Littman (New York Medical College, New York, N.Y.) for providing reagents and cells. We also thank Jacques Corbeil (University of California—San Diego, San Diego, Calif.) and Nelly Noraz (IGMM, Montpellier, France) for critical readings of the manuscript.

This work was supported by institutional funds from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and a grant (to C.D.) from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS). C.G. and N.C. are fellows of the ANRS.

#### REFERENCES

- Ameisen, J. C. 1994. Programmed cell death (apoptosis) and cell survival regulation: relevance to AIDS and cancer. *AIDS* 8:1197-1213.
- Ameisen, J.-C., and A. Capron. 1991. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today* 12:102-105.
- Bedinger, P., A. Moriarty, R. C. von Borstel II, N. J. Donovan, K. S. Steinmer, and D. R. Littman. 1988. Internalization of the human immunodeficiency virus does not require the cytoplasmic domain of CD4. *Nature* 334:162-165.
- Benkirane, M., K.-T. Jeang, and C. Devaux. 1994. The cytoplasmic domain of CD4 plays a critical role during the early stages of HIV infection in T-cells. *EMBO J.* 13:5559-5569.
- Bérubé, P., B. Barbeau, R. Cantin, R.-P. Sékaly, and M. Tremblay. 1996. Repression of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat-driven gene expression by binding of the virus to its primary cellular receptor, the CD4 molecule. *J. Virol.* 70:4009-4016.
- Briant, L., N. Coudronnière, V. Robert-Hebmann, M. Benkirane, and C. Devaux. 1996. Binding of HIV-1 virions or gp120-anti-gp120 immune complexes to HIV-1-infected quiescent peripheral blood mononuclear cells reveals latent infection. *J. Immunol.* 156:3994-4004.
- Briant, L., N. Signoret, M. Gaubin, V. Robert-Hebmann, X. Zhang, R. Murali, M. I. Greene, D. Piatier-Tonneau, and C. Devaux. 1997. Transduction of activation signal that follows HIV-1 binding to CD4 and CD4 dimerization involve the immunoglobulin CDR3-like region in domain 1 of CD4. *J. Biol. Chem.* 272:19441-19450.
- Chen, M.-Y., F. Maldarelli, M. K. Karczewski, R. L. Willey, and K. Strebel.

1993. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of CD4 in vitro: the cytoplasmic domain of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *J. Virol.* **67**:3877-3884.
9. Chirmule, N., H. Goonewardena, S. Pahwa, R. Pasieka, V. S. Kalyanaraman, and S. Pahwa. 1995. HIV-1 envelope glycoproteins induce activation of activated protein-1 in CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Biol. Chem.* **270**:19364-19369.
  10. Chirmule, N., V. S. Kalyanaraman, and S. Pahwa. 1994. Signal transduced through the CD4 molecule on T lymphocytes activates NF- $\kappa$ B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**:498-505.
  11. Chirmule, N., and S. Pahwa. 1996. Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune functions. *Microbiol. Rev.* **60**:386-406.
  12. Corbeau, P., C. Devaux, F. Kourilsky, and J.-C. Chermann. 1990. An early postinfection signal mediated by monoclonal anti- $\beta$ 2 microglobulin antibody is responsible for delayed production of human immunodeficiency virus type 1 in peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol.* **64**:1459-1464.
  13. Corbeil, J., and D. D. Richman. 1995. Productive infection and subsequent interaction of CD4-gp120 at the cellular membrane is required for HIV-induced apoptosis of CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Gen. Virol.* **76**:681-690.
  14. Corbeil, J., M. Tremblay, and D. D. Richman. 1996. HIV-induced apoptosis requires the CD4 receptor cytoplasmic tail and is accelerated by interaction of CD4 with p56lck. *J. Exp. Med.* **183**:39-48.
  15. Golding, H., R. Blumenthal, J. Manischewitz, D. R. Littman, and D. S. Dimitrov. 1993. Cell fusion mediated by interaction of a hybrid CD4.CD8 molecule with the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein does occur after a long lag time. *J. Virol.* **67**:6469-6475.
  16. Goldman, F., J. Crabtree, C. Hollenback, and G. Koretzky. 1997. Sequestration of p56lck by gp120, a model for TCR desensitization. *J. Immunol.* **158**:2017-2024.
  - 16a. Guillermin, C., and C. Devaux. Unpublished observations.
  - 16b. Guillermin, C., V. Robert-Hebmann, U. Hibner, M. Hirn, and C. Devaux. Submitted for publication.
  17. Hovanessian, A. G. 1994. Apoptosis in HIV infection: the role of extracellular and transmembrane glycoproteins, p. 21-42. *In* L. D. Tomei and F. O. Cope (ed.), *Apoptosis II: the molecular basis of apoptosis in disease*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
  18. Idziorek, T., J. Estaquier, F. de Bels, and J. C. Ameisen. 1995. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of apoptosis without interfering with cell viability. *J. Immunol. Methods* **185**:249-258.
  19. Jacotot, E., B. Krust, C. Callebaut, A. G. Laurent-Crawford, J. Blanco, and A. G. Hovanessian. 1997. HIV-1 envelope glycoproteins-mediated apoptosis is regulated by CD4 dependent and independent mechanisms. *Apoptosis* **2**:47-60.
  20. Kornfeld, H., W. W. Cruikshank, S. W. Pyle, J. S. Berman, and D. M. Center. 1988. Lymphocyte activation by HIV-1 envelope glycoprotein. *Nature* **335**:445-448.
  21. Laurent-Crawford, A. G., B. Krust, S. Muller, Y. Rivière, M.-A. Rey-Cuille, J.-M. Bechet, L. Montagnier, and A. G. Hovanessian. 1991. The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology* **185**:829-839.
  22. Laurent-Crawford, A. G., B. Krust, Y. Rivière, C. Desgranges, S. Muller, M. P. Kiény, C. Dauguet, and A. G. Hovanessian. 1993. Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**:761-773.
  23. Maldarelli, F., H. Sato, E. Berthold, J. Orenstein, and M. A. Martin. 1995. Rapid induction of apoptosis by cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **69**:6457-6465.
  24. Martin, R. A., and D. P. Nayak. 1996. Membrane anchorage of gp160 is necessary and sufficient to prevent CD4 transport to the cell surface. *Virology* **220**:473-479.
  25. Merzouki, A., P. Patel, S. Cassol, M. Ennaji, P. Tailor, F. R. Turcotte, M. O'Shaughnessy, and M. Arella. 1995. HIV-1 gp120/160 expressing cells up-regulate HIV-1 LTR directed gene expression in a cell line transfected with HIV-1 LTR-reporter gene constructs. *Cell. Mol. Biol.* **41**:445-452.
  26. Moutouh, L., D. D. Richman, and J. Corbeil. 1997. HIV-induced apoptosis requires the CD4 cytoplasmic tail and is not Fas-dependent in A2.01 cell line expressing wild type and mutants of the CD4 receptor, p. 283. *In* S. H. Huges and J. M. Coffin (ed.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
  27. Popik, W., and P. M. Pitha. 1996. Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 induces association of Lck and Raf-1 and activates Raf-1 by a Ras-independent pathway. *Mol. Cell. Biol.* **16**:6532-6541.
  28. Poulin, L., L. A. Evans, S. Tang, A. Barboza, H. Legg, D. R. Littman, and J. A. Levy. 1991. Several CD4 domains can play a role in human immunodeficiency virus infection of cells. *J. Virol.* **65**:4893-4901.
  29. Rosenberg, Z. F., and A. S. Fauci. 1991. Immunopathogenesis of HIV infection. *FASEB J.* **5**:2382-2390.
  30. 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**:3274-3280.
  31. Terai, C., R. S. Kornbluth, C. D. Pauza, D. D. Richman, and D. A. Carson. 1991. Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J. Clin. Invest.* **87**:1710-1715.
  32. Tremblay, M., S. Meloche, S. Gratton, M. A. Wainberg, and R. P. Sékaly. 1994. Association of p56lck with the cytoplasmic domain of CD4 modulates HIV-1 expression. *EMBO J.* **13**:774-783.
  33. 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**:226-234.

### **C. Résultats- Discussion**

En résumé, cet article montre qu'après trois jours de culture, seules les cellules A2.01/CD4 (qui expriment une molécule CD4 sauvage) produisent du virus et présentent un pourcentage de cellules en apoptose plus élevé que le contrôle (les mêmes cellules non infectées). Cependant, si les cellules A2.01/CD4 401 et A2.01/CD4 403 infectées (cellules qui expriment une molécule CD4 tronquée au niveau cytoplasmique) sont gardées en culture 15 jours, elles présentent un pourcentage élevé de cellules en apoptose et produisent du virus, comme les cellules exprimant le CD4 sauvage.

Des résultats obtenus récemment par Jacotot et al (Jacotot et al., 1997) mettent eux aussi en évidence un retard dans l'induction d'apoptose pour des cellules exprimant une molécule CD4 tronquée au niveau du résidu 402 données par D. R. Littman. La méthode de détection de l'apoptose utilisée par ce groupe est basée sur la présence des histones H2A, H2B, H3 et H4 dans le nucléoplasme de la cellule. Ces résultats suggèrent, comme ceux que nous avons obtenus, l'existence d'une corrélation entre l'expression du virus dans la cellule et l'induction d'apoptose puisque l'apoptose est détectée peu après la production de virus. Des résultats présentés plus loin appuieront cette hypothèse.

Jacotot et al développent une hypothèse intéressante qui pourrait également expliquer l'apoptose des cellules exprimant des formes tronquées de la molécule CD4:

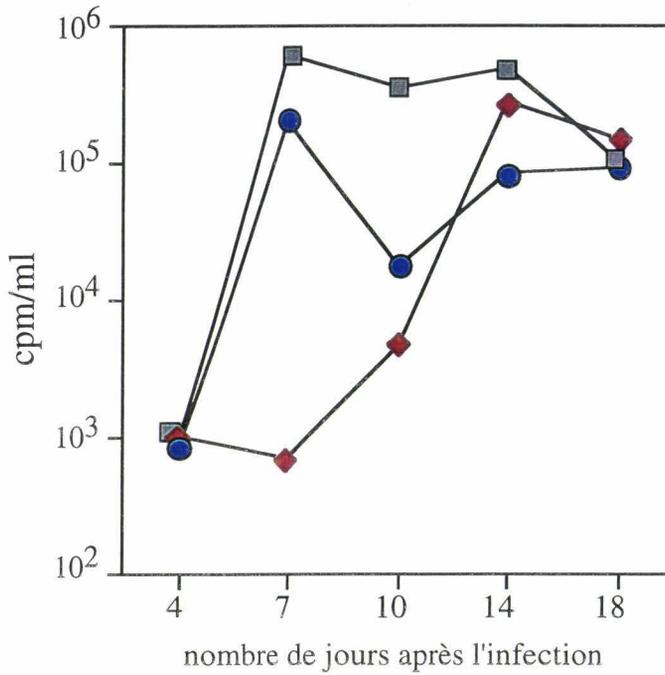
en utilisant le PMA, qui est normalement un fort inhibiteur d'expression de la molécule CD4 (Marsh and Pelchen-Matthews, 1996), (inactif sur les formes tronquées de CD4), sur les cellules A2.01/CD4 402, ils montrent d'une part qu'il n'y a pas modulation de l'expression de CD4, d'autre part qu'il y a inhibition de l'apoptose induite par VIH. Les auteurs déduisent de cette expérience que le mécanisme de protection du PMA ne passe pas par un blocage des interactions CD4/gp120. Le PMA pourrait, d'après les auteurs:

- soit compléter le signal incomplet transmis par la gp120, peut-être via p95<sup>Vav</sup>
- soit en inhibant l'expression de la fusine (le second récepteur du virus) qui, de ce fait, ne transduirait plus un signal de mort, ou ne serait plus capable d'optimiser la conformation du complexe gp120/gp41/CD4.

Le rôle précis de la fusine, et son implication dans l'apoptose induite par VIH sont actuellement hypothétiques. Il est probable, compte tenu du nombre d'équipes travaillant sur les seconds récepteurs, que des résultats viendront très vite confirmer ou infirmer cette hypothèse.

A

### Dosage de l'activité de la transcriptase inverse



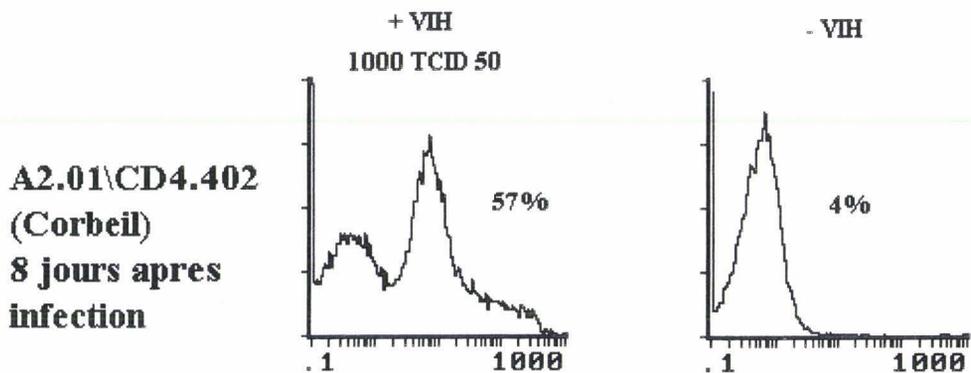
**Fig:1**

infection des cellules A2.01/CD4 ■ , A2. 01/CD4 401 ◆ ,  
A2.01/CD4 402 ●  
se reporter au Materiel et methodes de l'article pour les détails  
du protocole de l'infection

A- Dosage de l'activité de la transcriptase inverse

B- Détection des cellules en apoptose par cytométrie.

B



## 1. Résultats obtenus après infection des cellules A2.01/CD4 402

Nous avons récemment pu disposer des cellules A2.01/CD4 402 (qui expriment une forme tronquée au niveau du résidu 402 de la molécule CD4), données par J. Corbeil.

Corbeil et al avaient montré en infectant ces cellules par une dose massive de virus puis en effectuant un marquage à l'iodure de propidium, qu'elles ne sont pas sensibles à l'apoptose induite par VIH (Corbeil, 1996). Ces résultats indiquent que l'apoptose induite par VIH nécessite la présence du domaine cytoplasmique de CD4. De plus, Corbeil et al ont suggéré que l'interaction entre CD4 et P56<sup>lck</sup> accélère l'induction d'apoptose en stabilisant la molécule CD4 à la surface cellulaire, permettant ainsi le passage d'un signal. Dans nos conditions expérimentales, nous ne retrouvons pas les résultats que le groupe de Corbeil a obtenus. En effet, la détection des cellules en apoptose par YOPRO-1, ainsi que la mesure de l'activité de la transcriptase inverse présentées *figure n°1* montrent que les cellules A2.01 /CD4 402 se comportent comme les cellules qui expriment la forme sauvage de la molécule CD4. Ces cellules produisent très vite une quantité importante de virus, et subissent l'apoptose très rapidement. Ces résultats sont également en contradiction avec les résultats observés sur les A2.01/CD4 401 et 403 (cf article), ainsi que l'interprétation qu'il en avait été faite (Guillerm et al., 1998).

Il y a certainement plusieurs explications possibles aux divergences de résultats obtenus (voir tableau n°1).

Tout d'abord, il est possible les mécanismes d'induction d'apoptose et la nécessité d'un signal passant par le domaine cytoplasmique de CD4 soient différents suivant la dose infectieuse utilisée.

Les divergences de résultats pourraient aussi tenir à la méthodologie employée. Compte tenu de l'importance de la dose infectieuse employée par Corbeil, les cellules pourraient déjà être à l'état de débris au moment où les auteurs effectuent leur marquage à l'iodure de propidium, la lecture en cytométrie ne permettra pas de voir les cellules en apoptose. Les seules cellules qui restent alors observables en cytométrie seraient alors les cellules vivantes chroniquement infectées.

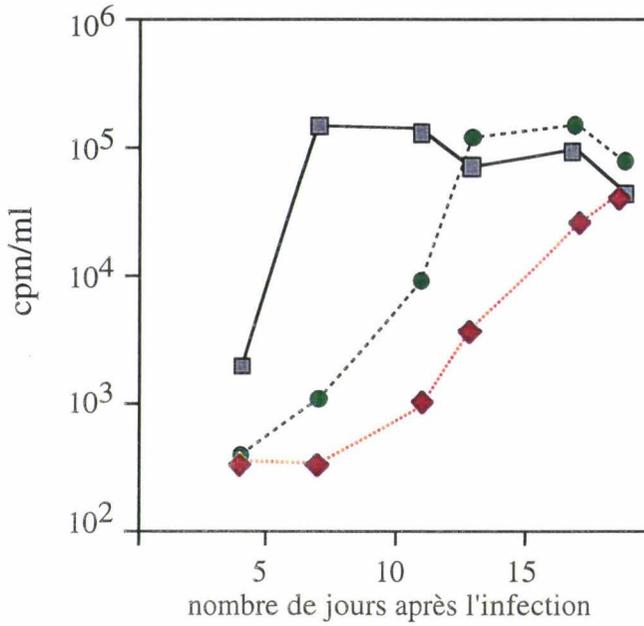
Enfin, une analyse en gel retard, avec une sonde NFκB, a été effectuée (Coudronnière., N non présenté) et fournit une explication possible du comportement de ces cellules après infection: d'après les résultats du gel retard, ces cellules présentent un taux basal (lorsqu'elles ne sont soumises à aucun traitement) de NFκB transloqué dans le noyau, extrêmement élevé. Cette information suggère fortement que ces cellules sont constitutivement activées. Il est probable que les cellules A2.01/CD4 402 possèdent une mutation, résultant du mode de sélection, au niveau du mécanisme d'induction de la

Auteurs	Types cellulaires Provenance	Dose infectieuse utilisée	Durée de l'observation	méthode de détection de l'apoptose	présence d'un pourcentage élevé de cellules en apoptose	production virale importante
(Corbeil, 1996)	A2.01/CD4 402	0,5<MOI<1	3 jours	Iodure de propidium	non	oui
(Jacotot et al., 1997)	A2.01/CD4 402 Littman		8 jours	détections d'histones dans le nucléoplasme	oui	oui
(Guillerm et al., 1998)	A2.01/CD4 401 A2.01/CD4 403 Littman	0,002<MOI<0,02	15 jours	YOPRO-1, TUNEL, iodure de propidium	oui	oui
Guillerm (non publié)	A2.01/CD4 402 (Corbeil, 1996; Tremblay et al., 1994)	0,002<MOI<0,02	15 jours	YOPRO-1	oui	oui

**Tableau 1:**  
résumé des résultats obtenus sur différentes cellules exprimant une forme tronquée de CD4 au niveau du  
domaine intracytoplasmique

A

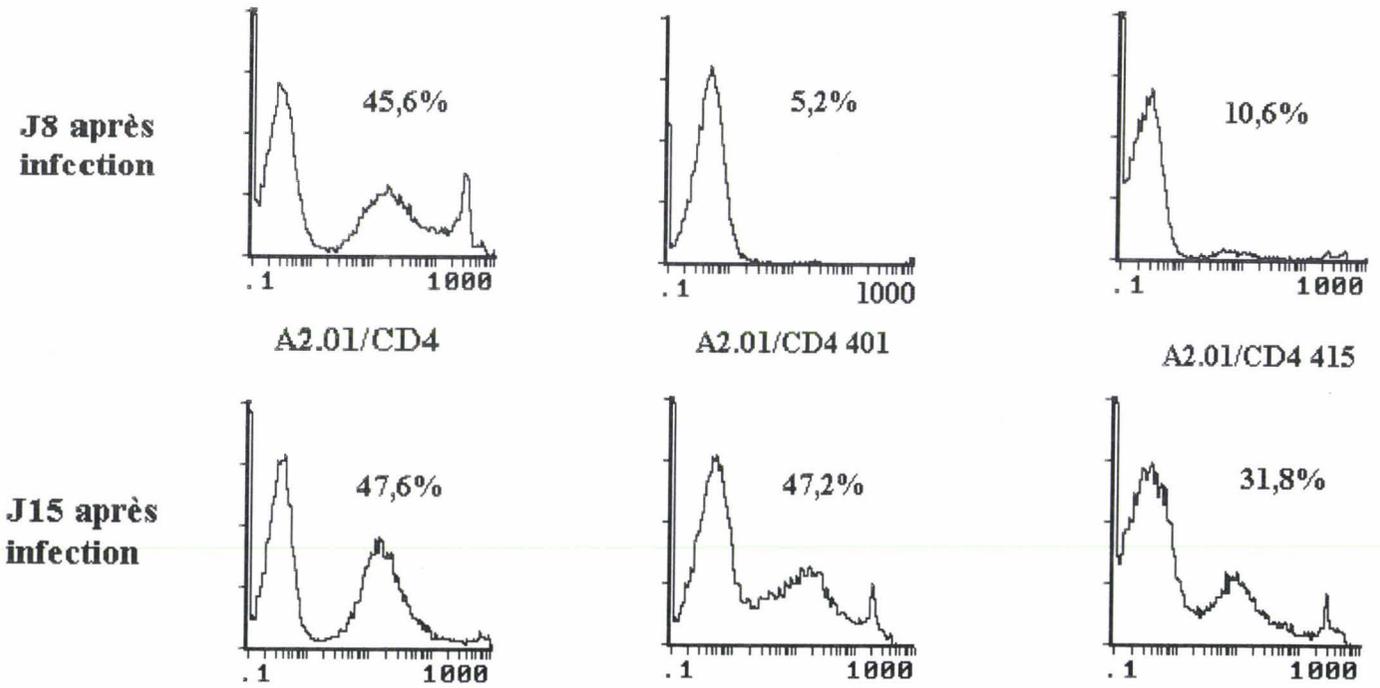
Dosage de l'activité de la transcriptase inverse



**Fig:2**  
 infection des cellules A2.01/CD4 ■ , A2. 01/CD4 401 ◆ ,  
 A2.01/CD4 415 ●  
 se reporter au Materiel et methodes de l'article pour les détails  
 du protocole de l'infection

A- Dosage de l'activité de la transcriptase inverse  
 B- Détection des cellules en apoptose par cytométrie.

B



translocation nucléaire de NF $\kappa$ B. Cependant, si cette information explique nos résultats, elle n'explique pas ceux de Corbeil et al.

## 2. A PROPOS DE L'IMPORTANCE DES INTERACTIONS p56<sup>lck</sup>/CD4

Les résultats que nous avons obtenus avec les cellules A2.01/CD4 401 et 403, ainsi que ceux de Jacotot et al (Jacotot et al., 1997), montrent que les interactions p56<sup>lck</sup>/CD4 ne sont pas indispensables à l'induction de l'apoptose par VIH. Cependant elles pourraient amplifier et accélérer le processus: en effet, la transfection d'une forme de p56<sup>lck</sup> constitutivement active rend les cellules hypersensibles à l'apoptose (Di Somma et al., 1995).

### a) *Infection de cellules A2.01 CD4/415*

Afin d'étudier l'importance des interactions CD4/p56<sup>lck</sup>, nous avons effectué des expériences complémentaires sur des cellules qui expriment un CD4 dont le site de phosphorylation situé au niveau de la sérine 415 est remplacé par un résidu leucine: les A2.01/CD4 415 (Poulin et al., 1991). La sérine 415 fait partie des 3 sites de phosphorylation de la molécule CD4 impliqués dans le mécanisme de dissociation de la p56<sup>lck</sup> et de CD4 qui précède l'endocytose de CD4 (Shin et al., 1990; Shin et al., 1991). Ces cellules ont été infectées suivant le protocole rapporté dans l'article, la production virale et l'induction d'apoptose ont été suivies en parallèle.

Le dosage d'activité de la transcriptase inverse, présenté *figure 2*, met en évidence un léger retard de production virale par rapport à la cinétique de production des A2.01/CD4. L'analyse cytométrique du marquage au YOPRO-1 (*voir figure 2*) met également en évidence un retard d'induction d'apoptose par rapport à l'apoptose induite dans les A2.01/CD4.

La mutation ponctuelle de la sérine 415 en leucine, sans empêcher l'activation de la p56<sup>lck</sup>, pourrait, par contre, ralentir la transduction du signal activateur du virus. Cela impliquerait que ce signal est transduit à la suite de la dissociation de p56<sup>lck</sup> et de CD4.

D'autre part, de façon plus générale, ces résultats montrent que la suppression des interactions p56<sup>lck</sup>/CD4 ou la perturbation du mécanisme d'endocytose de CD4 ralentissent la cinétique de production virale et ne bloquent pas l'apoptose.

## *b) Discussion*

Cette affirmation est par ailleurs confirmée par des résultats obtenus à partir d'autres systèmes:

Des expériences effectuées sur des cellules qui expriment des formes de CD4 mutées au niveau des deux cystéines permettant l'interaction p56<sup>lck</sup>/CD4, montrent que ces cellules subissent l'apoptose après infection par VIH (Moutouh et al., 1997). De plus Corbeil et al ont montré que des cellules qui n'expriment pas la p56<sup>lck</sup> sont sensibles à l'apoptose induite par VIH (Corbeil, 1996).

Pourtant, d'autres travaux ont abouti à des résultats et des interprétations qui, à première vue, paraissent en contradiction avec les nôtres. En effet, la nécessité du contact de CD4/p56<sup>lck</sup> dans l'apoptose induite par VIH a été soulignée par différents auteurs:

notamment, le dysfonctionnement des cellules T CD4<sup>+</sup> (l'anergie, qui peut être considérée comme une amorce de l'apoptose), observé après fixation de l'enveloppe virale sur la molécule CD4 ou après infection, a été corrélé avec la dissociation anormale de p56<sup>lck</sup> et de CD4 ou la séquestration de la p56<sup>lck</sup> par le cytosquelette (Di Somma et al., 1995; Kanner and Haffar, 1995; Goldman et al., 1997). Cette perturbation des interactions CD4/p56<sup>lck</sup> a été imputée à la transduction d'un signal négatif par la gp120 (Hubert et al., 1995).

Il n'est pas impossible que la dissociation de la p56<sup>lck</sup> et de CD4 contribue à l'induction d'un signal négatif, préalable à l'activation du programme de mort. Cependant, il n'est sans doute pas indispensable à l'induction d'apoptose.

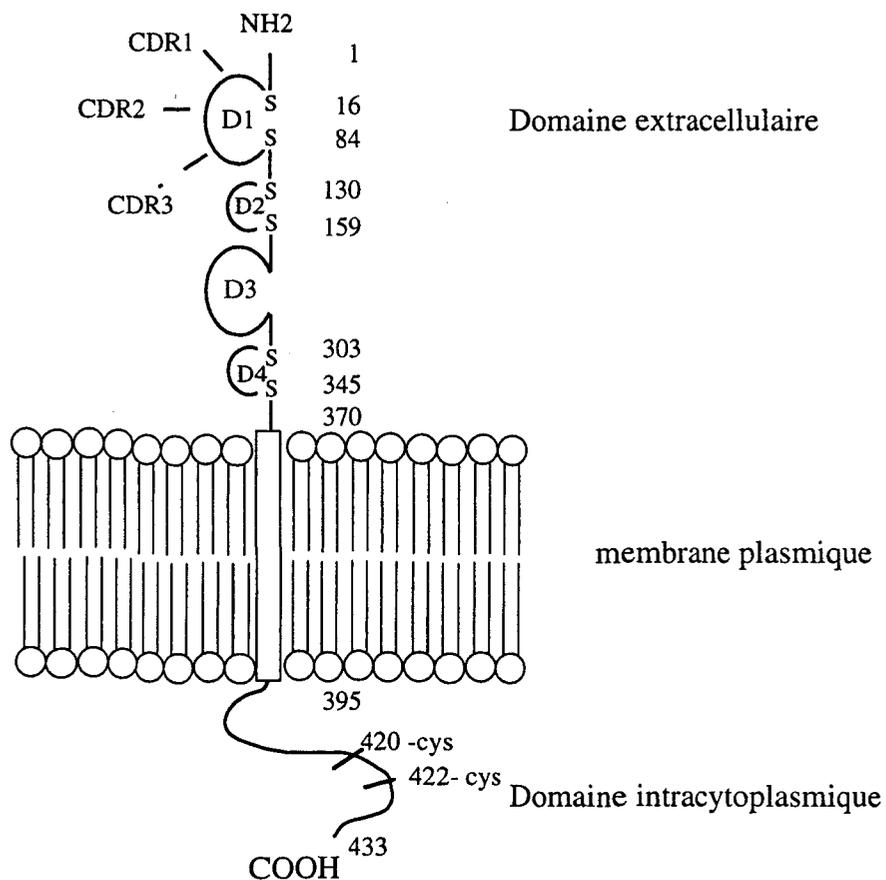
Par contre, il faut reconnaître que, dans le contexte d'une infection (accompagnée de production de virus par la cellule), il est connu que l'interaction entre certaines protéines virales et CD4 ou p56<sup>lck</sup> est impliquée dans l'activation de la mort cellulaire.

Tout d'abord, Nef qui est produite assez précocement contribue à accélérer l'endocytose de la molécule CD4. Plus tard au cours de l'infection, après la synthèse du précurseur de l'enveloppe virale (la gp160), la formation de complexes associant la gp160, CD4 et la p56<sup>lck</sup> empêche la synthèse de ces protéines cellulaires. Cet effet est renforcé par l'action de Vpu qui dégrade les molécules CD4 séquestrées dans le réticulum endoplasmique (Marsh and Pelchen-Matthews, 1996). Ce phénomène pourrait constituer un mécanisme d'échappement du virus et une protection contre la surinfection. Pourtant, en diminuant les capacités de la cellule à interagir avec les cellules présentatrices d'antigène, et d'autre part à cause de l'accumulation de complexes formés dans le réticulum endoplasmique, ce mécanisme contribue à la mort de la cellule (Marsh and Pelchen-Matthews, 1996).

Dans les cellules exprimant une molécule CD4 tronquée, l'apoptose, effectivement observée après la production virale, ne peut pas être expliquée par l'action de Nef (qui interagit avec CD4 par sa région intracytoplasmique), ni par la formation de complexes CD4/p56<sup>lck</sup>/gp160.

Par contre, l'expression de l'enveloppe virale à la surface cellulaire est très vraisemblablement impliquée dans les mécanismes d'induction de la mort des cellules exprimant une molécule CD4 tronquée, et d'une manière plus générale son rôle semble déterminant dans l'apoptose induite par VIH (voir article suivant).





**Fig: 3**

**Schéma de la molécule CD4, représentation des 4 domaines extracellulaires de CD4 et des boucles CDR like.**

Le site de fixation de l'anticorps 13B8.2 est localisé au niveau de la boucle CDR3, alors que le site de fixation de la gp120 est situé au niveau de la boucle CDR2.

L'anticorps BL4 reconnaît les domaines D1 et D2.

## **X. Le traitement des cellules CEM infectées par un anticorps qui bloque l'expression des gènes viraux, inhibe l'induction d'apoptose.**

### **A. Introduction**

De nombreux systèmes visant à inhiber l'apoptose induite par VIH ont déjà été testés (voir introduction p 81). Certains d'entre eux conduisent à l'augmentation de la réplication virale et à la mort cellulaire par un autre processus que l'apoptose (syncytia, gonflement ou un autre mécanisme récemment décrit) (Kolesnitchenko et al., 1997).

Parmi les différentes molécules étudiées, certains anticorps dirigés contre la molécule CD4 ont été décrits pour inhiber le cycle du VIH:

1) en empêchant la fixation du virus sur son récepteur (il s'agit dans ce cas des anticorps dirigés contre la boucle CDR2 du domaine D1 de CD4) OKT4a (Laurent-Crawford et al., 1993, Dalgleish et al., 1984).

2) en bloquant la fusion, qui nécessite probablement un changement conformationnel de CD4 (Moore et al., 1992)

3) en inhibant la transcription virale (c'est le cas des anticorps spécifiques de la boucle CDR3 du domaine D1) (Benkirane et al., 1993; Benkirane et al., 1995);

4) en bloquant la formation des syncytia (les anticorps anti-CD4 sont alors spécifiques de la boucle CDR2 ou CDR3) (Corbeau et al., 1993).

Outre des effets inhibiteurs sur le cycle viral, certains anticorps anti-CD4, en se fixant sur la boucle CDR2, peuvent mimer l'action de la gp120 et sensibiliser les cellules à l'apoptose: c'est le cas de l' anticorps Leu3a (Oyaizu et al., 1993; Milia et al., 1997).

A l'inverse, un autre anticorps enfin (OKT4), a été décrit pour inhiber l'apoptose sans inhiber la formation des syncytia (Laurent-Crawford et al., 1993).

Ces différents effets peuvent s'expliquer par les multiples fonctions de la molécule CD4. En plus de son rôle de récepteur pour le VIH par la boucle CDR2, elle est impliquée dans les mécanismes de transduction de signaux cellulaires d'activation ou négatifs (Tite et al., 1986; Veillette et al., 1989; Newell et al., 1990; Glaichenhaus et al., 1991).

#### **1. Résumé des effets connus de l'anticorps 13B8.2**

Il a déjà été montré, dans notre laboratoire, qu'un anticorps dirigé contre la boucle CDR3 du domaine D1 de la molécule CD4 (*cf fig 3*), 13B8.2, n'inhibe pas l'entrée du virus, mais bloque la formation de syncytia et la transcription virale dans des cellules contenant un provirus intégré. Il nous a donc semblé intéressant de connaître l'effet de 13B8.2 sur l'apoptose induite par VIH. De fait, cette étude permet d'apporter des éléments de réponse

à deux questions distinctes: d'une part quel est le processus qui déclenche l'apoptose lors de l'infection par VIH, d'autre part quels sont les mécanismes d'action de l'anticorps 13B8.2.

Un bref résumé des résultats déjà obtenus concernant cet anticorps permettra de mieux comprendre les travaux qui vont suivre.

**Tableau n°2: Les effets de l'anticorps 13B8.2 sur le cycle du VIH (ajouté après infection).**

étape ou événement important pour le cycle viral	effet de l'anticorps 13B8.2	technique employée	référence bibliographique
entrée du virus dans la cellule	pas d'effet	PCR, mesure des rétrotranscrits	(Corbeau et al., 1993)
formation de syncytia	inhibition	observation en microscopie	(Corbeau et al., 1993)
la rétrotranscription	pas d'effet	PCR, mesure des rétrotranscrits tardifs	(Benkirane et al., 1993)
l'intégration	pas d'effet	PCR	(Benkirane et al., 1993)
la transcription	blocage de la transcription précoce et tardive	RT-PCR, activité de gènes rapporteurs sous le contrôle du LTR	(Benkirane et al., 1993; Benkirane et al., 1995)
la translocation de NF $\kappa$ B induite par VIH	blocage de la translocation	gels retards	(Benkirane et al., 1994; Lemasson et al., 1996)

## 2. Effet de l'anticorps 13B8.2 sur l'apoptose induite par VIH

Pour étudier l'effet de l'anticorps 13B8.2 sur l'apoptose induite par VIH, nous avons infecté des cellules de la lignée CEM qui ont ensuite été cultivées soit sans anticorps, soit avec l'anticorps 13B8.2 ou avec l'anticorps BL4 qui se fixe au niveau de la région D1-D2 (voir *figure 3*).

Des cellules non infectées servent de contrôle pour le taux basal de cellules mortes. Les cellules sont gardées en culture 15 jours. La viabilité cellulaire est mesurée par observation microscopique après coloration au bleu trypan. En parallèle, une détection par PCR de l'ADN viral localisé dans la cellule, et un dosage de l'activité de la transcriptase inverse dans le surnageant de culture permettent la mise en évidence de la présence du virus dans la cellule, ainsi que la production virale.

Les cellules en apoptose sont spécifiquement détectées par un intercalant nucléaire, le YOPRO-1, qui pénètre dans les cellules en apoptose même précocément (Idziorek et al., 1995). La fluorescence du YOPRO-1 peut-être visualisée en cytométrie ou par microscopie à fluorescence.

Les résultats observés montrent que l'anticorps 13B8.2 permet la survie des cellules infectées par le VIH, alors que l'anticorps BL4 ne le fait pas.

Compte tenu des propriétés déjà connues de 13B8.2, l'anticorps pourrait inhiber l'apoptose:

- soit en inhibant l'expression des gènes viraux: en effet, l'expression des gènes viraux nécessite l'activation cellulaire et la translocation de facteurs de transcription cellulaires qui agissent sur le promoteur viral. Or, l'anticorps 13B8.2 bloque l'activation des MAP kinases (Benkirane et al., 1995) et de NF $\kappa$ B (Lemasson et al., 1996) induite par la fixation du VIH sur CD4 et inhibe la transcription virale. Le mécanisme d'action de 13B8.2 pourrait donc correspondre à une inhibition du facteur nucléaire NF $\kappa$ B qui de ce fait ne pourrait pas activer le promoteur viral.

- soit en bloquant l'interaction gp120/CD4: l'engagement de l'enveloppe virale joue un rôle important dans l'apoptose induite par VIH. On ignore encore les mécanismes impliqués, mais il est connu que l'enveloppe à la surface d'un virus inactivé par la chaleur n'induit pas l'apoptose, et que la gp120 soluble ne peut induire l'apoptose que si le TCR de la cellule cible est simultanément stimulé (Tian et al., 1995). Par contre l'enveloppe exprimée à la surface cellulaire, par contact avec une cellule exprimant CD4 induit l'apoptose sans nécessité d'engagement du TCR (Maldarelli et al., 1995).

- soit en interférant avec les signaux apoptotiques.

Chacune de ces possibilités a donc été explorée.

**B.**

An anti-CD4 (CDR3-loop) monoclonal antibody inhibits human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-induced apoptosis

Claire Guillermin, Véronique Robert-Hebmann, Urszula Hibner, Michel Hirn, and Christian Devaux.

Soumis à Virology

**An Anti-CD4 (CDR3-loop) Monoclonal Antibody Inhibits Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope glycoprotein-Induced Apoptosis**

Claire Guillermin<sup>1</sup>, Véronique Robert-Hebmann<sup>1</sup>, Urszula Hibner<sup>2</sup>,  
Michel Hirn<sup>3</sup>, and Christian Devaux<sup>1\*</sup>

CRBM/CNRS UPR 1086, Laboratoire Infections Rétrovirales et Signalisation Cellulaire, Institut de Biologie, 34060 Montpellier Cedex, France<sup>1</sup>; Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier, CNRS UMR 5535, 34033 Montpellier Cedex 1, France<sup>2</sup>; and, Immunotech-Coulter, 13009 Marseille, France<sup>3</sup>.

Running title: Inhibition of HIV-1 induced apoptosis.

Key words: CD4 / signaling/ HIV

This work was supported by Institutional funds from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), a grant (to C. D.) from the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS); C. G. is fellow of the ANRS.

Correspondence address: Dr. Christian Devaux, CRBM/CNRS UPR 1086, Laboratoire Infections Rétrovirales et Signalisation Cellulaire, Institut de Biologie, 4 Boulevard Henri IV, 34060 Montpellier Cedex 1, France, Telephone# (33)-4-67-60-86-60; Fax# (33)-4-67-60-44-20; E-mail: devaux@sc.univ-montp1.fr

## SUMMARY

Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induced programmed cell death (PCD) by anti-CD4 monoclonal antibodies (mAb) was investigated using DNA intercalant YOPRO-1 assay. We found that 13B8.2, a mAb that binds the CDR3-like loop in domain 1 (D1) of CD4, protected infected CEM cell cultures against HIV-1 induced PCD. Protection was not observed using another anti-CD4 mAb (BL4) that binds D1-D2, suggesting that it requires engagement of precise CD4 epitopes. Since 13B8.2 is known to inhibit syncytia formation and virus transcription, it could inhibit HIV-1 induced PCD by (i) inhibiting virus gene expression; (ii) preventing viral envelope-CD4 interaction; and/or (iii) interfering with apoptotic signals. Our data indicate that absence of enhanced PCD in infected cell cultures treated with 13B8-2 mAb is probably the result of inhibition of HIV-1 replication and virus spread. Moreover, 13B8.2 mAb was found to inhibit PCD mediated by membrane expressed HIV-1 envelope glycoprotein. Finally, we found that 13B8-2 mAb displays no protective interference with apoptotic signal induced by Fas, dexamethasone, and serum withdrawal.

## INTRODUCTION

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is the etiological agent of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). One of the major characteristics of AIDS is the gradual depletion of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes during the development of the disease (Rosenberg and Fauci, 1991). Several mechanisms have been proposed to be responsible for the CD4 cell depletion (Ameisen and Capron, 1991; Laurent-Crawford et al., 1991; Terai et al., 1991; Hovanessian, 1994). Besides destruction of infected cells by HIV-specific cytotoxic lymphocytes (CTL) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), these mechanisms include the cytopathic effects (CPE) resulting from the infection of CD4<sup>+</sup> T cells by HIV-1. CPE may be ascribed to HIV-1 envelope glycoprotein 120 (gp120)-induced generation of syncytia resulting from cell-to-cell transmission of the virus and single-cell killing by induction of programmed cell death (PCD) or apoptosis. The mechanisms involved in HIV-1 induced PCD are not fully understood. PCD can be triggered directly in infected cells by the virus replication, presumably reflecting to host defense mechanisms against virus replication, spread, or persistence (Ameisen, 1994; Shen and Shenk, 1995). However, PCD can also be mediated indirectly through priming of uninfected bystander cells to apoptosis by gp120. Experiments aimed at defining the molecular mechanisms involved in HIV-1 induced PCD suggest that it requires viral transcription and cell surface expression of gp120 (Laurent-Crawford et al., 1993; Corbeil and Richman, 1995).

An important goal of HIV research is the identification of molecules inhibitory of HIV-1-induced PCD. During the search for such molecules, anti-CD4 mAb have been reported to inhibit HIV-1 induced PCD (Laurent-Crawford et al., 1993; Hovanessian, 1994; Corbeil and Richman, 1995). However, little is known about the implication of different CD4 epitopes or about the mechanisms by which anti-CD4 mAb that bind outside of the gp120-binding site on CD4 protect cells from apoptosis. In contrast, a large body of data is available concerning the inhibition of HIV-1 life cycle by anti-CD4 mAb. As a function of the recognized epitope, anti-CD4 mAb will inhibit (i) HIV-1 binding

(e.g.; anti-CD4 mAb specific for the CDR2-loop in domain 1 of CD4) (Dalglish et al., 1984; Klatzman et al., 1984); (ii) fusion, which is likely to require conformational changes in CD4 (Moore et al., 1992); (iii) viral transcription that is controlled by the state of activation of the infected cell (e.g.; anti-CD4 mAb specific for the CDR3-loop in domain 1 of CD4) (Benkirane et al., 1993, 1995a); or (iv) syncytia formation (e.g.; anti-CD4 mAb specific for the CDR2- or CDR3-loop in domain 1 of CD4) (Corbeau et al., 1993). These different effects can be explained by multiple functions of CD4: in addition to acting as a high affinity cell surface receptor for HIV-1 (which binds the CDR2-loop in domain 1 of CD4), it is involved in postbinding step(s) of the viral replication cycle (Benkirane et al., 1994) as well as in the signal transduction machinery of the cell (Rudd et al., 1988; Veillette et al., 1989). We have chosen to focus our attention on mAb specific for the CDR3-like region in D1 of CD4. We have previously shown that 13B8.2, a CDR3-like loop specific mAb, does not inhibit HIV-1 entry into CD4<sup>+</sup> T cells (Corbeau et al., 1993), but inhibits HIV-1 induced syncytia formation (Corbeau et al., 1993) and HIV-1 transcription in cells containing an integrated provirus(es) (Benkirane et al., 1993, 1995a). Now we have set out to test whether the 13B8.2 mAb, acting on HIV-1 gene expression (including env expression), gp120-CD4 binding during cell-to-cell transmission of HIV-1, and cell signaling, inhibits HIV-1 induced PCD.

We report that the CDR3-like loop specific anti-CD4 13B8.2 mAb protects infected cell culture against HIV-1 induced apoptosis whereas another anti-CD4 mAb does not.

## RESULTS

### **13B8.2 mAb treatment protects infected cell cultures against HIV-1 mediated cell death.**

The ability of two anti-CD4 mAb, 13B8.2 mAb (which binds to the Ig CDR3-like region of the D1 domain of the CD4 molecule) and BL4 mAb (which binds an epitope of the D1-D2 domains of CD4), to protect infected cell cultures against HIV-1 induced cell death was studied. CEM cells were exposed to HIV-1 at 1,000 X tissue culture infectious dose<sub>50</sub> (TCID<sub>50</sub>)/ml, and then cultured in either medium alone or medium supplemented with 13B8.2 mAb or with BL4 mAb. The percentage of dead cells in the culture was estimated by trypan blue exclusion while virus production was evaluated in cell-free culture supernatants by RT activity assay performed twice a week during two weeks and HIV-1-induced apoptosis was measured using specific cell staining with the DNA intercalant dye YOPRO-1. As shown in Figure 1, significant numbers of dead cells appeared in cultures about three days after virus production could be detected in culture supernatants of HIV-1 infected cells. The percentage of dead cells in cultures of cells grown in medium alone or in medium supplemented with the BL4 mAb reached a plateau of about 40% on day 6 and day 9 postinfection respectively. In contrast, the percentage of dead cells in cultures grown in the presence of 13B8-2 mAb was very low and indistinguishable from uninfected CEM cells over 14-days of culture. In agreement with data previously reported by our laboratory (Benkirane et al., 1993, 1995a), viral particles were detected in culture supernatants of HIV-1 infected cells grown in medium alone or in medium supplemented with the BL4 mAb, whereas a treatment with the 13B8.2 mAb prevented HIV-1 particles production (Fig. 1-B). Moreover, 13B8-2 mAb treatment did not decreased cell proliferation according to our biweekly total cell counts (data not shown; and our reference Péléraux et al., 1998).

Although 13B8.2 mAb treated cells were infected by HIV-1, as demonstrated by PCR analysis of HIV-1 DNA performed 24 hours after virus exposure (Fig. 1-C), 13B8.2 mAb mediated protection against HIV-1 induced cell death was observed during

the 14 days of culture. The percentage of apoptotic cells in HIV-1 infected cells cultured in medium alone or medium supplemented with anti-CD4 mAb was assessed by flow cytometry analysis on days 3, 7, and 14 postinfection. As shown in Figure 1-D, staining by the YOPRO-1 was observed in HIV-1 infected cells cultured in absence of mAb or in the presence of BL4 mAb at 7 days postinfection. After 14 days of culture most of the cells (72.6% in the culture maintained in medium alone and 51.8% for the culture performed in the presence of BL4) were stained by the YOPRO-1, indicating a major phenomenon of apoptotic cell death. In the uninfected control culture 16.4% of cells were stained by YOPRO-1, while under the same experimental conditions 26.2% of cells treated by 13B8.2 mAb were stained by the YOPRO-1. Thus, 13B8.2 mAb protects cells against HIV-1 induced apoptotic cell death. Similar results were obtained when 13B8-2 mAb was added to cultures of CEM cells 6 hours post-infection (Figure 2). Under these experimental conditions (in which the early stages of virus replication cycle have occurred), 13B8.2 mAb still protected infected cultures from HIV-1 induced apoptosis (5.7% of cells were stained with YOPRO-1 compared to 29.6% in the control culture). This effect was confirmed by fluorescence microscopy after Hoechst nuclear staining which allows observation of nucleus condensation and apoptotic bodies formation (C. G., unpublished observations).

Thus, there is no enhanced cell death in cell cultures treated by the Ig CDR3-like loop specific 13B8.2 mAb even though these cells are infected by HIV-1. In contrast, an anti-CD4 mAb directed against a different epitope does not protect cells against HIV-1 infection associated cell death. However, it should be pointed out that 24 hours after virus exposure the number of infected cells should be low (about 100 per  $5 \times 10^5$  cells) and virus spread in cell culture should be inhibited by 13B8-2 mAb, which is a known inhibitor of HIV-1 transcription (Benkirane et al., 1993), whereas virus spreading occurs in control cultures. Indeed, we have previously reported that the amount of viral DNA 7 days after virus exposure was lower in infected CD4 T-cells treated with 13B8-2 mAb than in infected control cell cultures (Briant et al., 1996a).

Altogether, these data indicate that apoptosis of HIV-1 infected cells is not observed when the cells are cultured in medium containing the Ig CDR3-like loop specific 13B8.2 mAb, but it is very likely that 13B8.2 mAb mediated inhibition of HIV-1 induced apoptosis results from inhibition of HIV-1 transcription leading to inhibition of virus spread.

### **Cell-surface expressed HIV-1 envelope glycoprotein induced apoptosis is inhibited by 13B8.2 mAb treatment.**

HIV-1-induced apoptosis is generally thought to require both viral replication and engagement of expressed gp120 with CD4 molecules (Laurent-Crawford, 1993; Corbeil and Richman, 1995). However, membrane expression of HIV envelope glycoproteins can also trigger apoptosis in CD4<sup>+</sup> cells (Maldarelli et al., 1995). Although the molecular mechanism by which cell-surface expressed gp120 triggers apoptosis in CD4<sup>+</sup> cells is not understood, we designed experiments aimed at reproducing this phenomenon and useful to test the ability of 13B8.2 mAb to inhibit this process.

We used control HEK 293 cells and HEK 293 cells transiently transfected by a vector pBRUΔgag which allows HIV-1<sub>LAI</sub> env gene expression in the absence of an HIV-1 infection (these cells are hereafter referred to as HEK 293 / gp120) to check whether cell-surface expressed HIV-1 envelope glycoprotein can trigger apoptosis in CD4 positive CEM cells during co-cultures. As shown in figure 3-A, HEK 293 cells transiently transfected with pBRUΔgag, but not the parental HEK 293 cells, were found to express gp120. As shown in figure 3-B, 31.3% of CEM cells undergo apoptosis in co-cultures with HEK 293 / gp120 cells whereas only 7.15% of CEM cells die in co-cultures with control HEK 293 cells, indicating that gp120 expressed at the surface of HEK 293 / gp120 cells triggers apoptosis. HEK 293 / gp120 cells-induced CEM apoptosis was inhibited by an anti-HIV-1 gp120 V3-loop specific antibody (C. G., unpublished observations).

Next, we investigated whether 13B8.2 mAb can inhibit cell-surface expressed HIV-1 envelope glycoprotein-induced apoptosis. The percentage of dead cells in untreated

co-cultures of HEK 293 / gp120 with CEM cells was much higher than in co-culture of cells maintained in medium containing 13B8.2 mAb (figure 3-C). Under the same experimental conditions, when the percentage of apoptotic CEM cells was evaluated by YOPRO-1 assay performed on non-adherent cells (figure 3-B), 13B8.2 mAb was found to inhibit CEM cells apoptosis (14.7% compared to 31.3% in the control sample). In contrast, neither BL4 anti-CD4 mAb (32.25% apoptosis) nor anti-CD45 mAb (33.5% apoptosis) inhibited HEK 293 / gp120-induced apoptosis of CEM cells.

Our data corroborate previous observations (Maldarelli et al., 1995) indicating that gp120 expressed at the surface of « stimulating cells » induce apoptosis in CD4<sup>+</sup> - « responding cells ». Since our experiments were performed in a model of uninfected cells (HEK 293 / gp120) which artificially express gp120, they strongly support the hypothesis of Corbeil and Richman (1995) that engagement of expressed gp120 with CD4 molecules contributes to complete the signalisation process in infected cells.

### **13B8.2 mAb treatment fails to prevent anti-Fas IgM-induced apoptosis or dexamethasone and serum withdrawal-induced apoptosis.**

Since 13B8.2 mAb acts on T cell activation via CD4 (Benkirane et al., 1993, 1995b; Lemasson et al., 1996), it was tempting to investigate whether it could inhibit signalling pathways which control apoptosis. Cell surface Fas (CD95) expression is strongly induced following HIV-1 infection (Badley et al., 1996), and increase in Fas expression is expected to modify the sensitivity of T cells for Fas-mediated apoptosis *ex vivo* (Katsikis et al., 1995) and to be related to disease progression and CD4<sup>+</sup> T cell depletion in HIV-1 infected patients (Boudet et al., 1996; Gehri et al., 1995). Therefore, we first focused our attention on the Fas pathway and investigated the ability of 13B8.2 mAb to modulate cell-surface expression of CD95. Consistent with data reported in the literature, we found a slight increase in Fas (UB2 epitope) expression 10 days after infection of cells by HIV-1 whereas 13B8.2 mAb treatment maintained surface expression of Fas at a level indistinguishable from the uninfected cells (C. G., unpublished observations).

Since 13B8.2 mAb inhibits HIV-1 induced upregulation of Fas, it seemed possible that this mAb might influence apoptosis induced through the Fas pathway. Therefore, we next examined the effect of 13B8.2 mAb treatment on CEM cells apoptosis triggered by anti-Fas IgM mAb. Cells were treated with the CH-11 anti-Fas IgM mAb, then cultured in medium alone or medium supplemented with 13B8.2 or BL4 anti-CD4 mAb, and stained by the YOPRO-1. As shown in Figure 4A, apoptosis was induced in cultures of cells treated with CH-11. In contrast, enhanced apoptosis was not observed with an isotype-matched control Ig, and was inhibited by ZB4, an antagonist anti-Fas IgG mAb, which competes with CH-11 for binding to Fas. Presence of 13B8.2 or BL4 anti-CD4 mAb in the culture medium had no significant effect on the observed percentage of apoptotic cells.

To verify that 13B8.2 mAb treatment had no general anti-apoptotic effect on the CEM cells, we examined the induction of apoptosis in CEM cells by dexamethasone and by serum withdrawal. Figure 4-B illustrates a representative experiment in which apoptosis was induced by dexamethasone. Neither 13B8.2 nor BL4 mAb had a significant effect on CEM cells apoptosis induced by dexamethasone. Similarly, apoptosis induced by serum withdrawal was not inhibited by either 13B8.2 or BL4 mAb treatment (data not shown).

Thus, Ig CDR3-like loop specific 13B8.2 mAb inhibits HIV-1 induced Fas antigen modulation (probably by inhibiting HIV-1 transcription), but does not inhibit apoptosis induced by anti-Fas IgM stimulation, dexamethasone or serum withdrawal.

## DISCUSSION

CD4<sup>+</sup> T cells undergo apoptosis when infected by HIV-1. The aim of the present study was to investigate whether anti-CD4 mAb can protect infected cell cultures against HIV-1-induced apoptosis. We show that treatment of cells with 13B8.2 (a mAb that binds to the CDR3-like loop in D1 of CD4) within the first 6 hours post infection, protects the CD4<sup>+</sup> lymphoblastoid CEM cells against HIV-1 induced apoptosis. Moreover, cell-surface expressed HIV-1 envelope glycoprotein-induced apoptosis was also inhibited by 13B8.2 mAb treatment. In contrast, BL4 (another anti-CD4 mAb that binds D1-D2) fails to protect cells against HIV-1 induced-, and cell-surface expressed HIV-1 envelope glycoprotein induced-, PCD.

Several viruses, including retroviruses such as human T-cell leukemia virus type I, counter PCD mechanisms by encoding proteins that inhibit the cellular apoptotic machinery (Levine et al., 1993; Henderson et al., 1993; Chiou et al., 1994; Yamada et al., 1994; Gillet et al., 1995; Afonso et al., 1996). In contrast, HIV-1 is an example of virus causing a drastic cell depletion by apoptosis (Li et al., 1995; Purvis et al., 1995; Westendorp 1995). As expected, we found here that HIV-1 infection induces a dramatic PCD in infected cultures. It is worth noting that virus production begins three days before significant PCD could be detected in the culture. It is generally admitted that HIV-1 induces the activation signal in CD4<sup>+</sup> cells (Benkirane et al., 1994; Merzouki et al., 1995; Briant et al., 1996). Uncontrolled and chronic immune activation triggered by HIV-1 is probably the primary mechanism responsible for the collapse of the immune system observed in AIDS. It should involve transcription factors stimulating cell activation and virus replication but also triggering activation-induced apoptosis. Probably, the kinetic of events controlled by the molecular crosstalk between the virus and the host cell should favor the virus replication first, whereas HIV-1 induced PCD should occur at a second stage once the virus replicative cycle (at the level of a single cell) is completed. It is worth noting that PCD can be induced by HIV-1 in cells expressing a truncated forms of CD4 that lack the cytoplasmic domain (Guillerm et al., 1998).

It has been reported that several anti-CD4 mAb (OKT4A and Leu3a, which block gp120 binding to CD4 and inhibit syncytia formation, and OKT4 which demonstrates no ability to inhibit gp120-CD4 interactions), prevent HIV-1 induced PCD when added to the cell culture medium post infection (Laurent-Crawford et al., 1993; Hovanessian, 1994; Corbeil et Richman, 1995). However, the mechanism by which these mAb inhibit PCD remains largely unknown. The possibility of rescuing HIV-1-infected cells from PCD by two other anti-CD4 mAb 13B8.2 and BL4 as well as the possible mechanisms controlling resistance to PCD were investigated in this paper. We found that a treatment of infected cells with 13B8.2, protects the CD4<sup>+</sup> lymphoblastoid CEM cells against HIV-1 induced apoptosis, whereas BL4 shows no such protective effect. We have then investigated the mechanisms by which the 13B8.2 mAb protects infected cell cultures from HIV-1 induced apoptosis. One could hypothesize that 13B8.2 inhibits HIV-1 induced PCD by: (i) inhibiting virus gene expression; (ii) preventing viral envelope-CD4 interaction; and/or (iii) interfering with apoptotic signals.

Firstly, we investigated whether 13B8.2 mAb protects infected cells from HIV-1 induced PCD and whether protection results from inhibition of virus gene expression. Indeed, virus gene expression requires cell activation and nuclear translocation of cellular transcription factors acting on the viral promoter. The association of cell activation with apoptosis has been reported in several viral infections. Recently, it has been reported that increased susceptibility to apoptosis of peripheral lymphocytes from HIV-infected person correlates with an activated phenotype (CD4<sup>+</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, CD38<sup>+</sup>, CD45RO<sup>+</sup>, Fas<sup>+</sup>) (Gougeon et al., 1996). In agreement with work previously published in the literature (Benkirane et al., 1994; Borvak et al., 1995; Chirmule et al., 1995; Merzouki et al., 1995; Schmid-Antomarchi et al., 1996), we have recently demonstrated that binding of uninfected HIV-1 (inactivated by heating at 56°C) or gp120-anti-gp120 immune complexes to CD4 molecules of infected resting PBMCs was sufficient to activate NF-κB and AP-1 DNA-binding proteins, to induce a transition from the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> to S/G<sub>2</sub>/M stages of the cell cycle, to trigger the cell-surface expression of the CD25 activation marker, to stimulate provirus integration and commit cells to virus production (Briant et al., 1996b).

We have also previously shown that 13B8.2 mAb blocks activation of MAP kinase (Benkirane et al., 1995b) and NF- $\kappa$ B (Lemasson et al., 1996) induced by HIV-1 binding to CD4, and inhibits HIV-1 transcription (Benkirane et al., 1993; Benkirane et al., 1995a; Benkirane et al., 1995b; Lemasson et al., 1996; Coudronnière et al., 1998). Therefore, the mechanism of action of 13B8.2 mAb could likely correspond to the inhibition of nuclear translocation of NF- $\kappa$ B and the ensuing lack of HIV-1 promoter activation. In our experiments, inhibition of virus gene expression probably account for an inhibition of virus spread to uninfected cells and apoptosis is not induced in the presence of 13B8.2 mAb as the majority of cells are not infected.

Secondly, we studied whether 13B8.2 mAb, which is known to inhibit HIV-1-mediated syncytia formation (Corbeau et al., 1993), blocks HIV-1 induced apoptosis by preventing viral envelope (expressed at the cell surface) to interact with CD4. We found that HEK 293 cells expressing the HIV-1 envelope glycoprotein trigger CEM cells apoptosis during co-culture experiments. Moreover, we demonstrated that 13B8.2 mAb inhibited apoptosis of CEM cells co-cultured with HEK 293 / gp120 cells. This result supports the hypothesis that a direct contact between cell surface gp120 and CD4 positive cells initiate PCD in the CD4 positive population. This hypothesis could explain why anti-CD4 mAb OKT4A and Leu3a prevent HIV-1 induced PCD when added to the cell culture medium post infection (Hovanessian, 1994; Corbeil and Richman, 1995); although these mAb do not act on HIV-1 transcription, they block gp120 binding to CD4. It is worth noting that, in contrast to the results obtained using cell surface expressed gp120, we have not observed induction of PCD by incubating CD4<sup>+</sup> target cells with high concentrations of heat inactivated HIV-1 (data not shown). This result suggests that there is a specific requirement for cell surface expression of gp120 in HIV-1 induced PCD.

Thirdly, interference with apoptotic signals was analyzed. Survival signals provided by the cell surface proteins CD2 and CD28 have already been reported to rescue CD4<sup>+</sup> T cells from HIV-gp120-induced apoptosis (Tuosto et al., 1995). Since we have previously shown that 13B8.2 mAb acts on T cell signalling (Benkirane et al., 1995b; Lemasson et al., 1996; Coudronnière et al., 1998), the possibility that 13B8.2-mediated

protection of cells against HIV-1 induced PCD involves a complex mechanism of cell signals preventing apoptosis had to be considered. We found that 13B8.2 mAb does not inhibit anti-Fas IgM mAb-, dexamethasone-, or serum withdrawal-, induced apoptosis, suggesting that the effect observed is restricted to HIV-1-induced cell death.

In conclusion, we have shown here that 13B8.2 mAb treatment protects infected cell cultures against HIV-1 induced apoptosis. We found that 13B8.2 mAb mediated protection against HIV-1-induced PCD parallels inhibition of HIV-1 transcription and virus replication suggesting that these events are strongly linked. Moreover, 13B8.2 mAb also acts on PCD of CD4<sup>+</sup> cells induced by interaction with cell surface expressed gp120. Altogether, our results indicate that 13B8.2 mAb treatment inhibits two major steps of HIV-1 replicative cycle which contribute to induce apoptosis.

## MATERIALS AND METHODS

### Monoclonal antibody and reagents.

Purified anti-CD4 IOT4A/13B8.2 Ig G1 mAb and IOT4/BL4 IgG2a mAb were prepared by Immunotech-Coulter (Marseille, France). Characterization of these anti-CD4 was reported previously (Corbeau et al., 1993; Benkirane et al., 1993, 1995a). Anti-Fas (CH-11) IgM mAb, anti-Fas (ZB4) IgG mAb, and FITC-labeled F(ab')<sub>2</sub> goat anti mouse (GAM) Ig reagent were purchased from Immunotech. Anti-gp120 (110.4) mAb was provided by Genetic Systems (Seattle, WA). Anti-CD45 (9.4) mAb was provided by the American tissue culture collection (ATCC; Bethesda, MD). DNA intercalant dye YO-PRO-1 was purchased from Molecular probes (Eugene, OR).

### Cells and viruses.

The CD4<sup>+</sup> lymphoblastoid CEM cell line was obtained from the ATCC. Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 1% penicillin streptomycin antibiotic mixture, 1% glutamax (Life Technologies, Eragny, France) and 10% FCS (Life Technologies), to a density of  $5 \times 10^5$  cells/ml in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The human embryonic kidney HEK 293 cell line was provided by P. Boulanger (Institut de Biologie, Montpellier). HEK 293 / gp120 cells were obtained by transient transfection of HEK 293 cells (using the calcium phosphate coprecipitation method) with the HIV-1 defective pBRUΔgag construct which allows HIV-1 env gene expression. pBRUΔgag derives from pBRU3 vector (an HIV-1<sub>LAI</sub> expression vector) kindly provided by L. Montagnier (Institut Pasteur, Paris) in which the PstI-ApaI gag sequence was deleted. Viral stocks (HIV-1<sub>LAI</sub>) were prepared from chronically infected CEM cell supernatants, as previously described (Corbeau et al., 1990).

### Assay for HIV-1 infection.

Cells ( $5 \times 10^5$ ) were incubated for 30 min at 4°C in flat bottom, 96-microwell plates (Costar, Badhoevedorp, the Netherlands) with 100 μl of HIV-1 at a concentration of

1,000 x TCID<sub>50</sub> per ml. Thereafter, cells were washed five times and cultured in 24-microwell plates (Costar). The amount of HIV-1 produced by CEM cells was monitored twice a week by measuring RT activity in 1ml of cell free culture supernatant using a synthetic template primer, as previously described (Corbeau et al., 1990).

**Polymerase chain reaction (PCR) assays.** HIV-1-DNA was monitored by PCR according to the previously described procedure (Benkirane et al., 1993). Briefly, total DNA was extracted from  $1 \times 10^6$  cells by alkaline lysis and resuspended into 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. The amplification mixture: 20mM Tris-HCl pH 8.3 containing 120  $\mu$ M dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCl, 0.005% Tween 20, 0.005% NP40, 0.001% gelatin, 20 pmole of each of the oligonucleotide primers M667 and GAG2 (Benkirane et al., 1993) and 2U of Taq DNA polymerase was added to DNA. The amplification reaction was run in a PHC2 thermal cycler (Techne, Cambridge, UK). The amplified products (674 base-pair fragments) were analysed by electrophoresis in a 1% agarose gel, blotted for 2 h onto Hybond N<sup>+</sup> membrane (Amersham), and hybridized with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]- labeled HIV-1 probe. Labeled viral DNA products were visualized by autoradiography.

### **Flow cytometry**

Cells ( $1 \times 10^6$ ) were incubated for 60 min at 4°C with saturating concentrations of anti-gp120 mAb or medium alone. After washing three times with PBS containing 0,2% BSA, bound mAb was detected by addition of 50  $\mu$ l of a 1/50 dilution of fluoresceinated goat-anti-mouse Ig (GAM) (Immunotech). After 60 min of staining, cells were washed with PBS-BSA and fluorescence intensity was measured on a EPICS XL4C cytofluorometer (Coulter, Coultronics, Margency, France). The percentage of apoptotic cells was also assessed by flow cytometry analysis using the impermeant DNA intercalant YOPRO-1 (10mM) (EX max/EM max (nm)= 491/509) as described (Idziorek et al., 1995).

**Assays for apoptosis induced by membrane expressed gp120.**

HEK 293 cells and HEK 293 cells transiently transfected by a vector pBRU $\Delta$ gag (referred to as HEK 293 / gp120 cells) were mixed with CD4<sup>+</sup> CEM cells (at a ratio of  $3 \times 10^6$  HEK 293 / gp120 cells for  $1 \times 10^6$  CEM cells) and incubated at 37°C for 2 to 3-days either in medium alone or medium containing antibodies at saturating concentrations for the corresponding antigen (CD4, CD45). After incubation, the non-adherent CEM cells were harvested. The absence of contaminating HEK 293 cells was controlled by FACS analysis using cell-surface labelling of CD45 antigen on harvested cells (in each experiment more than 99 % cells were CEM). The percentage of apoptotic cells was measured by flow cytometry analysis using YOPRO-1.

**ACKNOWLEDGMENTS.**

We thank Patrice Lassus (IGMM, Montpellier) for helpful discussions, and Pierre Corbeau (CRBM, Montpellier) for critical reading of the manuscript.

## REFERENCES

- Afonso, C. L., Neilan, J. G., Kutish, G. F., and Rock, D. L. (1996). An african swine fever virus bcl-2 homolog, 5-HL, supresses apoptotic cell death. *J. Virol.* **70**, 4858-4863.
- Ameisen, J. C. (1994). Programmed cell death (apoptosis) and cell survival regulation: relevance to AIDS and cancer. *AIDS* **8**, 1197-1213.
- Ameisen, J.-C., and Capron, A. (1991). Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today* **12**, 102-105.
- Badley, A. D., McElhinny, J. A., Leibson, P. J., Lynch, D. H., Alderson, M. R., and Paya, C. V. (1996). Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J. Virol.* **70**, 199-206.
- Benkirane, M., Corbeau, P., Housset, V., and Devaux, C. (1993). An antibody that binds the immunoglobulin CDR3-like region of the CD4 molecule inhibits provirus transcription in HIV-infected T cells. *EMBO J.* **12**, 4909-4921.
- Benkirane, M., Hirn, M., Carrière, D., and Devaux, C. (1995). Functional epitope analysis of the human CD4 molecule: antibodies that inhibit human immunodeficiency virus type 1 gene expression bind to the Ig CDR3-like region of CD4. *J. Virol.* **69**, 6898-6903.
- Benkirane, M., Jeang, K.-T., and Devaux, C. (1994). The cytoplasmic domain of CD4 plays a critical role during the early stages of HIV infection in T-cells. *EMBO J.* **13**, 5559-5569.
- Benkirane, M., Schmid-Antomarchi, H., Littman, D. R., Hirn, M., Rossi, B., and Devaux, C. (1995). The cytoplasmic tail of the CD4 molecule is required for inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by antibodies that bind the CDR3-like region of the D1 domain of CD4. *J. Virol.* **69**, 6904-6910.

- Borvak, J., Chou, C. S., Bell, K., Van Dyke, G., Zola, H., Ramilo, O., and Vitetta, E. S. (1995). Expression of CD25 defines peripheral blood mononuclear cells with productive versus latent HIV infection. *J. Immunol.* **155**, 3196-3204.
- Briant, L., Benkirane, M., Girard, M., Hirn, M., Iosef, C., and Devaux, C. (1996a). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 production in infected peripheral blood mononuclear cells by human leukocyte antigen class I-specific antibodies: Evidence for a novel antiviral mechanism. *J. Virol.* **70**, 5213-5220.
- Briant, L., Coudronnière, N., Robert-Hebmann, V., Benkirane, M., and Devaux, C. (1996b). Binding of HIV-1 virions or gp120-anti-gp120 immune complexes to HIV-1-infected quiescent peripheral blood mononuclear cells reveals latent infection. *J. Immunol.* **156**, 3994-4004.
- Chiou, S.-K., Tseng, C. C., Rao, L., and White, E. (1994). Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells. *J. Virol.* **68**, 6553-6566.
- Chirmule, N., Goonewardena, H., Pahwa, S., Pasieka, R., Kalyanaraman, V. S., and Pahwa, S. (1995). HIV-1 envelope glycoproteins induce activation of activated protein-1 in CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 19364-19369.
- Corbeau, P., Benkirane, M., Weil, R., David, C., Emiliani, S., Olive, D., Mawas, C., Serre, A., and Devaux, C. (1993). Ig CDR3-like region of the CD4 molecule is involved in HIV-induced syncytia formation but not in viral entry. *J. Immunol.* **150**, 290-301.
- Corbeau, P., Devaux, C., Kourilsky, F., and Chermann, J.-C. (1990). An early post-infection signal mediated by monoclonal anti- $\beta$ 2 microglobulin antibody is responsible for delayed production of human immunodeficiency virus type 1 in activated peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol.* **64**, 1459-1464.
- Corbeil, J., and Richman, D. D. (1995). Productive infection and subsequent interaction of CD4-gp120 at the cellular membrane is required for HIV-induced apoptosis of CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Gen. Virol.* **76**, 681-690.

- Coudronnière, N., Corbeil, J., Robert-Hebmann, V., Mesnard, J.-M., and Devaux, C. (1998). The lck protein tyrosine kinase is not involved in antibody-mediated CD4 (CDR3-loop) signal transduction that inhibit HIV-1 transcription. *Eur. J. Immunol.* **28**, in press.
- Dalglish, A. G., Beverley, P. C. L., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., and Weiss, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763-767.
- Gehri, R., Hahn, S., Rothen, M., Steuerwald, M., Nuesch, R., and Erb, P. (1995). The Fas receptor in HIV infection: expression on peripheral blood lymphocytes and role in the depletion of T cells. *AIDS* **10**, 9-16.
- Gillet, G., Guerin, M., Trembleau, A., and Brun, G. (1995). A bcl-2-related gene is activated in avian cells transformed by the rous sarcoma virus. *EMBO J.* **14**, 1372-1381.
- Gougeon, M.-L., Lecoœur, H., Dulioust, A., Enouf, M.-G., Crouvoisier, M., Goujard, C., Debord, T., and Montagnier, L. (1996). Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons. *J. Immunol.* **156**, 3509-3520.
- Guillerm, C., Coudronnière, N., Robert-Hebmann, V., and Devaux, C. (1998). Delayed human immunodeficiency virus type 1-induced apoptosis in cells expressing truncated forms of CD4. *J. Virol.* **72**, 1754-1761.
- Henderson, S., Huen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G., and Rickinson, A. (1993). Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8479-8483.
- Hovanessian A. G. (1994). Apoptosis in HIV infection: the role of extracellular and transmembrane glycoproteins, p. 21-42. *In Apoptosis II: The molecular basis of apoptosis in disease.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Idziorek, T., Estaquier, J., de Bels, F., and Ameisen, J.-C. (1995). YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of apoptosis without interfering with cell viability. *J. Immunol. Meth.* **185**, 249-258.

- Kameoka, M., Kimura, T., Zhong, Q., Zheng, Y.-H., Luftig, R. B., and Ikuta, K. (1996). Induction of apoptosis by protease-defective particle preparations of human immunodeficiency virus type 1 is specific to a subset of U937-derived subclones. *Int. Immunol.* **8**, 1687-1697.
- Katsikis, P. D., Wunderlich, E. S., Smith, C. A., Herzenberg, L. A., and Herzenberg, L. A. (1995). Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J. Exp. Med.* **181**, 2029-2036.
- Klatzman, D., Barré-Sinoussi, F., Nugeyre, M.-T., Dauget, C., Vilmer, E., Gricelli, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux, C., Gluckman, J.-C., Cherman, J.-C., and Montagnier, L. (1984). Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science* **225**, 59-63.
- Laurent-Crawford, A. G., Krust, B., Muller, S., Rivière, Y., Rey, M.-A., Bechet, J.-M., Montagnier, L., and Hovanessian, A. G. (1991). The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology* **185**, 829-839.
- Laurent-Crawford, A. G., Krust, B., Rivière, Y., Desgranges, C., Muller, S., Kieny, M.-P., Dauget, C., and Hovanessian, A. G. (1993). Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **9**, 761-773.
- Lemasson, I., Briant, L., Hague, B., Coudronnière, N., Héron, L., David, C., Rebouissou, C., Kindt, T., and Devaux, C. (1996). An antibody that binds domain 1 of CD4 inhibits replication of HIV-1 but not HTLV-I-transformed cell line. *J. Immunol.* **156**, 859-865.
- Levine, B., Huang, Q., Isaacs, J. T., Reed, J. C., Griffin, D. E., and Hardwick, J. M. (1993). Conversion of lytic to persistent alphavirus infection by the bcl-2 cellular oncogene. *Nature* **361**, 739-742.
- Li, C. J., Friedman, D. J., Wang, C., Metelev, V., and Pardee, A. B. (1995). Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 tat protein. *Science* **268**, 429-431.

- Maldarelli, F., Sato, H., Berthold, E., Orenstein, J., and Martin, M. A. (1995). Rapid induction of apoptosis by cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **69**, 6457-6465.
- Merzouki, A., Patel, P., Cassol, S., Ennaji, M., Tailor, P., Turcotte, F. R., O'Shaughnessy, M., and Arella, M. (1995). HIV-1 gp120/160 expressing cells upregulate HIV-1 LTR directed gene expression in a cell line transfected with HIV-1 LTR-reporter gene constructs. *Cell Mol. Biol.* **41**, 445-452.
- Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Klasse, P. J., and Burkly, L. C. (1992). A monoclonal antibody to CD4 domain 2 blocks soluble CD4-induced conformational changes in the envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-1 infection of CD4<sup>+</sup> cells. *J. Virol.* **66**, 4784-4793.
- Péléraux, A., Peyron, J.-F., and Devaux, C. (1998). Inhibition of HIV-1 replication by a monoclonal antibody directed toward the complementarity determining region 3-like domain of CD4 in CD45 expressing and CD45-deficient cells. *Virology* **240**, in press.
- Purvis, S. F., Jacobberger, J. W., Sramkoski, M., Patki, A. H. and Lederman, M. M. (1995). HIV type 1 Tat protein induces apoptosis and death in Jurkat cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**, 443-450.
- Rosenberg, Z. F., and Fauci, A. S. (1991). Immunopathogenesis of HIV infection. *FASEB J.* **5**, 2382-2390.
- Rudd, C. E., Trevillyan, J. M., Dasgupta, J. D., Wong, L. L. and Schlossman, S. F. (1988). The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase from human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**, 5190-5194.
- Schmid-Antomarchi, H., Benkirane, M., Breittmayer, V., Husson, H., Ticchioni, M., Devaux, C., and Rossi, B. (1996). HIV induces activation of Phosphatidylinositol 4-kinase and mitogen-activated protein kinase by interacting with T cell CD4 surface molecules. *Eur. J. Immunol.* **26**, 717-720.
- Shen, Y., and Shenk, T. E. (1995). Viruses and apoptosis. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **5**, 105-111.

- Terai, C., Kornbluth, R. S., Pauza, C. D., Richman, D. D., and Carson, D. A. (1991). Apoptosis as a mechanism of cell death in cultured T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J. Clin. Invest.* **87**, 1710-1715.
- Tuosto, L., Piazza, C., Moretti, S., Modesti, A., Greenlaw, R., Lechler, R., Lombardi, G., and Piccolella, E. (1995). Ligation of either CD2 or CD28 rescues CD4<sup>+</sup> T cells from HIV-gp120-induced apoptosis. *Eur. J. Immunol.* **25**, 2917-2922.
- Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., Samelson, L. E., and Bolen, J. B. (1989). Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56<sup>lck</sup>. *Nature* **338**, 257-259.
- Westendorp, M. O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K.-M., and Krammer, P. H. (1995). Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* **375**, 497-500.
- Yamada, T., Yamaoka, S., Goto, T., Nakai, M., Tsujimoto, Y., and Hatanaka, M. (1994). The human T-cell leukemia virus type I Tax protein induces apoptosis which is blocked by the bcl-2 protein. *J. Virol.* **68**, 3374-3379.

### Figure legends

Figure 1: Effect of anti-CD4 mAb treatment on cell viability and virus production in HIV-1 infected cell cultures. Cells were exposed to 100  $\mu$ l of virus suspension containing 1000 x TCID<sub>50</sub>/ml of HIV-1<sub>LAI</sub>, washed and cultured in medium alone (◆) or in medium supplemented with anti-CD4 mAb 13B8.2 (▲), or anti-CD4 mAb BL4 (●), at a concentration fourfold greater than necessary for saturation of cell surface antigens (see Materials and Methods section). Uninfected cells are shown as control (□). (A) Viability was evaluated by trypan blue exclusion. (B) Viral production was monitored by measuring RT activity. Representative experiment out of four is shown. (C) HIV-1 DNA was monitored by PCR analysis (M667/GAG2 oligonucleotide primer pair) performed on total DNA extracted from CEM cells infected with HIV-1 (lane 2), or CEM cells infected with HIV-1 and treated with anti-CD4 mAb 13B8.2 (lane 3) or BL4 (lane 4), 24 h after virus exposure. Lane 1 represents virus-free CEM cells. Products of PCR amplification using  $\beta$  globinI/ $\beta$  globinII oligonucleotide primer pair hybridized to an  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-labeled  $\beta$  globin probe are shown as control. (D) The percentage of apoptotic cells in cell cultures was monitored at day 3, day 7, and day 14 of culture by flow cytometry analysis using the impermeant DNA intercalant YOPRO-1.

Figure 2: Effect of 13B8.2 mAb-treatment on HIV-1 induced apoptosis. Cells exposed to HIV-1<sub>LAI</sub> (see legend of Fig. 1 for details), were cultured in medium alone (CEM-HIV) or in medium supplemented with anti-CD4 mAb 13B8.2 immediately after virus exposure (CEM-HIV+13B8.2), or 6 hours after virus exposure (CEM-HIV+13B8.2 6 after infection). The percentage of apoptotic cells in cell cultures was assessed at day 9 of culture by flow cytometry analysis using YOPRO-1.

Figure 3: Effect of co-culture between HIV-1 env expressing cells and CEM cells on apoptosis of CEM cells. (A) Expression of HIV-1 envelope glycoprotein at the surface of HEK 293 / gp120 cells was assessed by indirect flow cytometry analysis using the anti-gp120 mAb 110.4 and a fluoresceinated GAM probe. The reactivity with untransfected HEK 293 cells is shown as control. (B) HEK 293 or HEK 293 / gp120 cells were co-

cultured with CEM cells either in the absence of mAb (No), or in the presence of anti-CD4 mAb (13B8.2 and BL4) or anti-CD45 mAb (9.4). After 3-days incubation, the non-adherent CEM cells were harvested (the samples contained more than 99 % CD45 positive CEM cells) and the percentage of apoptotic CEM cells in culture was assessed by flow cytometry analysis using YOPRO-1. The results are shown as mean of triplicate assays (standard deviation is indicated). (C) Photomicrographs illustrating light microscope observations (enlargement of 400-fold for the upper panel and 200-fold for the lower panel) of HEK 293 / gp120 adherent cells co-cultured with non-adherent CEM cells for 3 days either in the absence of mAb (No additive) or in the presence of anti-CD4 mAb (13B8.2). Dead cells were visualized by trypan blue uptake. The difference of colour of the pictures (pink in the HIV-1 infected control cell culture, and yellow in 13B8.2 mAb treated culture) reflects the difference in pH of the culture medium which varies depending on cell proliferation and indicates that 13B8-2 mAb does not appear to have cytostatic effect).

Figure 4: Effect of anti-CD4 mAb-treatment on anti-Fas IgM- and dexamethasone-induced apoptosis. (A) Anti-Fas IgM-induced apoptosis. Cells were cultured in medium alone (no additive), or in medium supplemented with 1  $\mu$ g/ml anti-Fas IgM mAb (CH-11), or in medium supplemented with anti-Fas IgM mAb and anti-CD4 mAb (13B8.2 or BL4). The percentage of apoptotic cells in cultures was assessed by flow cytometry analysis using the impermeant DNA intercalant YOPRO-1 at 16 h of culture. Controls consisted of cells treated with ZB4, an antagonist anti-Fas IgM mAb, before anti-Fas IgM mAb treatment, and cells treated with an isotype-matched (IgM) mAb. (B) Dexamethasone ( $10^{-7}$ M)-induced apoptosis. Cells were cultured in medium alone (no additive), or in medium supplemented with dexamethasone, or in medium supplemented with dexamethasone and anti-CD4 mAb. The percentage of apoptotic cells in cell cultures was measured as in (A) at day 3 of culture.

(●)(■)(▼)(▲)(◆),(◇)(▽).(○)(□)



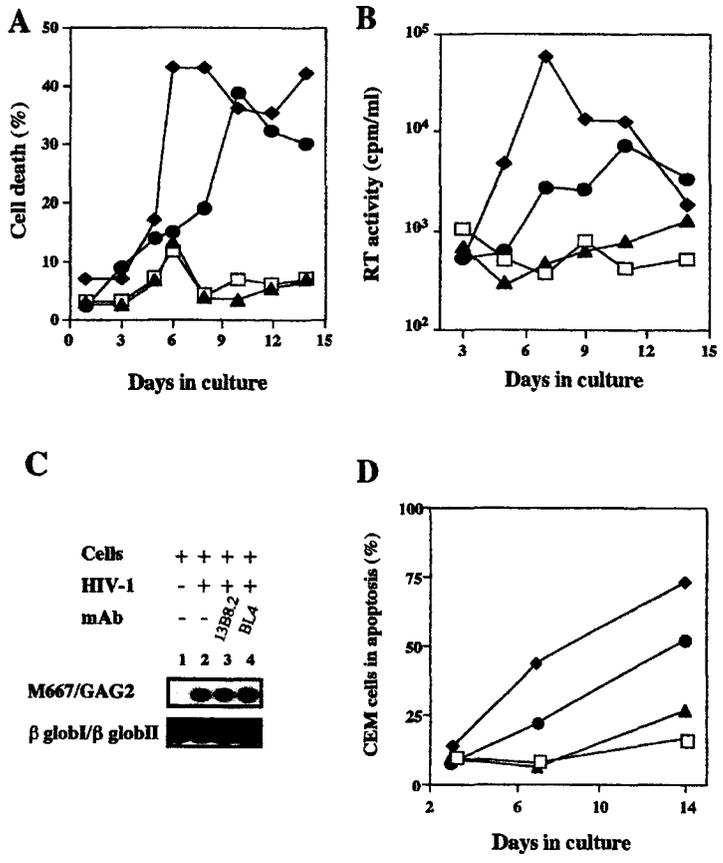
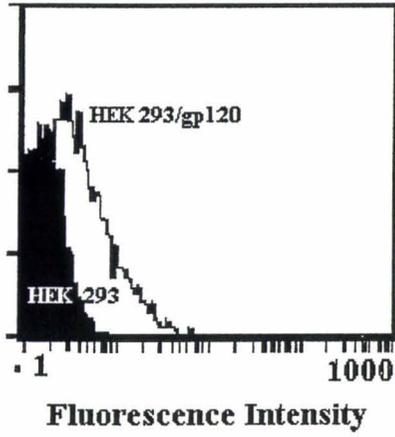


Fig: 1

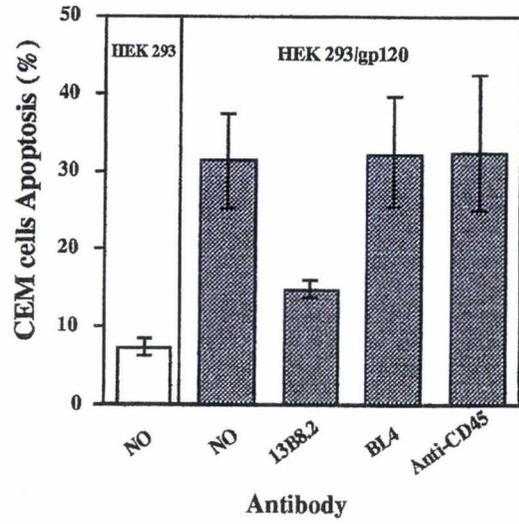
Fig: 3



A



B

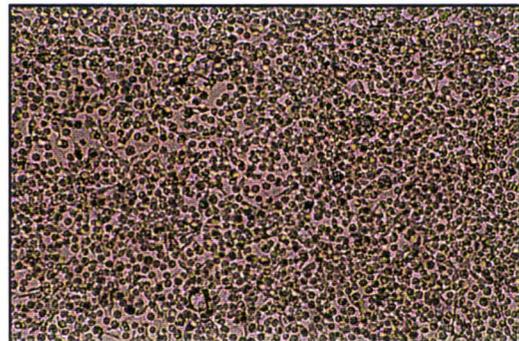
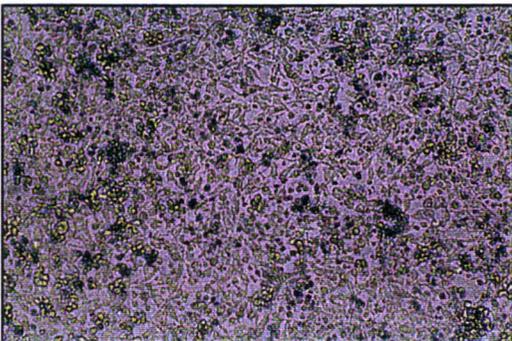
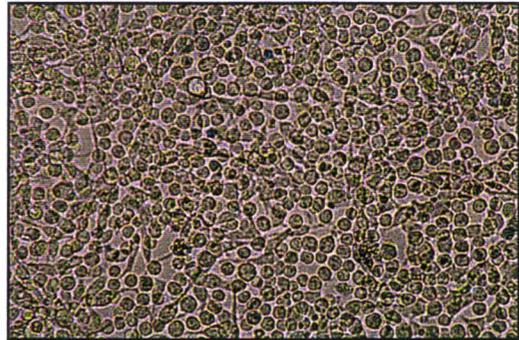
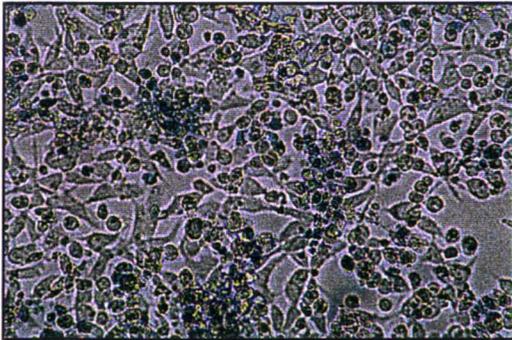


C

### HEK 293/gp120 + CEM

No additive

13B8.2



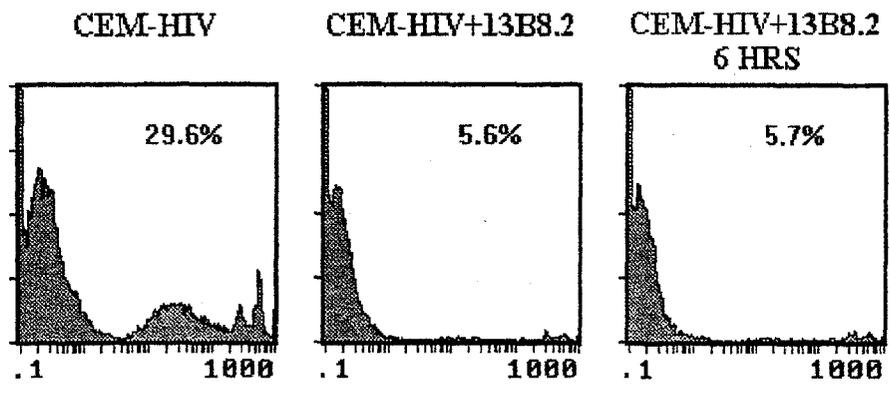


Fig: 2

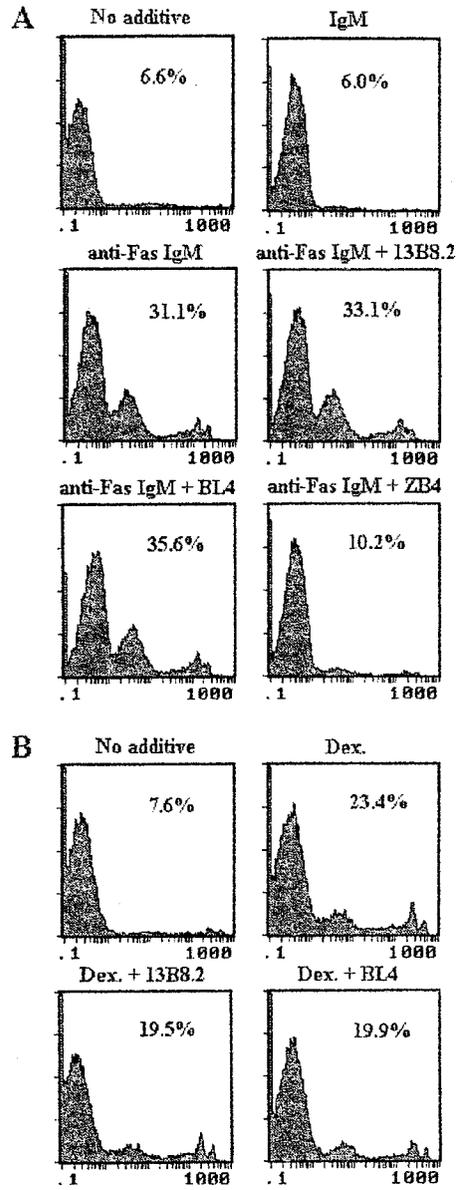
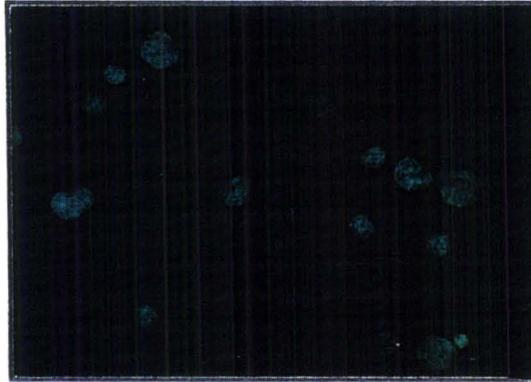
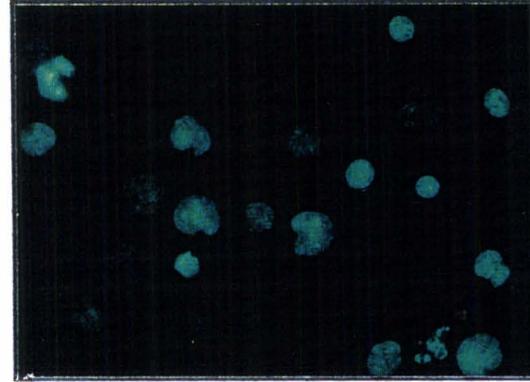


Fig: 4

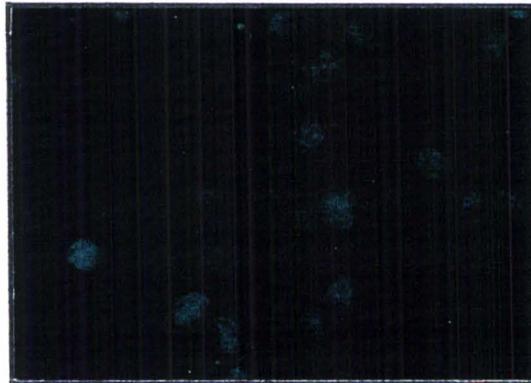
**CEM**



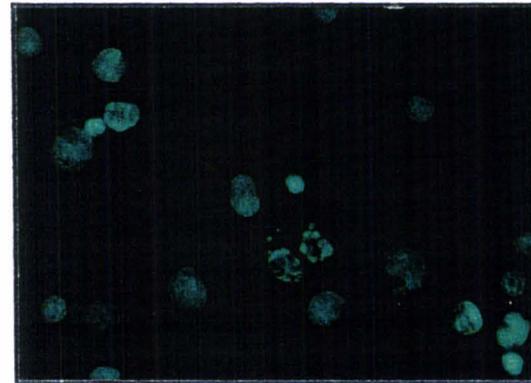
**CEM-HIV**



**CEM-HIV+13B8.2**



**CEM-HIV+BL4**



Détection de l'apoptose par marquage au Hoescht  
Observation au microscope à fluorescence.  
Contrairement aux cellules infectées, non traitées ou  
cultivées avec BL4, les cellules cultivées avec 13B8.2  
ne présente pas de cellules en apoptose.

## **C. Résultats-Discussions**

### **1. L'anticorps 13B8.2 inhibe l'apoptose induite par VIH**

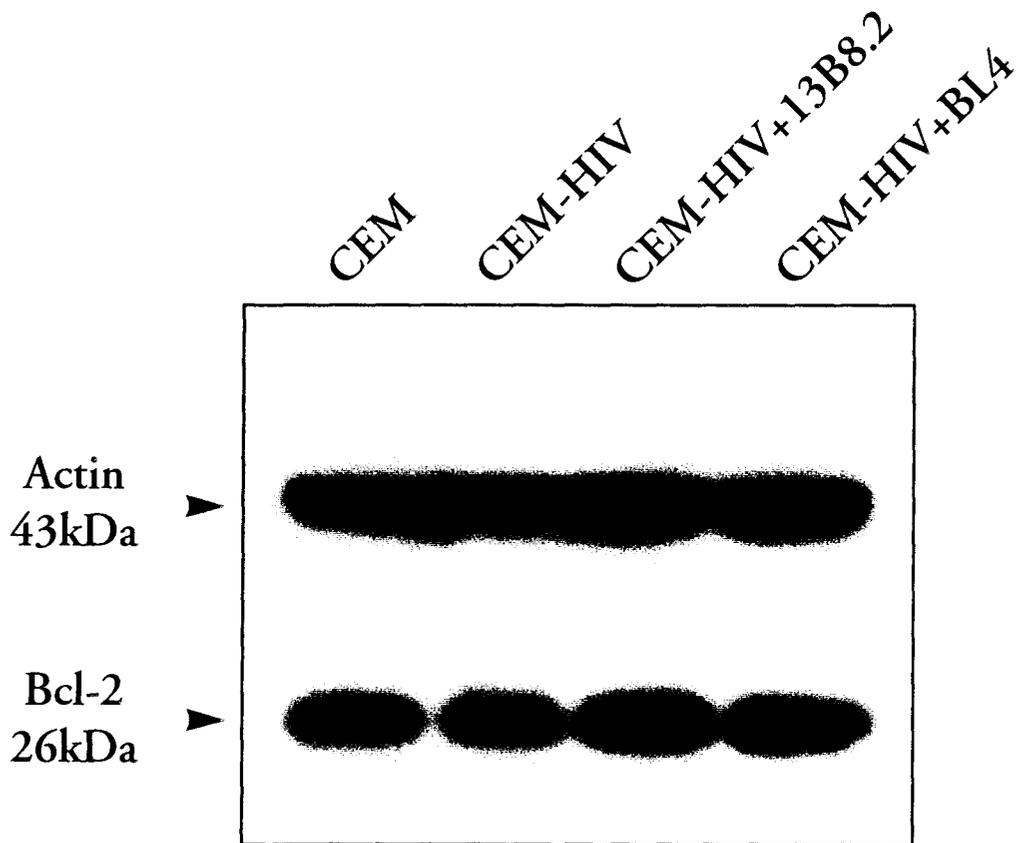
En résumé, ces travaux montrent que des cellules CEM infectées traitées par l'anticorps 13B8.2 sont protégées de l'apoptose induite par VIH, alors que les cellules traitées par l'anticorps BL4 ne le sont pas. De plus lorsque l'anticorps est ajouté 6 heures après l'infection, c'est à dire après les étapes précoces de la réplication virale, il protège toujours les cellules infectées de l'apoptose induite par VIH. Le marquage au YOPRO-1 démontant l'effet protecteur de l'anticorps 13B8.2 a été confirmé par un marquage au Hoescht présenté ci-contre. Les cellules dont le noyau est marqué sont les cellules en apoptose.

Cependant, il est important de préciser l'anticorps 13B8.2 est un inhibiteur de la transcription virale, de plus dans nos conditions d'infection, peu de cellules sont infectées, enfin s'il est vrai que le virus intégré est transmis lors de la division cellulaire, après 7 jours de culture les cellules infectées non traitées par l'anticorps 13B8.2 sont beaucoup plus nombreuses à porter le virus que les cellules traitées. Il est donc possible que l'anticorps 13B8.2 inhibe l'apoptose induite par VIH par inhibition de la transcription et la propagation virale.

### **2. L'anticorps 13B8.2 inhibe l'apoptose induite par l'enveloppe exprimée à la surface cellulaire**

Plusieurs auteurs ont suggéré que l'apoptose induite par VIH nécessite à la fois un cycle complet de réplication virale et l'expression de la gp120 à la surface membranaire (Corbeil and Richman, 1995; Laurent-Crawford et al., 1993). Dans le but de savoir si l'anticorps 13B8.2 peut bloquer l'apoptose induite par l'enveloppe virale, nous avons mis au point un système de co-culture de CEM avec des cellules adhérentes transfectées de façon transitoire avec un vecteur qui permet l'expression de la gp120 à la surface membranaire (HEK 293/ gp120). La proportion des cellules exprimant l'enveloppe est de 3 pour 1 cellule CEM, et les cellules sont gardées en culture ensemble durant 3 jours. Les CEM sont ensuite marquées au YOPRO-1 pour détecter l'apoptose. Les résultats présentés dans l'article montrent que l'anticorps 13B8.2 inhibe l'apoptose induite par l'enveloppe exprimée à la surface des cellules HEK.

**Fig: 4**



Analyse de l'expression de la protéine Bcl-2 par Western blot  
L'anticorps anti Bcl-2 (Ab-1) est fourni par Oncogene Science.  
L'anticorps anti-actine (C4) est fourni par ICN Biomedicals Inc.

Ces observations indiquent clairement que l'engagement de l'enveloppe virale joue un rôle prépondérant dans l'apoptose induite par VIH. D'autre part il est possible que la nécessité d'un cycle complet de réplication pour qu'il y ait induction d'apoptose, corresponde une nécessité de production de l'enveloppe.

### **3. Effet de l'anticorps 13B8.2 sur d'autres stimuli inducteurs d'apoptose.**

Comme il avait été préalablement décrit que 13B8.2 induit de forts signaux négatifs (Benkirane et al., 1995; Lemasson et al., 1996), la possibilité d'une interférence de cet anticorps avec des signaux apoptotiques a été étudiée.

Nos résultats démontrent que l'anticorps 13B8.2 n'inhibe pas:

- l'apoptose induite par la ligation de Fas
- l'apoptose induite par la dexaméthasone
- l'apoptose induite par la déprivation de sérum

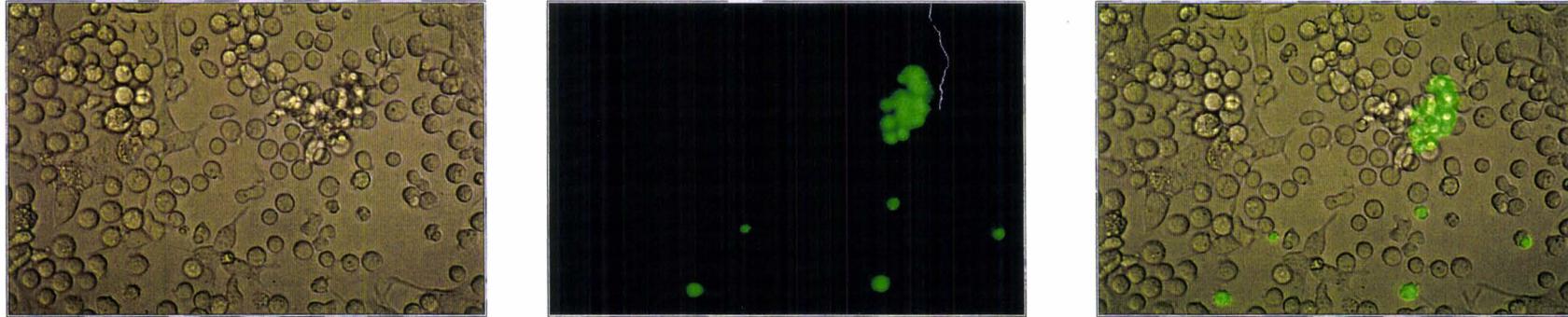
Par ailleurs, l'anticorps 13B8.2 n'a aucun effet sur l'expression de Bcl-2 (*cf figure 4*), une surexpression aurait, en effet, pu expliquer le mécanisme de protection de 13B8.2. Toutes les voies d'apoptose n'ont pas été explorées, et on ne peut pas exclure qu'une molécule de la famille de Bcl-2 ou d'une autre famille de gènes puisse être impliquée. Néanmoins, ces résultats indiquent que l'effet de l'anticorps 13B8.2 est restreint à l'apoptose induite par VIH.

### **4. remarques**

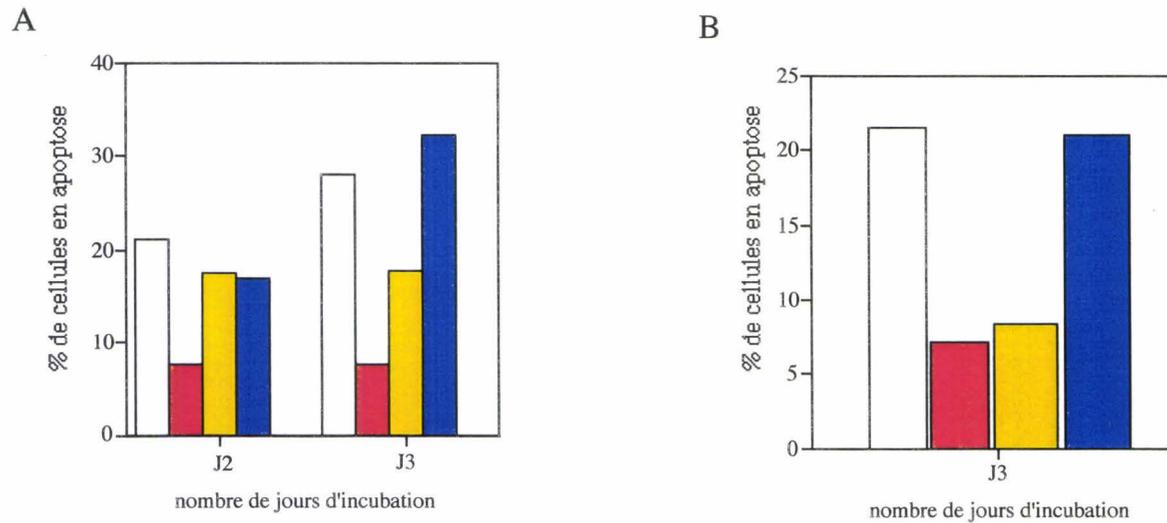
Par ailleurs ces résultats ne permettent pas de conclure quant au mode d'action de l'anticorps ou au mécanisme d'induction de l'apoptose par l'enveloppe.

En effet, le virus inactivé par la chaleur (qui ne se réplique pas mais se fixe à CD4), bien qu'il induise des signaux d'activation (Briant et al., 1996), n'induit pas l'apoptose. Ce qui semble indiquer que cette signalisation ne suffit pas (même si on ne peut exclure que ces signaux d'activation soient légèrement différents dans le cas de l'enveloppe exprimée à la surface cellulaire) pour induire l'apoptose. De fait, il est difficile de conclure que l'anticorps 13B8.2 interfère avec les signaux induits par les interactions gp120/CD4, dans le contexte particulier de la présentation de l'enveloppe à la surface membranaire.

Une modification de la structure de l'enveloppe due à l'expression à la surface membranaire pourrait expliquer un signal différent. Une autre notion à prendre en compte pourrait être la densité des molécules d'enveloppe sur les cellules par rapport aux cellules exprimant CD4. Le nombre de molécules de gp120 présentées pourraient être bien plus important que dans le cas d'une mise en contact avec du virus non concentré. En effet, d'autres expériences effectuées avec un pourcentage de cellules HEK 293/gp120 plus faible que pour les expériences présentées n'ont pas abouti à la mort des CEM.



## Coculture de cellules CEM avec HEK293/gp120 après 2 jours d'incubation Marquage au YOPRO-1



**Fig: 5**  
pourcentage de cellules en apoptose après coculture  
des cellules A2.01/CD4 401 (A) ou A2.01/CD4 403 (B) avec les  
cellules HEK 293/gp120.  
Les cellules sont cultivées sans ajout d'anticorps □ avec l'anticorps  
13B8.2 ■, avec l'anticorps BL4 ■, avec l'anticorps anti-CD45 ■.  
Le pourcentage de cellules en apoptose a été obtenu par mesure de  
la fluorescence du YOPRO-1 en cytométrie.

## **D. Résultats complémentaires**

Afin de comprendre si le signal transduit lors des expériences effectuées avec du virus inactivé joue un rôle dans l'apoptose induite par les cellules HEK 293/gp120, nous avons refait les mêmes expériences, dans les mêmes conditions, mais cette fois en utilisant les cellules A2.01/CD4 401 et A2.01/CD4 403 comme cellules cibles.

Les résultats présentés *figure n°5* montrent: d'une part une observation en microscopie à fluorescence de CEM en coculture avec des cellules HEK 293/gp120, d'autre part les pourcentages de cellules A2.01/CD4 401 et 403 en apoptose (mesurés en cytométrie après marquage au YOPRO-1) après 3 jours de coculture avec les cellules HEK 293/gp120. Ces cellules subissent donc l'apoptose après le même temps d'incubation que les CEM. Le retard observé lors de l'infection de ces cellules exprimant une forme tronquée de la molécule CD4 n'est pas observable dans ces conditions d'induction d'apoptose.

D'autre part le traitement avec l'anticorps 13B8.2 bloque l'apoptose de ces cellules exprimant une forme tronquée de la molécule CD4.

Plusieurs informations peuvent être déduites de ces résultats:

- l'apoptose induite par VIH nécessite spécifiquement l'expression de l'enveloppe à la surface cellulaire
- les signaux d'activation décrits tels que la translocation de NF $\kappa$ B, ou l'activation des MAP kinases agissent probablement sur l'état d'activation de la cellule et de ce fait sur le virus, s'il est intégré, mais ne sont pas nécessaires à l'induction de la mort par VIH

Corollaire:

- il est probable que l'enveloppe exprimée à la surface des cellules A2.01/CD4 401 et A2.01/CD4 403 soit responsable de l'apoptose induite par VIH.
- le domaine intracytoplasmique de la molécule CD4 permet donc la transduction de signaux qui accélèrent la cinétique du cycle viral, mais probablement pas l'apoptose.

## **E. Le paradoxe du mécanisme d'action de l'anticorps 13B8.2**

Des expériences effectuées sur les cellules A2.01/CD4 401 et A2.01 CD4 403 avaient montré que l'anticorps 13B8.2 ne bloque pas la réplication virale (Benkirane et al., 1995). Il en avait été déduit que cet anticorps nécessitait la partie intracytoplasmique de CD4 pour pouvoir inhiber la transcription virale. Compte tenu des résultats qui montrent que l'anticorps 13B8.2 bloque l'apoptose des cellules A2.01/CD4 401 et 403 dans le système de coculture avec les cellules HEK 293/gp120, il faut alors admettre que 13B8.2 bloque l'apoptose induite par la gp120 par un autre biais que dans le contexte d'une

infection. Ceci n'est d'ailleurs pas inconcevable, si on admet que la partie intracytoplasmique de la molécule CD4, ainsi que les interactions p56<sup>lck</sup>/CD4 ne sont pas nécessaires à l'induction d'apoptose.

Lors d'une infection, l'anticorps 13B8.2 bloque la transcription virale, et de ce fait l'apoptose induite par la gp120, et ce mécanisme nécessite que le virus entre dans la cellule par la molécule CD4.

Dans le système de coculture HEK 293/gp120- cellules CD4<sup>+</sup>, l'anticorps agirait par un autre biais, qui pourrait être un changement de conformation de la molécule CD4.

Cependant, après répétition des infections des cellules A2.01/CD4 401 et 403, traitées ou non avec 13B8.2, les résultats semblent moins clairs que ceux publiés au préalable. Il semble, en effet, qu'on puisse observer un blocage partiel, qui n'est pas systématique, de la réplication virale des cellules traitées par 13B8.2. Ce résultat suppose un mécanisme d'action d'inhibition de la réplication virale assez complexe, partiellement explicable par la transduction d'un signal par la partie cytoplasmique de CD4.

### **En résumé:**

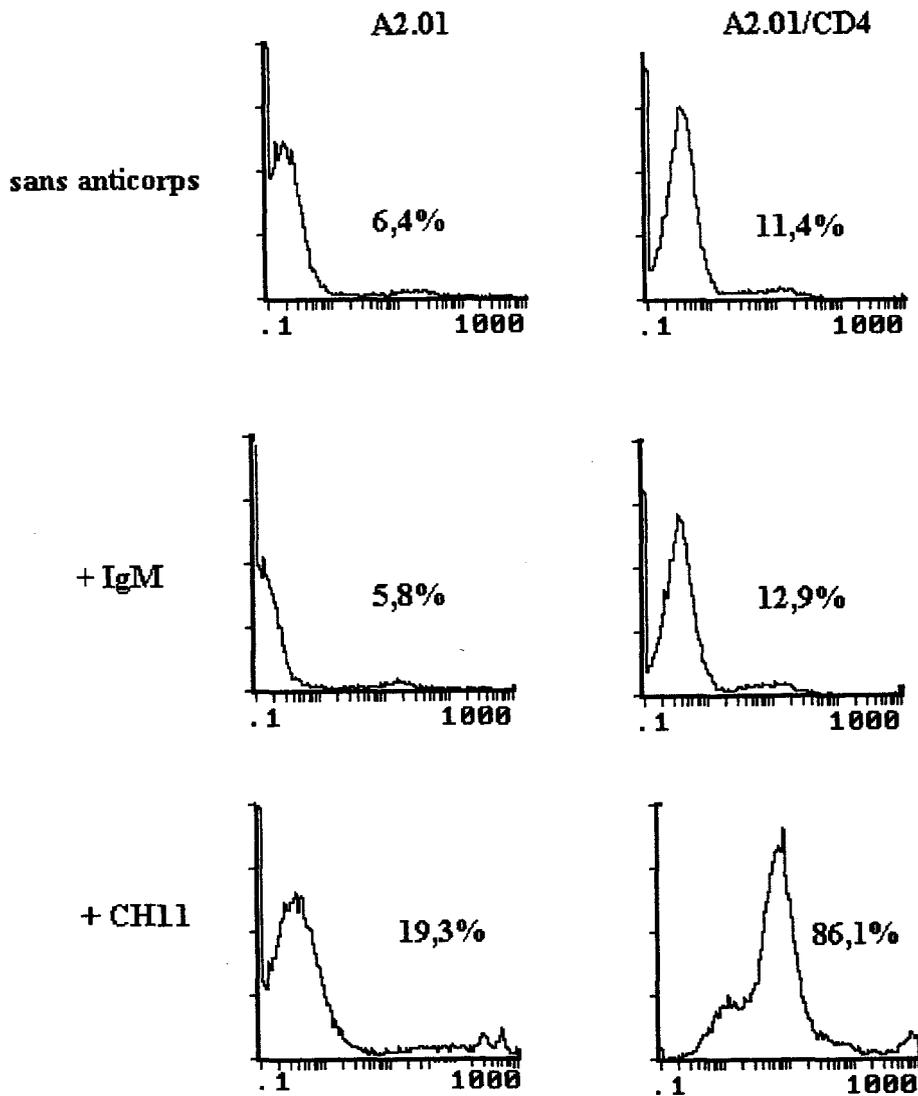
nos résultats montrent que

- l'apoptose induite par VIH ne passe pas nécessairement par la transduction d'un signal via le domaine intracytoplasmique de CD4
- que l'expression de l'enveloppe virale à la surface cellulaire semble être un des mécanismes majeurs impliqués dans l'apoptose induite par VIH, que ce mécanisme peut-être impliqué dans la déplétion des cellules CD4<sup>+</sup> non infectées, à condition que les cellules qui expriment l'enveloppe soient en proportion suffisante.
- l'anticorps 13B8.2 bloque l'apoptose induite par VIH par deux mécanismes distincts
  - 1) en inhibant la transcription virale, la partie cytoplasmique de CD4 est peut-être nécessaire
  - 2) en agissant sur l'apoptose induite par la gp120, la partie intracytoplasmique de CD4 n'est pas nécessaire.

## **XI. Expériences complémentaires à propos du rôle de Fas dans l'apoptose induite par VIH**

### **A. Fas et CD4**

Il a été montré dans différents modèles, qu'il existe un lien entre la mort induite par ligation de la molécule CD4 et l'expression de Fas. Wang et al ont montré qu'un anticorps anti-CD4 induisait une déplétion des cellules T CD4<sup>+</sup> *in vivo* chez la souris normale mais



**Fig 6**  
 Apoptose induite par Fas  
 Induction de l'apoptose de cellules CD4<sup>+</sup> et CD4<sup>-</sup>

pas chez la souris lpr/lpr (Wang et al., 1994) (n'exprimant pas Fas). Dans la même optique, Oyaizu et al ont montré que le pontage de CD4 par un anticorps anti-CD4 induit une augmentation de l'expression de Fas sur les cellules T, suivie par une mort par apoptose avec ou sans activation. Ces résultats ont d'ailleurs été confirmés par d'autres plus récemment (Desbarats et al., 1996; Wong et al., 1997).

Ces résultats, cependant, n'expliquent en rien le mécanisme qui relierait CD4 à Fas ou/et Fas-L.

Les résultats du premier article ont montré que les cellules exprimant une forme tronquée de la molécule CD4 sont sensibles à la mort par Fas. Cependant, d'autres expériences ont été effectuées avec ces mêmes cellules, en y ajoutant en parallèle des cellules A2.01. Ces cellules sont dérivées des cellules CEM et sélectionnées pour leur absence d'expression de la molécule CD4. Ce sont ces cellules qui ont été transfectées de façon stable pour obtenir les cellules A2.01/CD4, 401 et 403.

Les résultats d'induction de la mort par Fas présentés *figure n°6* et fig n° 3 de l'article montrent les cellules ne possédant pas de CD4 sont nettement moins sensibles à l'activation par Fas que ne le sont les cellules exprimant CD4. D'autres expériences ont été effectuées durant des temps d'incubation différents, pour savoir si les différences observées ne provenaient pas d'une différence de cinétique d'induction de l'apoptose. Pour chaque expérience une différence importante dans le pourcentage de cellules en apoptose a été retrouvée. Jusqu'alors, un lien a été établi entre la ligation de CD4 et la mort induite par Fas, il semble, d'après ces expériences, qu'il existe aussi un rapport entre l'activation de Fas et CD4. D'autre part, la partie intracytoplasmique de CD4 ne paraît pas avoir un rôle déterminant dans l'induction de cette mort.

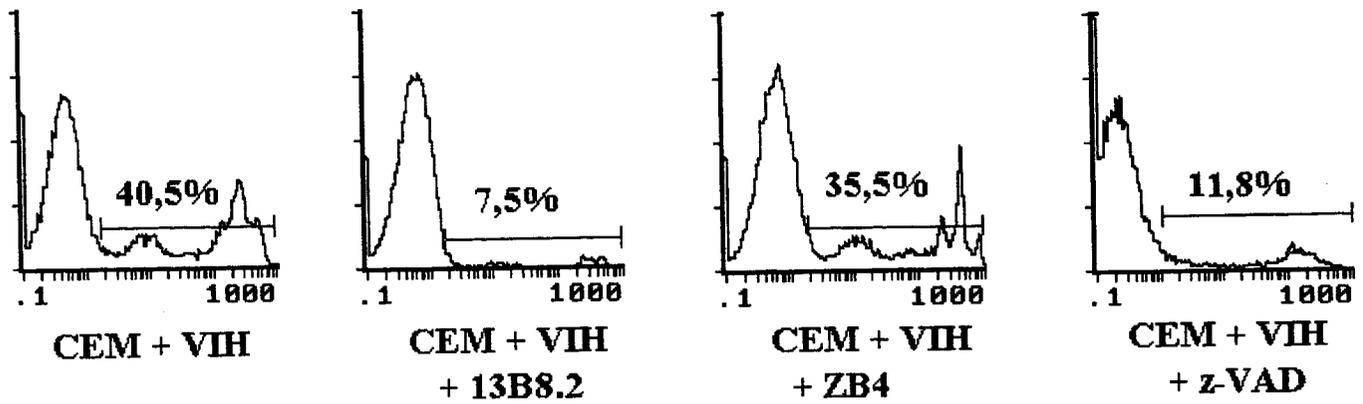
Cependant, il ne s'agit-là que de résultats préliminaires qui demandent à être approfondis avant de pouvoir tirer des conclusions.

### ***B. L'apoptose induite par VIH n'est pas blocable par un anticorps IgG anti-Fas***

Dans le cas de l'infection par VIH, l'effet de la liaison de CD4 par la gp120 sur l'apoptose induite par Fas n'est pas non plus très bien compris. Un modèle a néanmoins été proposé: la ligation de CD4 par la gp120 augmenterait l'expression de Fas, et l'activation en présence de la protéine Tat serait responsable de l'expression de Fas-L (Krammer et al., 1994).

Pourtant, il a aussi été suggéré que l'augmentation d'expression de la molécule Fas sur les cellules de patients infectés par le VIH n'était pas corrélée à la déplétion de ces cellules.

Les résultats concernant Fas, relatés dans le deuxième article, montrent une légère augmentation de l'intensité d'expression de la molécule Fas, après infection des cellules



**Fig 7**  
 Effet d'un anticorps IgG anti-Fas et d'un inhibiteur de caspases sur l'apoptose induite par VIH  
 Analyse en cytométrie d'un marquage au YOPRO-1.

CEM. Cette augmentation est reproductible. Par ailleurs, il est montré aussi que la mort des CEM induite par Fas n'est pas blocable par l'anticorps 13B8.2. Cette mort, par contre, est blocable par une IgG anti-Fas (ZB4).

Compte tenu de ces résultats, nous avons voulu savoir si l'apoptose induite par VIH pouvait être bloquée par cette IgG. Les cellules CEM ont été infectées suivant le protocole détaillé dans le matériel et méthodes de l'article, puis cultivées à concentration de  $5.10^5$  cellules/ml pendant 10 jours avec ou sans anticorps. L'IgG anti-Fas a été utilisée à 100ng/ml. Il nous a aussi semblé intéressant d'étudier l'effet du peptide inhibiteur de caspases z-VAD -fmk (Amersham) décrit pour bloquer la cascade apoptotique très en aval de Fas. Ce peptide inhibiteur a été utilisé à 300  $\mu$ M.

Les résultats présentés *figure n° 7* sont en accord avec des résultats récents obtenus sur d'autres lignées (Glynn et al., 1996; Ohnimus et al., 1997). L'apoptose induite par VIH n'est pas bloquée par l'IgG anti-Fas. Le blocage obtenu par le peptide inhibiteur n'est possible qu'à forte concentration, et difficilement reproductible.

Il n'est pas impossible que lors de l'infection par le VIH, d'autres molécules telles que TRAIL prennent le relais dans le cas d'un blocage de la voie Fas, ce qui expliquerait les divergences de résultats décrits dans la littérature.

## BIBLIOGRAPHIE

## **XII. Bibliographie**

Abbas, A. K., Murphy, K. M., and Sher, A. (1996). **Functional diversity of helper T lymphocytes.** *Nature* 383, 787-793.

Abraham, N., and Veillette, A. (1990). **Activation of P56<sup>lck</sup> through mutation of a regulatory carboxy-terminal tyrosine residue requires intact sites of autophosphorylation and myristylation.** *Mol. Cell. Biol.* 10, 5197-5206.

Agarwal, M. L., Taylor, W. R., Chernov, M. V., Chernova, O. B., and Stark, G. B. (1998). **The p53 Network.** *J. Biol. Chem* 273, 1-4.

Akbar, A. N., Borthwick, N., Salmon, M., Gombert, W., Bofill, M., Shamsadeen, N., Pilling, D., Pett, S., Grundy, J. E., and Janossy, G. (1993). **The significance of low bcl-2 expression by CD45RO<sup>+</sup> T cells in normal individuals and patients with acute viral infections. The role of apoptosis in T cell memory.** *J. Exp. Med* 178, 427-438.

Alnemri, E.S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., Yuan, J. (1996). **Human ICE/CED-3 protease nomenclature.** *Cell* 87, 171.

Ameisen, J.-C., and Capron, A. (1991). **Cell dysfunction and depletion in AIDS the programmed cell death hypothesis.** *Immunol. Today* 12, 102-105.

Ameisen, J. C. (1996). **The origin of programmed cell death.** *Science* 272, 1278-1279.

Amrein, K. E., Panholzer, B., Flint, N. A., Bannwarth, W., and Burn, P. (1993). **The Src homology 2 domain of the protein-tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> mediates both intermolecular and intramolecular interactions.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 10285-10289.

Antoni, B. A., P. Sabbatini., A. B. Rabson., and E. White. (1995). **Inhibition of Apoptosis in Human Immunodeficiency Virus-Infected Cells Enhances Virus Production and Facilitates Persistent Infection.** *J. Virol.* 69, 2384-2392.

Bachmann, M. F., McKall-Faienza, K., Schimts, R., Bouchard, D., Beach, J., Speiser, D. E., Mak, T. W., and Ohashi, P. S. (1997). **Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation.** *Immunity* 7, 549-557.

Badley, A. D., Dockrell, D., Simpson, M., Schut, R., Lynch, D. H., Leibson, P., and Paya, C. V. (1997). **Macrophage-dependent apoptosis of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from HIV-infected individuals is mediated by Fas-L and Tumor Necrosis Factor.** *J. Exp. Med* 185, 55-64.

Badley, A. D., McElhinny, J. A., Leibson, P. J., Lynch, D. H., Alderson, M. R., and Paya, C. V. (1996). **Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes.** *J. Virol.* 70, 199-206.

Banda, N. K., Bernier, J., Kurahara, D. K., Kurrle, R., Haigwood, N., Sekaly, R. P., and Finkel, T. H. (1992). **Crosslinking CD4 by HIV gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis.** *J. Exp. Med* 176, 1099-1106.

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

Benkirane, M., Corbeau, P., Housset, V., and Devaux, C. (1993). **An antibody that binds the immunoglobulin CDR3-like region of the CD4 molecule inhibits provirus transcription in HIV-infected T cells.** *EMBO J.* 12, 4909-4921.

Benkirane, M., Hirn, M., Carrière, D., and Devaux, C. (1995). **Functional epitope analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gene expression bind to the Ig CDR3-like region of CD4.** *J. Virol* 69, 6898-6903.

Benkirane, M., Jeang, K.-T., and Devaux, C. (1994). **The cytoplasmic domain of the CD4 plays a critical role during the early stages of HIV infection in T-cells.** *EMBO J.* 13, 5559-5569.

Benkirane, M., Schmid-Antomarchi, H., Littman, D. R., Hirn, M., Rossi, B., and Devaux, C. (1995). **The cytoplasmic tail of CD4 is required for inhibition of**

**human immunodeficiency virus type 1 replication by antibodies that bind to the immunoglobulin CDR3-like region in domain 1 of CD4.** *J. Virol* 69, 6904-6910.

Berberian, L., Shukla, J., Jefferis, R., and Braun, J. (1994). **Effects of HIV infection on VH3 (D12 idiotope) B cells *in vivo*.** *J. Acquired Deficiency Syndromes* 7, 641-646.

Berger, E. A., Lifson, J. D., and Eiden, L. E. (1991). **Stimulation of glycoprotein gp120 dissociation from the envelope glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 1 by sCD4 and CD4 peptide derivatives: implications for the role of complementary-determining region 3 -like region in membrane fusion.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 8082-8086.

Boldin, M., Goncharov, T., Goltsev, Y., and Wallach, D. (1996). **Involvement of MACH, a novel MORT/FADD-interacting protease, in FAS/APO-1 and TNF receptor-induced cell death.** *Cell* 85, 803-815.

Bonyhadi, M. L., Rabin, L., Salimi, S., Brown, D. A., Kosek, J., McCune, J. M., and Kaneshima, H. (1993). **HIV induces thymus depletion *in vivo*.** *Nature* 363, 728-732.

Boudet, F., Lecoecur, H., and Gougeon, M.-L. (1996). **Apoptosis associated with *ex vivo* down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Fas in potential cytotoxic CD8+ T lymphocytes during HIV infection.** *J. Immunol* 156, 2282-2293.

Bour, S., Romas, G., and Wainberg, M. A. (1995). **The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection.** *Microbiol. Rev.* 59, 63-93.

Boyd, J. M., Malstrom, S., Subramanian, T., Venkatesh, L. K., Schaeper, U., Elangovan, B., D'Sa-Eipper, C., and Chinnadurai, G. (1994). **Adenovirus E1B 19 kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins.** *Cell* 79, 341-351.

Bozette, S. A., McCutchan, J. A., Spector, S. A., Wright, B., and Richman, D. D. (1993). **a cross-sectional comparison of persons with syncytium and non**

**syncytium- inducing human immunodeficiency virus. J. Infect. Dis 168, 1374-1379.**

**Brady, H. J. M., Pennington, D. J., Miles, C. G., and Dzierak, E. A. (1993). CD4 cell surface downregulation in HIV-1 Nef transgenic mice is a consequence of intracellular sequestration. EMBO. J 12, 4923-4932.**

**Brady, R. L., and Barclay, A. N. (1996). The structure of CD4, Springer Edition, *The CD4 molecule: roles in T lymphocytes and in HIV disease*, D. R. Littman, ed.**

**Briant, L., Coudronnière, N., Robert-Hebmann, V., Benkirane, M., and Devaux, C. (1996). Binding of HIV-1 virions or gp120-anti-gp120 immune complexes to HIV-1 infected quiescent peripheral blood mononuclear cells reveals latent infection. J. Immunol. 156, 3994-4004.**

**Briant, L., Signoret, N., Gaubin, M., Robert-Hebmann, V., Zhang, X., Murali, R., Greene, M. I., Piatier-Tonneau, D., and Devaux, C. (1997). Transduction of activation signal that follows HIV-1 binding to CD4 and CD4 dimerization involves the immunoglobulin CDR3-like region in domain 1 of CD4. J. Biol. Chem 272, 19441-19450.**

**Brinchman, J. E., Albert, J., and Vartdal, F. (1991). Few infected CD4+ T cells but a high proportion of replication-competent provirus copies in asymptomatic HIV-1 infection. J. Virol. 65, 2019-2023.**

**Casciola-Rosen, L., Nicholson, D., Chong, T., Rowan, K., Thornberry, D., Miller, D., and Rosen, A. (1996). Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. J. Exp. Med 183, 1957-1964.**

**Chambers, C. A., and Allison, J. P. (1997). Co-stimulation in T cell responses. Cur Opin Immunol 9, 396-404.**

**Cheng-Mayer, C., Seto, D., Tateno, M., and Levy, J. A. (1988). Biological features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. Science 240, 80-82.**

**Chiang, L. J., Friedman, D. J., Wang, C., Metelev, v., and Pardee, A. B. (1995). Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. Science 268, 429-431.**

Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Lane, B. R., and Dixit, V. M. (1997). **Interaction of ced-4 with Ced-3 and Ced-9: a molecular framework for cell death.** *Science* 275, 1122-1126.

Chinnaiyan, A. M., Woffendin, C., Dixit, V. M., and Nabel, G. J. (1997). **the inhibition of pro-apoptotic ICE-like proteases enhances HIV replication.** *Nature Med.* 3, 333-337.

Chung, C. D., Lewis, L. A., and Carrie Miceli, M. (1997). **T cell antigen receptor-induced IL-2 production and apoptosis have different requirements for Lck activities.** *J. Immunol.* 159, 1758-1766.

Clem, R. J., and Miller, L. K. (1993). **Apoptosis reduces both the *in vitro* replication and the *in vivo* infectivity of a baculovirus.** *J. Virol* 67, 3725-3738.

Clerici, M., Sarin, A., Coffman, R. L., Wynn, T. A., Blatt, S. P., Hendrix, C. W., Wolf, S. F., Shearer, G. M., and Henkart, P. A. (1994). **Type1/ type2 cytokine modulation of T cell programmed cell death as a model for HIV pathogenesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 11811-11815.

Clerici, M., Sarin, A., Henkart, P. A., and Shearer, G. M. (1997). **Apoptotic cell death and cytokine dysregulation in human immunodeficiency virus infection: pivotal factors in disease progression.** *Cell Death Diff* 4, 699-706.

Clerici, M., and Shearer, G. M. (1993). **a Th1-Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection.** *Immunol. Today* 14, 107-111.

Clerici, M., Stocks, N. I., Zajac, R. A., Boswell, R. N., Lucey, D. R., Via, C. S., and Shearer, G. M. (1989). **Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, HIV-seropositive patients.** *J. Clin. Invest* 84, 1892-1899.

Clouston, W. M., and Kerr, J. F. R. (1985). **Apoptosis, lymphocytotoxicity and the containment of viral infections.** *Medical Hypothesis* 18, 399.

Cohen, D. I., Tani, Y., Tian, H., Boone, E., Samelson, L., and Lane, H. C. (1992). **Participation of tyrosine phosphorylation in the cytopathic effect of HIV-1.** *Science* 256, 542-545.

Conti, L., Rainaldi, G., Matarrese, P., Vanaro, B., Rivabene, R., Columba, S., Sato, A., Belardelli, F., Malorni, W., and Gessani, S. (1998). **The HIV-1 vpr protein acts as a negative regulator of apoptosis in a human lymphoblastoid T cell line: possible implications for the pathogenesis of AIDS.** *J. Exp. Med* 187, 403-413.

Cooney, A. J., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., and Tasi, M.-J. (1991). **Chicken ovalbumine upstream promoter transcription factor binds to a negative regulatory of the human immunodeficiency virus long terminal repeat.** *J. Virol* 65, 2853-2860.

Corbeau, P., Benkirane, M., Weil, R., David, C., Emiliani, S., Olive, D., Mawas, C., Serre, A., and Devaux, C. (1993). **Ig CDR3-like region of the CD4 molecule is involved in HIV-induced syncytia formation but not in viral entry.** *J. Immunol* 150, 290-301.

Corbeil, J., M. Tremblay, and D.D. Richman. (1996). **HIV-induced Apoptosis Requires the CD4 Receptor Cytoplasmic Tail and is Accelerated by Interaction of CD4 with p56<sup>lck</sup>.** *J. Exp. Med.* 183, 39-48.

Corbeil, J., and Richman, D. D. (1995). **Productive infection and subsequent interaction of CD4-gp120 at the cellular membrane is required of HIV-induced apoptosis of CD4+ T cells.** *J. Gen. Virol.* 76, 681-690.

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

Davis, C. B., Dikic, I., Unutmaz, D., Mark Hill, C., Arthos, J., Siani, M. A., Thompson, D. A., Schlessinger, J., and Littman, D. R. (1997). **Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5.** *J. Exp. Med* 186, 1793-1798.

Desbarats, J., Freed, J. H., Campbell, P. A., and Newell, K. M. (1996). **Fas(CD95) expression and death-mediating function are induced by CD4 cross-linking on CD4<sup>+</sup> T cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 11014-11018.

Di Somma, M. M., Nuti, S., Telford, J. L., and Baldari, C. T. (1995). **P56<sup>lck</sup> plays a key role in transducing apoptotic signals in T cells.** *FEBS Lett* 363, 101-104.

Doyle, C., and Strominger, J. L. (1987). **Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion.** *Nature* 330, 256-259.

Ehret, A., Westendorp, M. O., Herr, I., Debatin, K.-M., Heeney, J. L., Frank, R., and Krammer, P. H. (1996). **Resistance of chimpanzee T cells to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat-enhanced oxydative stress and apoptosis.** *J. Virol.* 70, 6502-6507.

Embrentson, J. (1993). **Massive overt infection of helper T lymphocytes and macrphages by HIV during the incubation period of AIDS.** *Nature* 362, 359-362.

Enari, M., Hug, H., and Nagata, S. (1995). **Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis.** *Nature* 375, 78-80.

Estaquier, J., Idziorek, T., Zou, W., Emilie, D., Farber, C.-M., Bourez, J.-M., and Ameisen, J.-C. (1995). **T helper type 1/ T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukine 12 on activation-induced and Cd95 (Fas/ APO-1)-mediated apotosis of CD4<sup>+</sup> T cells from human immunodeficiency virus-infected persons.** *J. Exp. Med* 182, 1759-1767.

Estaquier, J., Tanaka, M., Suda, T., Nagata, S., Golstein, P., and Ameisen, J. C. (1996). **Fas-Mediated Apoptosis of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells from Human Immunodeficiency Virus-infected persons: differential in vitro oreventive effect of cytokines and protease antagonists.** *Blood* 87, 4959-4966.

Everall, I. P., Luthert, P. J., and Lantos, P. L. (1991). **Neuronal loss in the frontal cortex in HIV-infection.** *Lancet* 337, 1119-1121.

Fantini, J., Yahi, N., and Chermann, J. C. (1991). **Human immunodeficiency virus can infect the apical and basolateral surfaces of human colonic epithelial cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 9297-9301.

Fauci, A. S. (1988). **The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis.** *Science* 239, 617-622.

Fields, P. E., Gajewski, T. F., and Fitch, F. W. (1996). **Blocked ras activation in anergic CD4<sup>+</sup>T cells.** *Science* 271, 1276-1278.

Finco, O., Nuti, S., De Magistris, M. T., Mangiavacchi, L., Aiuti, A., Forte, P., Fantoni, A., and Van der Putten, H. A., S (1997). **Induction of CD4<sup>+</sup> T cell depletion in mice doubly transgenic for HIV gp120 and human CD4.** *Eur. J. Immunol* 27, 1319-1324.

Finkel, T. H., Tudor-Williams, G., Banda, N. K., Cotton, M. F., Curiel, T., Monks, C., Baba, T. W., Ruprecht, R. M., and Kupfer, A. (1995). **Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV-and SIV-infected lymph nodes.** *Nature Med.* 1, 129-134.

Fraser, J. D., Straus, D., and Weiss, A. (1993). **Signal transduction events leading to T-cell lymphokine gene expression.** *Immunol Today* 14, 357-362.

Gajewski, T. F., and Thompson, C. B. (1996). **Apoptosis meets signal transduction: elimination of a bad influence.** *Cell* 87, 589-592.

Gaynor, R. (1992). **Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression.** *AIDS* 6, 347-363.

Gehri, R., Hahn, S., Rothen, M., Steuerwald, M., Nuesch, R., and Erb, P. (1996). **The Fas receptor in HIV infection: expression on peripheral blood lymphocytes and role in the depletion of T cells.** *AIDS* 10, 9-16.

Giacca, M., Gutierrez, M. I., Menzo, S., Di Faggania, F., and Falaschi, A. (1992). **A human binding site for transcription factor USF/MLTF mimics the negative regulatory element of the human immunodeficiency virus type 1.** *Virology* 186, 133-147.

Gibellini, D., Caputo, A., Celeghini, C., Bassini, A., La Placa, M., Capitani, S., and Zauli, G. (1995). **Tat-expressing Jurkat cells show an increased resistance to different apoptotic stimuli, including acute human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection.** *Br. J. Haematol.* 89, 24-33.

Gilboa, E., Mitra, S. W., Goff, S., and Baltimore, D. (1979). **A detailed model of reverse transcription and tests of crucial aspects.** *Cell* 18, 93-100.

Glaichenhaus, N., Shastri, N., Littman, D. R., and Turner, J. M. (1991). **Requirement for association of p56<sup>lck</sup> with CD4 in antigen-specific signal transduction in T cells.** *Cell* 64, 511-520.

Glynn, J. M., L, M., and Mosier, D. E. (1996). **Apoptosis induced by HIV infection in H9 T cells is blocked by ICE-Family protease inhibition but not by a fas (CD95) antagonist.** *J. Immunol.* 157, 2754-2758.

Goh, W. C., Rogel, M. E., Matthew Kinsey, C., Michael, S. F., Fultz, P. N., Nowak, M. A., Hahn, B. H., and Emerman, M. (1998). **HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo.** *Nature. Med.* 4, 65-71.

Goldman, F., Crabtree, J., Hollenback, C., and Koretzky, G. (1997). **Sequestration of p56lck by gp120, a model for TCR desensitization.** *J. Immunol.* 158, 2017-2024.

Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Thim-Fan, P., Wolf, R. A., and Saxon, A. (1981). **Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency.** *N. Engl. J. Med* 305, 1425.

Gougeon, M.-L., Lecoer, H., Boudet, F., Ledru, E., Marzabal, S., Boullier, S., Roué, R., Nagata, S., and Heeney, J. (1997). **Lack of chronic immune activation in HIV-infected chimpanzees correlates with the resistance of T cells to Fas/Apo-1 (CD95)-induced apoptosis and preservation of a T helper 1 phenotype.** *J. Immunol.* 158, 2964-2976.

Gougeon, M.-L., Olivier, R., Garcia, S., Guetard, D., Dragic, T., Dauguet, C., and Montagnier, L. (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* 312, 529.

Groux, H., Torpier, G., Monté, D., Mouton, Y., Capron, A., and Ameisen, J.-C. (1992). **Activation-induced death by apoptosis in CD4<sup>+</sup> T cells from human**

**immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. J. Exp. Med 175, 331-340.**

**Guillerm, C., Coudronnière, N., Robert-Hebmann, V., and Devaux, C. (1998). Delayed Human Immunodeficiency virus type 1-induced apoptosis in cells expressing truncated forms of CD4. J. Virol 72, 1754-1761.**

**Granel, B., Vivier, E. (1998) Les cellules NK: biologie, modes de régulation et intérêt clinique. Hématologie. 4, 41-49.**

**Harouse, J. M. (1989). CD4- independant infection of human neural cells by human immunodeficiency virus type 1. J. Virol 63, 2527-2533.**

**Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Voudsen, K. H., and Oren, M. (1995). Induction of apoptosis in Hela cells by trans-activation-deficient p53. Genes Dev 9, 2170-2183.**

**He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D. O., and Landau, N. R. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (vpr) arrests cells in the g2 phase of the cell cycle by inhibiting p34<sup>cdc2</sup> activity. J. Virol 69, 6705-6711.**

**He, J., de Castro, C. M., Vandebark, G. R., Busciglio, J., and Gabuzda, D. (1997). Astrocyte apoptosis induced by HIV-1 transactivation of the c-kit protooncogene. Proc. Natl. Acad. Sci. 94, 3954-3959.**

**Heinkelein, M., Sopper, S., and Jassoy, C. (1995). Contact of Human Immunodeficiency Virus Type 1-infected and uninfected CD4+ T lymphocytes is highly cytolytic for both cells. J. Virol. 69, 6925-6931.**

**Henderson, S., Huen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G., and Rickinson, A. (1993). Epstein-Barr virus coded BHRF1 protein, a viral homologue of bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 8479-8483.**

**Hildreth, J. E., and Orentas, R. J. (1989). Involvement of a leukocyte adhesion receptor (LFA-1) in HIV-induced syncytium formation. Science 244, 1075-1078.**

Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K., and Sasada, M. (1998). **Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis.** *J. Exp. Med* 187, 587-600.

Hivroz, C., Mazerolles, F., Soula, M., Fagard, R., Graton, S., Meloche, S., Sekaly, R. P., and Fischer, A. (1993). **Human immunodeficiency virus gp120 and derived peptides activate protein tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> in human CD4 T lymphocytes.** *Eur. J. Immunol.* 23, 600-607.

Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., and Markowitz, M. (1995). **Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection.** *Nature* 373, 123-126.

Howie, S. E. M., Harrison, D. J., and Wyllie, A. H. (1994). **Lymphocyte apoptosis- Mechanisms and implications in disease.** *Immunol. Rev.* 142, 141-156.

Hubert, P., Bismuth, G., Korner, M., and Debre, P. (1995). **HIV-1 glycoprotein gp120 disrupts CD4-p56lck/CD3-T cell receptor interactions and inhibits CD3 signaling.** *Eur. J. Immunol* 25, 1417-1425.

Hueber, A.-O., Zörnig, M., Lyon, D., Suda, T., Nagata, S., and Evan, G. I. (1997). **Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis.** *Science* 278, 1305-1309.

Idziorek, T., Estaquier, J., de Bels, F., and Ameisen, J.-C. (1995). **YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of apoptosis without interfering with cell viability.** *J. Immunol. Methods* 185, 249-258.

Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. (1997). **Programmed cell death in animal development.** *Cell* 88, 347-354.

Jacotot, E., Krust, B., Callebaut, C., Laurent-Crawford, A. G., Blanco, J., and Hovanessian, A. G. (1997). **HIV-1 envelope glycoproteins-mediated apoptosis is regulated by CD4 dependent and independent mechanisms.** *Apoptosis* 2, 47-60.

Jänicke, R. U., Walker, P. A., Lin, X. L., and Porter, A. G. (1996). **Specific cleavage of the retinoblastoma protein by an ICE-like protease in apoptosis.** *EMBO J.* *15*, 6969-6978.

Kagaya, S., Kitanaka, C., Noguchi, K., Mochizuki, T., Sugiyama, A., Asai, A., Yasuhara, N., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., and Kuchino, Y. (1997). **A functional role for death proteases in s-Myc and c-Myc-mediated apoptosis.** *Mol. Cell. Biol.* *17*, 6736-6745.

Kanner, S. B., and Haffar, O. K. (1995). **HIV-1 down-regulates CD4 costimulation of TCR/CD3-directed tyrosine phosphorylation through CD4/p56<sup>lck</sup> dissociation.** *J. Immunol.* *154*, 2996-3005.

Katsikis, P. D., Garcia-Ojeda, M. E., Torres-Roca, J. F., Greenwald, D. R., Herzenberg, L. A., and Herzenberg, L. A. (1997). **HIV type 1 Tat protein enhances activation-but not Fas (CD95)-induced peripheral blood T cell apoptosis in healthy individuals.** *Int. Immunol.* *9*, 835-841.

Katsikis, P. D., Garcia-Ojeda, M. E., Torres-Roca, J. F., Tijoe, I. M., Smith, C. A., Herzenberg, L. A., and Herzenberg, L. A. (1997). **Interleukin-1 $\beta$  Converting Enzyme-like protease involvement in Fas-induced and activation-induced peripheral blood T cell apoptosis in HIV infection. TNF-related apoptosis-inducing ligand can mediate activation-induced T cell death in HIV infection.** *J. Exp. Med* *186*, 1365-1372.

Katsikis, P. D., Garcia-Ojeda, M. E., Wunderlich, E. S., Smith, C. A., Yagita, H., Okumura, K., Kayagaki, N., Alderson, M., Herzenberg, L. A., and Herzenberg, L. A. (1996). **Activation-induced peripheral blood T cell apoptosis is Fas independent in HIV-infected individuals.** *Int. Immunol.* *8*, 1311-1317.

Katsikis, P. D., Wunderlich, E. S., Smith, C. A., Herzenberg, L. A., and Herzenberg, L. A. (1995). **Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals.** *J. Exp. Med.* *181*, 2029-2036.

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). **Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics.** *Br. J. Cancer* *26*, 239-257.

Kim, J. Y. H., Gonzalez-Scarano, F., Zeichner, S. L., and Alwine, J. C. (1993). **Replication of type 1 human immunodeficiency viruses containing linker substitution mutations in the -201 to -130 region of the long terminal repeat.** *J. Virol* 67, 1658-1662.

Klatzmann, Q., Barré-Sinoussi, F., Nugeyre, M. T., Dauget, C., Chermann, J. C., and Montagnier, L. (1984). **Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes.** *Science* 225, 59-63.

Koga, Y., Sasaki, M., Yoshida, H., Wigzell, H., Kimura, G., and Nomoto, K. (1990). **Cytopathic effect determined by the amount of CD4 molecules in human cell lines expressing envelope glycoprotein of HIV.** *J. Immunol* 144, 94-102.

Kolesnitchenko, V., King, L., Riva, A., Tani, Y., Korsmeyer, S. J., and Cohen, D. I. (1997). **A major human immunodeficiency virus type 1-initiated killing pathway distinct from apoptosis.** *J. Virol* 71, 9753-9763.

Kolesnitchenko, V., Wahl, L. M., Tian, H., Sunila, I., Tani, Y., Hartmann, D.-P., Cossman, J., Raffeld, M., Orenstein, J., Samelson, L. E., and Cohen, D. I. (1995). **Human immunodeficiency virus 1 envelope-initiated G2-phase programmed cell death.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 11889-11893.

Krajcsi, P., Dimitrov, T., Hermiston, T., Tolleson, A., Ranheim, T., Vande Pol, S., Stephenson, A., and Wold, W. (1996). **The adenovirus E3-14.7K protein and the E3-10.4K/14.5K complex of proteins, which independently inhibit tumor necrosis factor (TNF)-induced apoptosis, also independently inhibit TNF-induced release of arachidonic acid.** *J. Virol* 70, 4904-4913.

Krammer, P. H., Behrmann, I., Daniel, P., Dhein, J., and Debatin, K.-M. (1994). **Regulation of apoptosis in the immune system.** *Curr. Opin. Immunol.* 6, 279-289.

Kräusslich, H.-G. (1991). **Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3213-3217.

Kroemer, G. (1997). **The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis.** *Nat. Medicine* 3, 614-620.

Landau, N. R., Warton, M., and Littman, D. R. (1988). **The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of the CD4.** *Nature* 334, 159-162.

Lanzavecchia, A., Roosnek, E., Gregory, T., Berman, P., and Abrignani, S. (1988). **T cells can present antigens such as HIV gp120 targeted to their own surface molecules.** *Nature* 334, 530-532.

Laurent-Crawford, A., Krust, B., Muller, S., Rivière, Y., Rey-Cuillé, M.-A., Béchet, J.-M., Montagnier, L., and Hovanessian, A. (1991). **The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis.** *Virology* 185, 829-839.

Laurent-Crawford, A. G., Krust, B., Rivière, Y., Desgranges, C., Muller, S., Kieny, M.-P., and Dauguet, C. H., A.G (1993). **Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells.** *AIDS Res Hum Retrovirus* 9, 761-773.

Lemasson, I., Briant, L., Hague, B., Coudronnière, N., Héron, C., David, C., Rebouissou, C., Kindt, T., and Devaux, C. (1996). **An antibody that binds domain 1 of CD4 inhibits replication of HIV-1 but not HTLV-I-transformed cell line.** *J. Immunol* 156, 859-865.

Lenczowski, J. M., Dominguez, L., Eder, A. M., King, L. B., Zacharchuk, C. M., and Ashwell, J. D. (1997). **Lack of a role for Jun kinase and AP1 in Fas-induced apoptosis.** *Mol. Cell. Biol.* 17, 170-181.

Levine, A. J. (1997). **p53, the cellular gatekeeper for growth and division.** *Cell* 88, 323-331.

Lewis, D. E., Ng Tang, D. S., Adu-Oppong, A., Schober, W., and Rodgers, J. R. (1994). **Anergy and apoptosis in CD8+ T cells.** *J. Immunol.* 153, 412-420.

Lewis, P., and Emerman, M. E. (1994). **Passage through mitosis is required for oncoretrovirus but not for human immunodeficiency virus.** *J. Virol* 68, 510-516.

Lifson, J. D., Hwang, K. M., Nara, P. L., Fraser, B., Padgett, M., Dunlop, N. M., and Eiden, L. E. (1988). **Synthetic CD4 peptide derivatives that inhibit HIV infection and cytopathicity.** *Science* 241, 712-716.

Lifson, J. D., Rausch, D. M., Kalyanaraman, V. S., Hwang, K. M., and Eiden, L. E. (1991). **Synthetic peptides allow discrimination of structural features of CD4 (81-92) important for HIV-1 infection versus HIV-1 induced syncytia formation.** *AIDS. Res. Hum. Retrovirus* 7, 521-527.

Liu, R., Paxton, W., Choe, S., Ceradini, D., Martin, S., Horuk, R., MacDonald, M., Stuhlmann, H., Koup, R., and Landau, N. (1996). **Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection.** *Cell* 86, 367-377.

Los, M., Van de Craen, M., Penning, L. C., Schenk, H., Westendorp, M., Baeuerle, P. A., Droge, W., Kramer, P. H., Fiers, W., and Schulze-Osthoff, K. (1995). **requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis.** *Nature* 375, 81-83.

Luban, J., and Goff, S. (1991). **Binding of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA to recombinant HIV-1 gag polyproteins.** *J. Virol* 65, 3203-3212.

Lyerly, H. K., Matthews, T. J., Langlois, A. J., Bolognesi, D. P., and Weinhold, K. J. (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.* 84, 4601-4605.

Macen, J., Graham, K., Lee, S., Schreiber, M., Boskhov, L., and McFadden, G. (1996). **Expression of the myxoma virus tumor necrosis factor receptor homologue and M11L genes is required to prevent virus-induced apoptosis in infected rabbit T lymphocytes.** *Virology* 218, 232-237.

Macher, A. M., De Vinatea, M. L., Angritt, P., Tsur, S. M., and Reichert, C. M. (1988). **Pathological features of patients infected with human immunodeficiency virus.** (eds) *AIDS* Lippincott, Philadelphia, 155-184.

Maddon, P. J., Littman, D. R., Godfrey, M., Maddon, D. E., Chess, L., and Axel, R. (1985). **The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family.** *Cell* 42, 93-104.

Maldarelli, F., Sato, H., Berthold, E., Orenstein, J., and Martin, M. A. (1995). **Rapid Induction of apoptosis by cell to cell transmission of human immunodeficiency virus type 1.** *J. Virol.* *69*, 6457-6465.

Margolick, J. B., Volkman, D. J., Folks, T. M., and Fauci, A. S. (1987). **Amplification of HTLVIII/LAV infection by antigen induced activation of T cells and direct suppression by virus of lymphocyte blastogenic responses.** *J. Immunol* *138*, 1719-1723.

Marsh, M., and Pelchen-Matthews, A. (1996). **Endocytic and exocytic regulation of CD4 expression and function,** Springer Edition, *The CD4 molecule: roles in T lymphocytes and in HIV disease*, D. R. Littman, ed.

McCloskey, T. W., Ott, M., Tribble, E., Khan, S. A., Teichbe, S., Paul, M. O., Pahwa, S., Verdin, E., and Chirmule, N. (1997). **Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells.** *J. Immunol.* *158*, 1014-1019.

McCune, J. M. (1995). **Viral latency in HIV disease.** *Cell* *82*, 183-188.

Medema, J. P., Scaffidi, C., Kischkel, F. C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1997). **FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC).** *EMBO. J* *16*, 2794-2804.

Merzouki, A., Patel, P., Cassol, M., Ennaji, M., Tailor, P., Turcotte, F. R., O'Shaughnessy, M., and Arella, M. (1995). **HIV-1 gp120/160 expressing cells up-regulate HIV-1 LTR directed gene expression in a cell line transfected with HIV-1 LTR-reporter gene constructs.** *Cell. Mol. Biol.* *41*, 445-452.

Meyaard, L., Otto, S. A., Jonker, R. R., Mijnster, J. M., Keet, R. P. M., and Miedema, F. (1992). **Programmed Death of T cells in HIV-1 infection.** *Science* *257*, 217-219.

Meyaard, L., Schuitemaker, H., and Miedema, F. (1993). **T cell dysfunction in HIV infection. anergy due to defective antigen-presenting cell function?** *Immunol Today* *14*, 161-164.

Miedema, F., Petit, A. J. C., Terpestra, F. G., Eeftinck Schattenkerk, J. K. M., Dewolf, F., Al, B. J. M., Roos, M., Lange, J. M. A., Danner, S. A., Goudsmit, J., and

Schellekens, P. T. A. (1988). **Immunological abnormalities in HIV-infected asymptomatic homosexual men.** *J. Clin. Invest* 82, 1908-1914.

Mignotte, B., Zamzami, N., Petit, P., Vayssière, J-L., Kroemer, G., (1998). **Contrôle mitochondrial de l'apoptose: la mort cellulaire programmée est-elle apparue à la suite de l'événement endosymbiotique à l'origine des mitochondrie.** *Med. Sci.* 14, 54-60

Milia, E., Di Somma, M. M., Majolini, M. B., Ulivieri, C., Somma, F., Piccolella, E., Telford, J. L., and Baldari, C. T. (1997). **Gene activating and proapoptotic potential are independent properties of different CD4 epitopes.** *Molecular immunology* 34, 287-296.

Miller, R. H., and Sarver, N. (1997). **HIV accessory proteins as therapeutic targets.** *Nature Med.* 3, 389-394.

Mitra, D., Steiner, M., Lynch, D. H., Staiano-Coico, L., and Laurence, J. (1996). **HIV-1 upregulates Fas ligand expression in CD4<sup>+</sup>T cells in vitro and in vivo: association with Fas-mediated apoptosis and modulation by aurintricarboxylic acid.** *Immunology* 87, 581-585.

Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). **Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene.** *Cell* 80, 293-299.

Moebius, U., Clayton, L. K., Abraham, S., Diener, A., Yunis, J. J., Harrison, S. C., and Reinherz, E. L. (1992). **Human immunodeficiency virus gp120 binding to C'C'' ridge of CD4 domain 1 is also involved in interaction with class II major histocompatibility complex molecules.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 12008-12012.

Moebius, U., Clayton, L. K., Abraham, S., Harrison, S. C., and Reinherz, E. L. (1992). **The human immunodeficiency virus gp120 binding site on CD4: delineation by quantitative equilibrium and kinetic binding studies of mutants in conjunction with a high resolution CD4 atomic structure.** *J. Exp. Med* 176, 507-517.

Molina, T. J., Kishihara, K., Siderovski, D. P., van Ewijk, W., Narendran, A., Timms, E., Wakeham, A., Paige, C. J., Hartmann, K.-U., Veillette, A., Davidson, D., and

Mak, T. W. (1992). **Profound block in thymocyte development in mice lacking p56<sup>lck</sup>**. *Nature* 357, 161.

Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Klasse, P. J., and Burkly, L. C. (1992). **a monoclonal antibody to CD4 domain 2 blocks soluble CD4-induced conformational changes in the envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-1 infection of CD4+ cells**. *J. Virol* 66, 4784-4793.

Moore, J. P., Trkola, A., and Dragic, T. (1997). **Co-receptors for HIV-1 entry**. *Curr. Op. Immunol.* 9, 551-562.

Moore, K. W., Vieira, P., Fiorentino, D. F., Trounstein, M. L., Khan, T. A., and Mosmann, T. R. (1990). **Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1**. *Science* 248, 1230-1234.

Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Macclsaad, P. D., Torbett, B. E., and Levy, J. A. (1993). **Rapid loss of CD4+ T cells in human-PBL-SCID mice by noncytopathic HIV isolates**. *Science* 260, 689-692.

Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H., and Zinkernagel, R. M. (1993). **Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells**. *Nature* 362, 758-761.

Moutouh, L., Richman, D. D., and Corbeil, J. (1997). **HIV-induced apoptosis requires the CD4 cytoplasmic tail and is not Fas-dependent in A2.01 cell line expressing wild type and mutants of the CD4 receptor**. In *Retroviruses*, S. H. H. a. J. M. Coffin, ed. (Cold Spring Harbor, N. Y: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 283.

Muro-Cacho, C. A., Pantaleo, G., and Fauci, A. S. (1995). **Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons**  
**Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden**. *J. Immunol.* 154, 5555-5566.

Nagata, S. (1997). **Apoptosis by death factor**. *Cell* 88, 355-365.

Nara, P. L., Hwang, K. M., Rausch, D. M., Lifson, J. D., and Eiden, L. E. (1989). **CD4 antigen-based antireceptor peptides inhibit infectivity of human**

- immunodeficiency virus in vitro at multiple stages of the viral life cycle.** Proc. Natl. Acad. Sci 86, 7139-7143.
- Newell, M. K., Haughn, L. J., Maroun, C. R., and Julius, M. H. (1990). **Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen.** Nature 347-289, 286.
- Newmeyer, D. D., Farschon, D. M., and Reed, J. C. (1994). **Cell-free apoptosis in xenopus egg extracts: inhibition by bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria.** Cell 79, 353-364.
- Nicholson, D. W., Ali, A., and Thornberry, N. A. (1995). **Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.** Nature 376, 37-43.
- Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1997). **Caspases: killer proteases.** TIBS 22, 299-306.
- Nishina, H., Fischer, K. D., Radvanyi, L., Shahinian, A., Hakem, R., Rubie, E. A., Bernstein, A., Mak, T. W., Woodgett, J. R., and Penninger, M. J. (1997). **Stress-signalling kinase Sek 1 protects thymocytes from apoptosis mediated by CD95 and CD3.** Nature 385, 350-353.
- Nossal, G. J. V. (1994). **Negative selection of lymphocytes.** Cell 76, 229-239.
- Ohnismus, H., Heinkelein, M., and Jassoy, C. (1997). **Apoptotic cell death upon contact of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes with HIV glycoprotein-expressing cells is mediated by caspases but bypasses CD95 (Fas/Apo-1) and TNF receptor 1.** J. Immunol 159, 5246-5252.
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993). **Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.** Cell 74, 609-619.
- Owen-Schaub, L. B., Zhang, W., Cusak, J. C., Angelo, L. S., Santee, S. M., Fujiwara, T., Roth, J. A., Deisseroth, A. B., Zhang, W. W., Kruzel, E., and al, e. (1996). **Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression.** Mol. Cell. Biol 15, 3032-3040.

Oyaizu, N., McClosey, T. W., Coronese, M., Chirmule, N., Kalyanaraman, V. S., and Pahwa, S. (1993). **Accelerated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from human immunodeficiency virus type-1 infected patients and in CD4 cross-linked PBMCs from normal individuals.** *Blood* 82, 3392-3400.

Oyaizu, N., Than, S., McClosey, T. W., and Pahwa, S. (1995). **Requirement of p56<sup>lck</sup> in T-cell receptor/CD3-mediated apoptosis and Fas-ligand induction in Jurkat cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 213, 994-1001.

Pal, R., Reitz, S., Tschachler, E., Gallo, R. C., Sarngadharan, M. G., and Veroneze, F. M. (1990). **Myristoylation of gag proteins plays an important role in virus assembly.** *Res. and Hum. Retrovir.* 6, 721-730.

Park, I.-W., Kondo, E., Bergeron, L., Park, J., and Sodroski, J. (1996). **Effects of human immunodeficiency virus type 1 infection on Programmed Cell Death in the presence or absence of Bcl-2.** *AIDS Hum Retrovir* 12, 321-328.

Pelchen-Matthews, A., Armes, J. E., Griffiths, G., and Marsh, M. (1991). **Differential endocytosis of CD4 in lymphocytic and non-lymphocytic cells.** *J. Exp. Med* 173, 575-587.

Pelchen-Matthews, A., Boulet, I., Littman, D., Fagard, R., and Marsh, M. (1992). **The protein tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> inhibits CD4 endocytosis by preventing entry of CD4 into coated pits.** *J. Cell. Biol* 117, 279-290.

Peter, M. E., Heufelder, A. E., and Hengartner, M. O. (1997). **Advances in apoptosis research.** *Proc. Natl. Acad.* 94, 12736-12737.

Phillips, A. N. (1994). **Viral burden in HIV infection.** *Nature* 367, 124-128.

Popik, W., and Pitha, P. M. (1996). **Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 induces association of Lck and Raf-1 and activates Raf-1 by a Ras-independent pathway.** *Mol. Cell. Biol.* 16, 6532-6541.

Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M.-A., Ratner, L., Lane, C. M., Shannon Moore, M., Blobel, G., and Bukrinsky, M. (1998). **Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex.** *EMBO. J* 17, 909-917.

Poulin, L., Evans, L. A., Tang, S., Barboza, A., Legg, H., Littman, D. R., and Levy, J. A. (1991). **Several CD4 domains can play a role in Human immunodeficiency virus infection of cells.** *J. Virol* *65*, 4893-4901.

Purvis, S. F., Jacobberger, J. W., Sramkoski, R. M., Patki, A. H., and Lederman, M. M. (1995). **HIV type 1 Tat protein induces apoptosis and death in Jurkat cells.** *AIDS Res. Hum. Retrovirus* *11*, 443-450.

Qin, X.-Q., Livingston, D. M., Kaelin, W. G., and Adams, P. D. (1994). **Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* *91*, 10918-10922.

Ravichandran, K. S., Collins, T. L., and Burakoff, S. J. (1996). **CD4 and signal transduction**, Volume The CD4 molecule: roles in T lymphocytes and in HIV disease, D. R. Littman, ed.

Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., Salvesen, G. S., and Pickup, D. J. (1992). **Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the Interleukin-1 $\beta$  Converting Enzyme.** *Cell* *69*, 597-604.

Razvi, E. S., and Welsh, R. M. (1993). **Programmed cell death of T lymphocytes during acute viral infection: a mechanism for virus-induced immunodeficiency.** *J. Virol* *67*, 5754-5765.

Re, F., Braaten, D., Franke, E. K., and Luban, J. (1995). **Human immunodeficiency virus type 1 vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34 cdc2-cyclinB.** *J. Virol* *69*, 6859-6864.

Reed, J. C. (1997). **Double identity for proteins of the Bcl-2 family.** *Nature* *387*, 773-776.

Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G., and Schlossman, S. F. (1979). **Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* *76*, 4061-4065.

Richardson, N. E., Brown, N. R., Hussey, R. E., Vaid, A., Matthews, T. J., Bolognesi, D. P., and Reinherz, E. L. (1988). **Binding site for human**

**immunodeficiency virus coat protein gp120 is located in the NH<sub>2</sub>-terminal region of T4 (CD4) and requires the intact variable-region like domain.** Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 6102-6106.

**Richman, D. D., and Bozzette, S. A. (1994). The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression.** J. Infect. Dis 169, 968-974.

**Romagnani, S., and Maggi, E. (1994). Th1 versus Th2 responses in AIDS.** Cur.Opin. Immunol 4, 616-622.

**Rosen, C. A., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1985). The location of CIS-acting regulatory sequences in the human T lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat.** Cell 41, 813-823.

**Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis.** Cell 91, 443-446.

**Samson, M., Labbé, O., Mollereau, C., Vassart, G., and Parmentier, M. (1996). Molecular cloning and functional characterization of a new CC-chemokine receptor gene.** Biochemistry 35, 3362-3367.

**Samson, M., Libert, F., Doranz, B., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C., Saragosti, S., Lapoumériou, C., Cogniaux, J., Forceille, C., Muyltermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges, M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R., Collman, R., Doms, R., Vassart, G., and Parmentier, M. (1996). Resistance to HIV-1 infection of Caucasian individuals bearing mutant alleles of CCR5 chemokine receptor gene.** Nature 382, 722-725.

**Samuelson, A., Sönerborg, A., Heuts, N., Cöster, J., and Chiodi, F. (1997). Progressive B cell apoptosis and expression of Fas ligand during human immunodeficiency virus type 1 infection.** AIDS. Res. Hum. Retrovir. 13, 1031-1038.

**Sandstrom, P. A., Pardi, D., Goldsmith, C. S., Chengying, D., Diamon, A. M., and Folks, T. M. (1996). Bcl-2 expression facilitates human immunodeficiency virus type 1-mediated cytopathic effects during acute spreading infections.** J. Virol. 70, 4617-4622.

Sarin, A., Clerici, M., Blatt, S. P., Hendrix, C. W., Shearer, G. M., and Henkart, P. A. (1994). **Inhibition of activation-induced programmed cell death and restoration of defective immune responses of HIV+ donors by cysteine protease inhibitors.** *J. Immunol* 153, 862-872.

Sastry, K. J., Marin, M. C., Nehete, P. N., McConnell, K., el-Naggar, A. K., and McDonnell, T. J. (1996). **Expression of human immunodeficiency virus type 1 tat results in down-regulation of bcl-2 and induction of apoptosis in hematopoietic cells.** *Oncogene* 13, 487-493.

Sato, T., Irie, S., Kitada, S., and Reed, J. (1995). **FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas.** *Science* 268, 411-415.

Sattentau, Q. J., Arthos, J., Deen, K., Hanna, N., Healey, D., Beverley, P. C. L., Sweet, R., and Truneh, A. (1989). **Structural analysis of the human immunodeficiency virus-binding domain of CD4.** *J. Exp. Med* 170, 1319-1334.

Sattentau, Q. J., Clapham, P. R., Weiss, R. A., Beverly, P. C., Montagnier, L., Alhalabi, M. F., Gluckmann, J. C., and Klatzmann, D. (1988). **The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule.** *AIDS* 2, 101-105.

Scala, G., Ruocco, M. R., Ambrosino, C., Mallardo, M., Giordano, V., Baldassarre, F., Dragonetti, E., Quinto, I., and Venuta, S. (1994). **the expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 TAT protein.** *J. Exp. Med* 179, 961-971.

Scheffner, M., Takahashi, T., Huibregtse, J., Minna, J., and Howley, P. (1992). **Interaction of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein with wild-type and mutant human p53 proteins.** *J. Virol* 66, 5100-5105.

Schmid-Antomarchi, H., Benkirane, M., Breitmayer, V., Husson, H., Ticchioni, M., Devaux, C., and Rossi, B. (1996). **HIV induces activation of phosphatidylinositol 4-kinase and mitogen-activated protein kinase by interacting with T cell CD4 surface molecules.** *Eur. J. Immunol.* 26, 717-720.

Schneider, P., Thome, M., Burns, K., Bodmer, J.-L., Hofmann, K., Kataoka, T., Holler, N., and Tschopp, J. (1997). **TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF- $\kappa$ B.** *Immunity* 7, 831-836.

Schraven, B., and Peter, M. E. (1995). **APO-1(CD95)-mediated apoptosis in jurkat cells does not involve src kinases or CD45.** *FEBS Lett* 368, 491-494.

Schuitemaker, H., Meyaard, L., Koostra, N. A., Otto, S. A., Dubbes, R., Tersmette, M., Heeney, J. L., and Miedema, F. (1993). **Lack of T cell dysfunction and programmed cell death in human immunodeficiency virus type 1-infected chimpanzees correlates with absence of monocytotropic variants.** *J. Infect. Dis* 168, 1190-1197.

Schwartz, R. H. (1996). **Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism.** *J. Exp. Med* 184, 1-8.

Scott, P. (1993). **Selective differentiation of CD4+ T helper cell subsets.** *Cur. Opin. Immunol* 5, 391-397.

Shaw, A. S., Amrein, K. E., Hammond, C., Stern, D. F., Sefton, B. M., and Rose, J. K. (1989). **The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain.** *Cell* 59, 627-636.

Shaw, A. S., Chalupny, J., Whitney, J. A., Hammond, C., Amrein, K. E., Kavathas, P., Sefton, B. M., and Rose, J. K. (1990). **Short related sequences in the cytoplasmic domains of CD4 and CD8 mediate binding to the amino-terminal domain of the p56<sup>lck</sup> tyrosine protein kinase.** *Mol. Cell. Biol.* 10, 1853-1862.

Shaw, G. M., Hahn, B. H., Arya, S. K., Groupman, J. E., Gallo, R. C., and Wong-Staal, F. (1984). **Molecular characterization of human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type III in the acquired immune deficiency syndrome.** *Science* 226, 1165-1171.

Shen, Y., and Shenk, T. E. (1995). **Viruses and apoptosis.** *Curr. Op. Gen. Dev.* 5, 105-111.

Shin, J., Doyle, C., Yang, Z., Kappes, D., and Strominger, J. L. (1990). **Structural features of the cytoplasmic region of CD4 required for internalization.** *EMBO. J* 9, 425-434.

Shin, J., Dunbrack, R. I., Lee, S., and Strominger, J. L. (1991). **Phosphorylation-dependent down-modulation of CD4 requires a specific structure within the cytoplasmic domain of CD4.** *J. Biol. Chem* 266, 10658-10665.

Shisler, J., Yang, C., Walter, B., Ware, C. F., and Gooding, L. R. (1997). **The adenovirus E3-10.4/14.5K complex mediates loss of cell surface Fas (CD95) and resistance to Fas-induced apoptosis.** *J. Virol.* 71, 8299-8306.

Shoeman, R. L., Höner, B., Stoller, T. J., Kesselmeier, C., Miedel, M. C., Traub, P., and Graves, M. C. (1990). **Human immunodeficiency virus type 1 protease cleaves the intermediate filament proteins vimentin, desmin, and glial fibrillary acidic protein.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 6336-6340.

Sieg, S., King, C., Huang, Y., and Kaplan, D. (1996). **The role of interleukin-10 in the inhibition of T cell proliferation and apoptosis mediated by parainfluenza virus type 3.** *J. Virol* 70, 4845-4848.

Sieg, S., Smith, D., Yildirim, Z., and Kaplan, D. (1997). **Fas ligand deficiency in HIV disease.** *Proc. Natl. Acad. sci.* 94, 5860-5865.

Sieg, S., Yildirim, Z., Smith, D., Kayagaki, N., Yagita, H., Huang, Y., and Kaplan, D. (1996). **Herpes Simplex Virus Type 2 inhibition of Fas ligand expression.** *J. Virol* 70, 8747-8751.

Sieh, M., Bolen, J. B., and Weiss, A. (1993). **CD45 specifically modulates binding of lck to a phosphopeptide encompassing the negative regulatory tyrosine of lck.** *EMBO. J.* 12, 315-321.

Siliciano, R. F. (1996). **The role of CD4 in HIV envelope-mediated pathogenesis,** Springer Edition, *The CD4 molecule: roles in T lymphocytes and in HIV disease,* D. R. Littman, ed.

Sleckman, B. P., Peterson, A., Foran, J. A., Gorga, J. C., Kara, C. J., Strominger, J. L., Burakoff, S. J., and Greenstein, J. L. (1988). **Functionnal analysis of**

**cytoplasmic domain-deleted mutant of the CD4 molecule.** *J. Immunol* 141, 49-54.

Sodroski, J., Goh, W. C., Rosen, C., Campbell, K., and Haseltine, W. A. (1986). **Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity.** *Nature* 322, 470-474.

Speth, C., Kacani, L., and Dierich, M. P. (1997). **Complement receptors in HIV infection.** *Immunol. Rev* 159, 49-67.

Spits, H., Borst, J., Terhorst, C., and de Vries, J. E. (1982). **The role of T cell differentiation markers in antigen-specific and lectin-dependent cellular cytotoxicity mediated by T8<sup>+</sup> and T4<sup>+</sup> human cytotoxic T cell clones directed at class I and class II MHC antigens.** *J. Immunol.* 129, 1563-1569.

Sprent, J., and Tough, D. F. (1994). **Lymphocyte life-span and memory.** *Nature* 265, 1395-1400.

Stanley, S. K. (1992). **CD34<sup>+</sup> bone marrow cells are infected with HIV in a subset of seropositive individuals.** *J. Immunol* 149, 689-697.

Stevenson, M., Haggerty, S., Lamonica, C. A., Meier, C. M., Welch, S.-K., and Wasiak, A. J. (1990). **Integration is not necessary for expression of human immunodeficiency virus type 1 protein products.** *J. Virol* 64, 2421-2425.

Stevenson, M. C., Meier, A. M., Mann, A. M., Chapmann, N., and Wasiak, A. (1988). **Envelope glycoprotein of HIV induces interferences and cytolysis resistance in CD4<sup>+</sup> cells: mechanism for persistence in AIDS.** *Cell* 53, 483-496.

Stewart, S. A., Poon, B., Jowett, J. B., and Chen, I. S. (1997). **vpr induces apoptosis following cell cycle arrest.** *J. Virol* 71, 5579-5592.

Strack, P. R., Frey, M. W., Rizzo, C. J., Cordova, B., George, H. J., Meade, R., Ho, S. P., Tritch, R., and Korant, B. D. (1996). **Apoptosis mediated by HIV protease is preceded by cleavage of Bcl-2.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 9571-9576.

Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1996). **Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptotic protease.** *J. Exp. Med* 184, 1331-1341.

Teodoro, J. G., and Branton, P. E. (1997). **Regulation of apoptosis by viral gene products.** *J. Virol* 71, 1739-1746.

Tersmette, M., Gruters, R. A., de Wolf, F., de Goede, R. E., Lange, J. M., Schellekens, P. T., Goudsmit, J., Huisman, H. G., and Miedema, F. (1989). **Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates.** *J. Virol* 63, 2118-2125.

Thompson, C. B., Wang, C. Y., Ho, I. C., Bohjanen, P. R., Petryniak, B., June, C. H., Miesfeldt, S., Zhang, L., Nabel, G. J., Karpinski, B., and Leiden, J. M. (1992). **Cis-acting sequences required for inducible interleukin-2 enhancer function bind a novel ets-related protein, Elf-1.** *Mol. Cell. Biol.* 12, 1043.

Tian, H., Lempicki, R., King, L., Donoghue, E., Samelson, L. E., and Cohen, D. I. (1995). **HIV envelope-directed signaling aberrancies and cell death of CD4<sup>+</sup> T cells in the absence of TCR co-stimulation.** *Int. Immunol.* 8, 65-74.

Tite, J. P., Sloan, A., and Janeway, C. A. (1986). **The role of L3T4 in T cell activation: L3T4 may be both an Ia-binding protein and a receptor that transduces a negative signal.** *J. Mol. Cell. Immunol* 2, 179-190.

Toyoshima, F., Moriguchi, T., and Nishida, E. (1997). **Fas induces cytoplasmic apoptotic responses and activation of the MKK7-JNK/SAPK and MKK6-p38 pathways independent of CPP32-like proteases.** *J. Cell Biol* 139, 1005-1015.

Tremblay, M., Meloche, S., Gratton, S., Wainberg, M. A., and Sékaly, R. P. (1994). **Association of p56<sup>lck</sup> with cytoplasmic domain of CD4 modulates HIV-1 expression.** *EMBO. J* 13, 774-783.

Trkola, A., Dragic, T., and Arthos, J. (1996). **CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5.** *Nature* 384, 184-187.

Trono, D. (1995). **HIV accessory proteins: leadind roles for the supporting cast.** *Cell* 82, 189-192.

Tuosto, L., Piazza, C., Moretti, S., Modesti, A., Greenlaw, R., Lechler, R., Lombardi, G., and Piccolella, E. (1995). **Ligation of either CD2 or CD28 rescues CD4<sup>+</sup> T cells from HIV-gp120-induced apoptosis.** *Eur. J. Immunol* 25, 2917-2922.

Valentin, H., Nugeyre, M.T., Vuillier, F., Boumsell, L., Schmid, M., Barré Sinoussi, F., and Pereira, R.A. (1994). **Two subpopulations of human triple negative thymic cells are susceptible to infection by human immunodeficiency virus type 1 in vitro.** *J. Virol* 68, 3041-3050.

Vaux, D. L., Weissman, I. L., and Kim, S. K. (1992). **Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2.** *Science* 258, 1955-1957.

Veillette, A., Bookman, M. A., Horak, E. M., Samelson, L. E., and Bolen, J. B. (1989). **Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-kinase p56<sup>lck</sup>.** *Nature* 338, 257-259.

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.

Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., and Alizon, M. (1985). **Nucleotide sequence of AIDS virus, LAV.** *Cell* 40, 9-17.

Wang, H.-G., Rapp, U. R., and Reed, J. C. (1996). **Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria.** *Cell* 87, 629-638.

Wang, X. W., Vermeulen, W., Coursen, J. D., Gibson, M., Lupold, S. E., Forrester, K., Xu, G. W., Elmore, L., Yeh, H., Hoeijmakers, J. H. J., and Harris, C. C. (1996). **The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway.** *Genes Dev* 10, 1219-1232.

Wang, Z.-q., Dudhane, A., Orlikowsky, T., Clarke, K., Li, X., Darzynkiewicz, Z., and Hoffmann, M. K. (1994). **CD4 engagement induces Fas antigen-dependent apoptosis of T cells in vivo.** *Eur. J. Immunol.* 24, 1549-1552.

Wang, Z.-q., Orlikowsky, T., Dudhane, A., Mittler, R., Blum, M., Lacy, E., Reithmüller, G., and Hoffman, M. K. (1994). **Deletion of T lymphocytes in human CD4 transgenic mice induced by HIV-gp120 and gp120-specific antibodies from AIDS patients.** *Eur. J. Immunol* 24, 1553-1557.

Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., Hahn, B.H., et al (1995). **Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection.** *Nature* 373, 117-122.

Weil, R., and Veillette, A. (1996). **signal transduction by the lymphocyte-specific tyrosine protein kinase p56<sup>lck</sup>,** Springer Edition, *The CD4 molecule: roles in T lymphocytes and in HIV disease*, D. R. Littman, ed.

Weinberg, J. B., Matthews, T. J., Cullen, B. R., and Malim, M. H. (1991). **Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferative human monocytes.** *J. Exp. Med* 174, 1477-1482.

Weiss, A., and Littman, D. R. (1994). **Signal transduction by lymphocyte antigen receptors.** *Cell* 76, 263-274.

Westendorp, M. O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K.-M., and Krammer, P. H. (1995). **Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120.** *Nature* 375, 497-500.

Westendorp, M. O., Shatrov, V. A., Schulze-Osthoff, K., Frank, R., and Kraft, M. (1995). **HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NFκB activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state.** *EMBO J* 14, 546-554.

Williams, A. F., and Barclay, A. N. (1988). **The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition.** *Annu. Rev. Immunol* 6, 381-405.

Wong, B., Arron, J., and Choi, Y. (1997). **T cell receptor signals enhance susceptibility to Fas-mediated apoptosis.** *J. Exp. Med* 186, 1939-1944.

Wu, H., Kwong, P. D., and Hendrickson, W. A. (1997). **Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4.** *Nature* 387, 527-530.

Wu, L., Gerard, N. P., and Wyatt, R. (1996). **CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR5.** *Nature* 384, 179-183.

Yew, P. R., and Berk, A. J. (1992). **Inhibition of P53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein.** *Nature* 357, 82-85.

Zack, J. A., Arrigo, S. J., Weitsman, S. R., Go, A. S., Haislip, A. M., and Chen, I. S. Y. (1990). **HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes molecular analysis reveal a labile latent viral structure.** *Cell* 61, 213-222.

Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., and Kroemer, G. (1996). **Mitochondrial control of nuclear apoptosis.** *J. Exp. Med* 183, 1533-1544.

Zauli, G., Gibellini, D., Caputo, A., Bassini, A., Negrini, M., Monne, M., Mazzoni, M., and Capitani, S. (1995). **The human immunodeficiency virus type-1 Tat protein upregulates Bcl-2 gene expression in Jurkat T-cell lines and primary peripheral blood mononuclear cells.** *Blood* 86, 3823-3834.

Zauli, G., Gibellini, D., Celeghini, C., Mischiati, C., Bassini, A., La Placa, M., and Capitani, S. (1996). **Pleiotropic effects of immobilized versus soluble recombinant HIV-1 Tat protein on CD3 -mediated activation, induction of apoptosis, and HIV-1 long terminal repeat transactivation in purified CD4+ T lymphocytes.** *J. Immunol.* 157, 2216-2224.

Zauli, G., Gibellini, D., Milani, D., Mazzoni, M., Borgatti, P., La Placa, M., and Capitani, S. (1993). **HIV-1 tat protein protects lymphoid, epithelial and neuronal cell lines from death by apoptosis.** *Cancer Res* 53, 4481-4485.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutshg, A., and Wang, X. (1997). **Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3.** *Cell* 90, 405-413.

