

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
INSTITUT ARMAND-FRAPPYER

Mémoire présenté à  
l'INRS-Institut Armand-Frappier  
comme exigence partielle de la maîtrise en virologie et immunologie

**CONSTRUCTION DE TROIS VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE DE  
TYPE 1 (VIH-1) PORTANT DES MUTATIONS DANS LE GÈNE *nef* :  
CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DU RÔLE DE Nef DANS LA PATHOGENÈSE  
ASSOCIÉE À L'INFECTION VIRALE**

Par

Jupiter SENE

sous la direction du Dr Lise Thibodeau

membres du jury d'évaluation :  
Dr Albert Descôteaux (président du jury)  
Dr Benoit Barbeau  
Dr Lise Thibodeau

Mars 2002

*À la mémoire de ma tante,  
Mame Kouna Diop (13 Février 1953- 13 Mars 2002), qui fut de près ou de  
loin, une grande source de motivation et d'encouragement (Que la terre lui  
soit légère).*

*À mes parents,  
Hamed et Marième, pour m'avoir donné tout ce qu'il faut pour réussir.*

*À mon épouse, Adjì.*

*Ô vous la génération des jeunes!  
Si vous redoutez la honte, faites précéder l'action de la science.  
Hâtez-vous à la recherche du savoir  
et combattez vos âmes charnelles pour la compréhension!  
Ne remettez pas la recherche du savoir à votre âge adulte,  
car cela prive de l'éminence.*

*KHADIMOU RASSOUL*

## TABLES DES MATIÈRES

<b>Table des matières</b> .....	<b>iii</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>vii</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>viii</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Revue bibliographique</b> .....	<b>6</b>
2.1 Syndrome de l'immunodéficience acquise humaine (SIDA).....	7
2.1.1 Historique.....	7
2.1.2 Modes de transmission.....	9
2.1.3 Évolution de la maladie.....	9
2.1.3.1 Primo-infection.....	9
2.1.3.2 Infection asymptomatique et lympho-adénopathie généralisée.....	10
2.1.3.3 Infection symptomatique.....	11
2.2 Virus de l'immunodéficience humaine (VIH).....	11
2.2.1 Taxonomie des <i>Retroviridae</i> .....	11
2.2.2 Hétérogénéité du VIH.....	12
2.2.3 Morphologie du virion.....	13
2.2.4 Génome.....	13
2.2.5 Protéines du virion.....	18
2.2.5.1 Protéines internes.....	18
2.2.5.2 Enveloppe.....	19
2.2.5.3 Protéines de régulation.....	20
2.2.5.3.1 Tat.....	20
2.2.5.3.2 Rev.....	20
2.2.5.4 Protéines accessoires.....	21
2.2.5.4.1 Vif.....	21
2.2.5.4.2 Vpr.....	22
2.2.5.4.3 Vpu.....	22
2.2.5.4.4 Vpx.....	23
2.2.5.4.5 Nef.....	24
2.2.6 Réplication virale.....	24
2.2.6.1 Tropisme cellulaire.....	24
2.2.6.2 Récepteurs.....	25
2.2.6.3 Co-récepteurs.....	26
2.2.6.4 Cycle de la réplication virale.....	27
2.2.6.4.1 Attachement et entrée du virus.....	27

2.2.6.4.2 Synthèse et intégration de l'ADN viral .....	28
2.2.6.4.3 Régulation de l'expression des gènes viraux.....	29
2.2.6.4.4 Assemblage et bourgeonnement du virion .....	29
2.3 Protéine Nef.....	30
2.3.1 Généralités.....	30
2.3.2 Principaux effets de Nef dans la cellule.....	34
2.3.2.1 Internalisation et dégradation de la molécule CD4.....	34
2.3.2.2 Régulation négative du CMH-I .....	36
2.3.2.3 Altérations dans les voies de signalisation par Nef.....	36
2.3.3 Protéines interagissant avec Nef .....	40
2.3.4 Rôle de Nef dans la pathogenèse.....	41
2.3.5 Rôle de Nef dans l'infectivité virale <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> .....	43
2.4 Hypothèses et Objectifs.....	46
<b>3. Approche expérimentale.....</b>	<b>49</b>
3.1 Construction des provirus mutants.....	50
3.1.1 pNL4.3 : le provirus sauvage.....	50
3.1.2 Description des provirus isogènes construits.....	50
3.1.3 Mutagenèse dirigée par PCR .....	58
3.1.3.1 Les oligonucléotides.....	58
3.1.3.2 Les réactions d'amplification par PCR.....	60
3.1.3.3 Analyse électrophorétique des produits PCR .....	61
3.1.3.4 Clonage des fragments PCR.....	62
3.1.4 Amplification et purification des plasmides.....	62
3.1.4.1. Transformation bactérienne.....	62
3.1.4.2 Minipréparation de plasmides.....	63
3.1.4.3 Maxipréparation de plasmides.....	64
3.1.5 Analyse des plasmides.....	66
3.1.5.1 Évaluation des quantités d'ADN par spectrophotométrie.....	66
3.1.5.2 Digestion avec des endonucléases de restriction .....	66
3.1.5.3 Analyse électrophorétique sur gel d'agarose.....	67
3.1.5.4 Analyse des provirus isogènes par séquençage.....	67
3.2 Production des virus isogènes dans les cellules CEM.....	68
3.2.1 Lignée cellulaire CEM.....	68
3.2.2 Transfection des cellules CEM.....	69
3.2.3 Infection des cellules CEM.....	70
3.2.3.1 Production des banques virales.....	70
3.2.3.2 Évaluation des effets cytopathogènes.....	71
3.2.4 Analyse des progénitures virales.....	71
3.2.4.1 Amplification du gène <i>nef</i> par RT-PCR.....	71
3.2.4.2 Analyse des nucléotides par séquençage.....	72
3.2.4.3 Détection des protéines virales du VIH par immunofluorescence indirecte.....	73
3.2.4.4 Titrage viral.....	74
3.2.4.5 Détermination de la cinétique de réplication virale.....	75
3.3 Production de la protéine Nef recombinante dans les cellules High-Five.....	75

3.3.1 Lignée cellulaire High-Five.....	76
3.3.2 Infection des cellules High-Five.....	76
3.3.3 Extraction de la protéine Nef.....	77
3.3.4 Purification de la protéine Nef.....	78
3.3.5 Analyse physico-chimique de la protéine Nef recombinante.....	78
3.3.5.1 Évaluation de la concentration en protéine par le test de Bio-Rad.....	78
3.3.5.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	79
3.3.5.2.1 Préparation des gels et des échantillons.....	79
3.3.5.2.2 Analyse électrophorétique.....	80
3.4 Essais sur le rôle de Nef dans la cytopathogénicité et l'infectivité du VIH-1 LAI dans les cellules CEM.....	80
3.4.1 Rôle de la protéine Nef dans cytopathogénicité associée à l'infection.....	80
3.4.2 Rôle de la protéine Nef dans l'infectivité du VIH-1 LAI .....	81
<b>4. Résultats.....</b>	<b>82</b>
4.1 Construction des provirus mutants isogènes.....	83
4.2 Les virus mutants isogènes VIH CDS1, CDS2 et CDS1.2.....	94
4.2.1 Production d'une banque virale par transfection de cellules CEM avec les provirus isogènes mutants.....	94
4.2.2 Caractérisation physique du génotype des virus mutants isogènes par séquençage.....	100
4.2.3 Caractérisation biologique des virus mutants isogènes.....	101
4.2.3.1 Potentiel d'expression des différentes formes de la protéine Nef des virus mutants isogènes.....	101
4.2.3.2 Analyse phénotypique des virus mutants isogènes de la protéine Nef.....	106
4.3 Production et purification de la protéine Nef recombinante.....	114
4.4 Essais sur le rôle de la protéine Nef dans la cytopathogénicité et l'infectivité du VIH-1 LAI dans les cellules CEM.....	119
4.4.1 Rôle de la protéine Nef recombinante dans la cytopathogénicité du VIH-1 LAI dans les cellules CEM.....	119
4.4.2 Rôle de la protéine Nef dans l'infectivité VIH-1 LAI .....	120
<b>5. Discussion.....</b>	<b>126</b>
<b>6. Conclusion.....</b>	<b>139</b>
<b>7. Remerciements.....</b>	<b>144</b>
<b>8. Bibliographie.....</b>	<b>146</b>
<b>9. Annexes.....</b>	<b>175</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Séquences des différents oligonucléotides utilisés.....	59
Tableau II-A :	Analyse phénotypique du mutant isogène VIH-1 CDS1.....	112
Tableau II-B :	Analyse phénotypique du mutant isogène VIH-1 CDS2.....	112
Tableau II-C :	Analyse phénotypique du mutant isogène VIH-1 CDS1.2.....	112
Tableau II-D :	Analyse phénotypique du virus sauvage VIH-1 NL4.3.....	112
Tableau III :	Détermination des titres des virus mutants VIH-1 CDS1, VIH-1 CDS2, VIH-1 CDS1.2 et du virus sauvage VIH-1 NL4.3 7 jours post-infection .....	113
Tableau IV :	Fréquence relative de la formation de syncytia associés à des vacuoles dans les cellules CEM 7 jours post-infection avec les virus isogènes et sauvages.....	115
Tableau V :	Rôle de la protéine Nef recombinante dans la cytopathogénicité du VIH-1 LAI .....	123
Tableau VI :	Détermination des titres du VIH-1 LAI en présence ou non de la protéine Nef recombinante 7 jours post-infection.....	124

## LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Représentation schématique du VIH.....	14
Figure 2:	Organisation génomique des lentivirus de primates.....	16
Figure 3:	Représentation schématique des différentes régions conservées de la protéine Nef .....	32
Figure 4:	Cartographie du plasmide pNL4.3.....	51
Figure 5:	Séquence partielle de pNL4.3 contenant le gène <i>nef</i> .....	54
Figure 6:	Séquences partielles du gène <i>nef</i> des différents provirus isogènes .....	56
Figure 7:	Mutagenèse dirigée par PCR des provirus mutants isogènes pNL4.3 CDS1, CDS2 et CDS1.2.....	84
Figure 8:	Analyse du produit des réactions PCR-1, PCR-2 et PCR-3 sur un gel d'agarose 1,8%.....	86
Figure 9:	Analyse du produit des réactions PCR-4 et PCR-5 sur un gel d'agarose 1,8%.....	88
Figure 10:	Analyse des inserts mutants homologues sur un gel d'agarose 1,8% avant le clonage de ces derniers dans pNL4.3 .....	90
Figure 11:	Microphotographie de culture de cellules CEM transfectées exprimant les protéines du VIH détectées par immunofluorescence indirecte.....	95
Figure 12:	Microphotographie de cellules CEM infectées par les virus mutants ...	98
Figure 13:	Analyse du produit de l'amplification du gène <i>nef</i> des différents virus isogènes obtenu par RT-PCR.....	102
Figure 14:	Profils de séquençage partiel du gène <i>nef</i> des virus mutants VIH-1 CDS1, VIH-1 CDS2 et VIH-1 CDS1.2.....	104
Figure 15:	Séquence de la protéine Nef potentiellement exprimée par les virus mutants isogènes.....	107
Figure 16:	Analyse de la protéine Nef recombinante sur gel de polyacrylamide 14%.....	117
Figure 17 :	Effet de Nef sur les cellules CEM non infectées.....	121



**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

A <sub>230</sub>	=	Absorbance à 230
A <sub>260</sub>	=	Absorbance à 260
ADN	=	Acide désoxyribonucléique
AIDS	=	“Acquired immunodeficiency syndrome” (syndrome de l’immunodéficience acquise)
AP-1	=	“Activator protein-1”
Arg	=	Arginine
ARN	=	Acide ribonucléique
ARNm	=	Acide ribonucléique messenger
ARNt	=	Acide ribonucléique de transfert
ARV	=	“AIDS-related virus” (virus relié au SIDA)
ATPase	=	Adénosine triphosphatase
BSA	=	Albumine sérique bovine
°C	=	Degré Celsius
CA	=	Capside
Ca <sup>++</sup>	=	Ion calcium
CDC	=	“Centers for Disease Control and Prevention”
CEM	=	Cellules lymphoblastoïdes humaines CD4+
Ci	=	Curie
CCR	=	“C-C-linked chemokine receptor” (récepteur de chimiokine avec des liaisons C-C)
cm	=	Centimètre (10 <sup>-2</sup> mètre)
CMH	=	Complexe majeur d’histocompatibilité

CO <sub>2</sub>	=	Bioxyde de carbone
cpe	=	Effet cytopathogène
CTL	=	“Cytotoxic T lymphocyte” (lymphocyte T cytotoxique)
CXCR	=	“CXC-linked chemokine receptor” (récepteur de chimiokine lié à CXC)
DAG	=	Diacylglycérol
DICT <sub>50</sub>	=	Dose infectieuse à 50% en culture de tissus.
DMSO	=	Diméthyl sulfoxyde
dNTP	=	Désoxyribonucléoside 5'-triphosphate
D.O	=	Densité optique
EBV	=	“Epstein-Barr virus” (virus Epstein-Barr)
E	=	Enveloppe
EDTA	=	Acide éthylène diamine tétraacétique de sodium
ELISA	=	“Enzyme-linked immunosorbant assay”
<i>env</i>	=	Gène codant pour l'enveloppe
FasL	=	“Fas ligand” (ligand de Fas)
FIV	=	“Feline immunodeficiency virus” (virus de l'immunodéficience féline)
<i>gag</i>	=	“Group-specific antigen gene” (gène codant pour l'antigène spécifique de groupe)
Gly	=	Glycine
GTP	=	Guanosine triphosphate
GTPase	=	Guanosine triphosphatase
Hck	=	“Human haematopoietic cell kinase”
HCl	=	Acide chlorhydrique

IFN	=	Interféron
IL-2	=	Interleukine-2
IL-6	=	Interleukine-6
IL-15	=	Interleukine-15
IN	=	Intégrase
IP <sub>3</sub>	=	Inositol triphosphate
gp	=	Glycoprotéine
kb	=	Kilo paires de bases (10 <sup>3</sup> paires de bases)
KCl	=	Chlorure de potassium
kDa	=	Kilodalton (10 <sup>3</sup> dalton)
L	=	Litre
LAV	=	“Lymphadenopathy-associated virus”(virus associé à une lymphoadénopathie)
LB	=	milieu “L-Broth”
LTR	=	“Long terminal repeat” (longues séquences répétitives aux extrémités)
M	=	Molaire
MA	=	Matrice
MAP	=	“Mitogen activated protein”
MAPK	=	“Mitogen activated protein kinase”
μCi	=	MicroCurie (10 <sup>-6</sup> Curie)
Met	=	Méthionine
mg	=	Milligramme (10 <sup>-3</sup> gramme)
μg	=	Microgramme (10 <sup>-6</sup> gramme)

MgCl <sub>2</sub>	=	Chlorure de magnésium
MIP	=	“Macrophage inflammatory protein” (protéine macrophagique inflammatoire)
mL	=	Millilitre (10 <sup>-3</sup> litre)
μL	=	Microlitre (10 <sup>-6</sup> litre)
μM	=	Micromolaire (10 <sup>-6</sup> molaire)
MOI	=	“Multiplicity of infection” (indice de multiplicité d’infection)
NaCl	=	Chlorure de sodium
NAK	=	“Nef associated-kinase” (Kinase associée Nef)
NC	=	Nucléocapside
<i>nef</i>	=	“Negative regulation factor gene” (gène qui code pour le facteur de régulation négatif)
Nef	=	Produit du gène <i>nef</i>
NF-κB	=	“Nuclear factor- kappa B” (facteur nucléaire des cellules B)
ng	=	Nanogramme (10 <sup>-9</sup> gramme)
NK	=	“Natural killer”
NSI	=	Non inductrice de syncytia
ORF	=	“Open reading frame” (cadre de lecture ouvert)
P	=	Protéine
PAK	=	“p21-activated kinase”
PAL	=	Phospholipase C
pb	=	Paire de bases
PBL	=	“Peripheral blood lymphocyte” (lymphocyte du sang périphérique)
PBS	=	“Phosphate buffered saline” (solution saline tamponnée contenant des ions phosphates)

PCR	=	“Polymerase chain reaction” (réaction de polymérisation en chaîne)
PEG	=	Polyéthylène glycol
PHA	=	Phytohémagglutinine
p.i.	=	Post-infection
PKC	=	Protéine kinase C
PMSF	=	“Phenylmethylsulfonyl fluoride” (fluorure de phénylméthylsulfonyl)
<i>pol</i>	=	Gène qui code pour la polymérase
POL	=	Polymérase
PPT	=	“Polypurine tract”
PR	=	Protéase
PrBS	=	“Primer binding site” (site de liaison de l’amorce)
RE	=	Réticulum endoplasmique
<i>rev</i>	=	“Regulator of virion protein expression gene” (gène codant pour le régulateur de l’expression des protéines virales)
Rev	=	Produit du gène <i>rev</i>
RNAse H	=	Ribonucléase H
rpm	=	Révolution par minute
RPMI	=	Milieu de culture pour les cellules CEM développé au “Roswell Park Memorial Institute”
RRE	=	“ <i>rev</i> responsive element”
RT	=	Rétro transcriptase ou transcriptase inverse
SDS	=	Sodium dodécyl sulfate
SFB	=	Sérum fœtal bovin

SI	=	Inductrice de syncytia
SIDA	=	Syndrome de l'immunodéficience acquise
SIV	=	"Simian immunodeficiency virus" (virus de l'immunodéficience simienne)
SH3	=	Domaine "Src homology 3"
STLV-III	=	"Simian T-lymphotropic virus type III"
HTLV-III	=	"Human T-lymphotropic virus type III"
TAE	=	Tris-acétate/EDTA (tampon d'électrophorèse)
<i>tat</i>	=	" <i>Trans</i> -activating transcriptional regulator gene" (gène codant pour le régulateur activant en <i>trans</i> la transcription)
TAR	=	"Trans activating region"
Tat	=	Produit du gène <i>tat</i>
TCR	=	"T cell receptor" (récepteur des cellules T)
TE	=	Tris-EDTA
TEMED	=	N-N-N'-N'-tétraméthylènediamide
Thr	=	Thréonine
T <sub>m</sub>	=	"Melting temperature"
TM	=	Région transmembranaire de la glycoprotéine de l'enveloppe
TNF	=	"Tumor necrosis factor" (facteur de la nécrose des tumeurs)
U	=	Unité
UV	=	Ultraviolet
VAEC	=	Virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre
VAEI	=	Virus de l'anémie infectieuse équine
V-ATPase	=	"Vacuolar ATPase" (ATPase vacuolaire)

VIB	=	Virus de l'immunodéficience bovine
VIF	=	Virus de l'immunodéficience féline
<i>vif</i>	=	“Virion infectivity gene” (gène de l'infectivité du virion)
ViF	=	Produit du gène <i>vif</i>
VIH	=	Virus de l'immunodéficience humaine
VIS	=	Virus de l'immunodéficience simienne
VMV	=	Virus Visna/maeddi
Vpu	=	Produit du gène <i>vpu</i>
Vpr	=	Produit du gène <i>vpr</i>
Vpx	=	Produit du gène <i>vpx</i>
V/V	=	Volume/Volume

# **SOMMAIRE**



Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) a été décrit au début des années quatre-vingt comme une maladie mortelle caractérisée par une immunodépression grave. Cette dernière est à l'origine de la vulnérabilité à un grand nombre de microorganismes pathogènes responsables de diverses infections opportunistes et de certaines formes rares de néoplasmes. Divers travaux sur le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), l'agent étiologique du SIDA, postulent l'existence d'une corrélation entre le rôle de certains gènes viraux et le développement de la maladie. Le gène *nef*, en particulier, a fait l'objet de nombreuses études. Malgré toutes les connaissances à date sur ses fonctions *in vitro* et *in vivo*, la corrélation entre la présence d'un gène *nef* défectif ou intact et la progression ou non de la maladie présente encore certaines ambiguïtés et quelques controverses. En effet, cette corrélation était basée sur le degré de compréhension de son importance dans le cycle viral et sur les effets protecteurs des vaccins vivants atténués dans le modèle animal. De plus, la faible virémie et l'absence d'évidence de progression vers le SIDA observées chez des macaques adultes ou chez des humains infectés, respectivement, par le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) ou le VIH portant des mutations dans le gène *nef* suggéraient également l'implication de ce gène dans le développement de la maladie.

Le principal objectif de ce travail était de construire des VIH-1 mutants pour le gène *nef*, permettant, à l'issue de leur caractérisation biologique, d'apporter une contribution dans l'étude du rôle de la protéine Nef dans la cytopathogénicité, dans la cinétique de la réplication et/ou dans l'augmentation de l'infectivité virale *in vitro*. Les mutations dans le gène *nef* introduites par mutagenèse dirigée par PCR nous auront permis de produire : a) un virus potentiellement négatif pour la protéine Nef, le VIH-1

CDS1.2; b) un second virus qui n'exprime que les résidus 1-19 de la région N-terminale de la protéine Nef, le VIH-1 CDS2; et c) un dernier virus qui n'exprime que les résidus 20-206 de la protéine, le VIH-1 CDS1. Ces virus construits et caractérisés sur le plan physique et partiellement sur le plan biologique ont été réalisés de façon à pouvoir vérifier le rôle de la région N-terminale dans la cinétique de réplication virale, dans l'infectivité et dans la cytopathogénicité. De plus, l'hypothèse de l'implication du potentiel fusogénique associé à la région N-terminale dans le processus de fusion cellulaire aboutissant à la formation des vacuoles qui caractérise les effets cytopathogènes de l'infection par le VIH-1 *in vitro* a été étudiée. Cette étude visait à évaluer ce potentiel (antérieurement décrit et observé sur les liposomes et sur les immunosomes-Nef) dans le contexte d'une infection virale *in vitro*. Finalement, des essais sur le rôle de la protéine Nef recombinante fournie en *trans* dans la cytopathogénicité et l'infectivité du VIH-1 LAI dans les cellules CEM ont été effectués.

Les résultats obtenus suggèrent l'existence d'une corrélation entre la présence des résidus 20-206 de la protéine Nef et le maintien des titres viraux à des niveaux élevés *in vitro*. Quant à la courte portion N-terminale formée par les résidus 1-19, elle serait plutôt impliquée dans les aspects qualitatifs et quantitatifs des effets cytopathogènes produits. La protéine recombinante Nef produite dans le système d'expression baculoviral a été purifiée sur colonne héparine-sépharose à plus de 80% d'homogénéité. Lorsque les cellules CEM ont été préalablement mises en contact avec la protéine Nef avant l'infection par le VIH-1 LAI, nous avons enregistré une augmentation du rendement en virus infectieux, en corrélation avec les effets cytopathogènes observés dans les cellules infectées.

En dernière analyse, grâce à la caractérisation physique et biologique des virus mutants construits ainsi que les essais sur le rôle de la protéine Nef recombinante fournie en *trans* dans la cytopathogénicité et l'infectivité du VIH-1 LAI dans les cellules CEM, nous avons montré que la protéine Nef était impliquée dans la régulation de différentes étapes du cycle de la réplication du virus, dans l'augmentation de l'infectivité virale et dans la cytopathogénicité. De plus, le potentiel fusogénique de la région N-terminale semble se manifester dans l'aspect qualitatif des effets cytopathogènes produits lors d'infections des cellules CEM, en modulant le degré de la formation des syncytia et de vacuoles résultant de la mise en commun des membranes plasmiques des cellules fusionnées. Ainsi, les résultats issus de cette étude nous permettent d'appuyer l'hypothèse de l'implication de Nef dans la progression de la maladie en facilitant la réplication virale à des niveaux plus élevés. De plus, la cytotoxicité directe de Nef sur les cellules constituerait un autre mécanisme permettant d'expliquer la déplétion encore très ambiguë des lymphocytes CD4<sup>+</sup> chez les sidéens. Donc, il demeure nécessaire et très pertinent de poursuivre les travaux sur le produit du gène *nef* afin de mieux cerner les propriétés de ce dernier et de mieux évaluer son implication dans la progression de la maladie, car les perspectives de développement de nouvelles stratégies de vaccins préventifs et/ou thérapeutiques chez l'humain contre l'infection par le VIH et l'évolution de la maladie mortelle induite restent encore très prometteuses.

# **1. INTRODUCTION**

Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) est défini comme une maladie infectieuse résultant de la destruction progressive des lymphocytes T CD4+, essentiels à l'induction de la réponse immunitaire de l'organisme. L'effondrement du système immunitaire se traduit par une grande vulnérabilité à tous les microorganismes pathogènes de l'environnement avec l'apparition d'infections opportunistes qui sont finalement responsables de la mort du patient.

L'agent étiologique du SIDA, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), est un rétrovirus des plus complexes qui continue à se propager rapidement à travers le monde. Selon le document intitulé "Le Point sur l'épidémie de SIDA" (communiqué de presse de l'ONUSIDA, décembre 2000), 36,1 millions de personnes dans le monde vivent aujourd'hui avec le VIH/SIDA. En Afrique subsaharienne, 3,8 millions d'adultes et d'enfants ont été infectés par le VIH en l'an 2000, ce qui porte à 25,3 millions le total des personnes qui vivent avec le VIH/SIDA dans cette région. Pendant cette même période, des millions de personnes infectées depuis quelques années déjà sont devenues symptomatiques et plus de 2,4 millions, rendues à un stade plus avancé de l'infection, sont déjà mortes de maladies liées au VIH. En 1999, les décès dûs au SIDA avaient atteint le chiffre record de 2,6 millions.

Compte tenu de l'issue fatale de cette maladie et de sa progressive expansion, la communauté scientifique s'est beaucoup engagée depuis les vingt dernières années dans la recherche fondamentale, clinique et épidémiologique pour expliquer les mécanismes du développement de l'immunodéficience responsables de la mortalité. Aujourd'hui, les résultats des recherches sur les propriétés génétiques du VIH suggèrent l'existence d'une corrélation entre le rôle de certains gènes et le développement de la maladie. Tel est le

cas du gène *nef*, dont la corrélation avec le développement de la maladie repose sur : a) le degré de compréhension de son importance dans le cycle viral; b) sur les effets protecteurs des vaccins vivants atténués dans le modèle animal (Daniel *et al.*, 1992, Wyand *et al.*, 1996) et c) sur la faible virémie et l'absence d'évidence de progression vers le SIDA chez des macaques adultes ou des humains infectés, respectivement, par le VIS ou le VIH qui portent des mutations dans le gène *nef* (Learmont *et al.*, 1992; Deacon *et al.*, 1995).

Quelques propriétés de la protéine Nef *in vitro* pouvant jouer un rôle dans la pathogenèse du SIDA ont été décrites, dont les mieux connues sont la régulation négative de l'expression des molécules CD4 (Guy *et al.*, 1987; Salghetti *et al.*, 1995) et des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) (Schwartz *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 1998) à la surface des cellules infectées. Des effets multiples de la protéine Nef sur différentes voies de transduction de signal et des interactions avec différentes protéines cellulaires ont été également décrits (Peter, 1998, Renkema et Saksela, 2000). Le nombre et la diversité des effets causés par l'expression de la protéine Nef *in vitro* laissent croire qu'elle aurait des fonctions multiples pouvant contribuer à la pathogenèse du SIDA. Subséquemment, comme Renkema et Saksela (2000) l'ont avancé, les mécanismes possibles du développement de la pathogenèse induite par la protéine Nef *in vivo* sont très divers, tels que l'augmentation de l'infectivité des virions, l'augmentation de l'expression des gènes viraux, la facilitation du bourgeonnement de la progéniture virale, la prévention de la surinfection des cellules, la modulation de l'apoptose, l'évasion à la réponse cytotoxique et la dérégulation de l'expression des

cytokines. Toutefois, la signification de l'importance relative de ces mécanismes reste encore mal comprise.

Notre projet de recherche comprend quatre objectifs axés sur le rôle de la protéine Nef dans la cytopathogénicité et son rôle dans la cinétique de réplication du VIH-1 et/ou dans l'augmentation de l'infectivité virale.

Dans le premier volet nous avons construit trois virus VIH-1 portant des mutations dans le gène *nef*. Les différentes mutations introduites dans le gène *nef* ont été effectuées dans le but de générer un virus isogène qui serait potentiellement négatif pour la protéine Nef, et deux virus qui auront le potentiel de n'exprimer qu'un segment de cette protéine. Ces deux segments distincts sont représentés par la portion N-terminale formée par les résidus 1-19 et par la longue portion C-terminale formée par les résidus 20-206.

Dans un second volet, nous avons procédé à une caractérisation physique (génotypique) de ces virus mutants par le séquençage du gène *nef* afin de s'assurer que les mutations introduites ont été conservées dans les progénitures virales après les études phénotypiques de ces derniers.

Dans le troisième volet de cette étude, nous avons effectué une caractérisation biologique partielle (phénotypique) de ces virus par l'étude de leur cinétique de réplication comparée à celle du virus sauvage VIH-1 NL4.3 et par l'observation de leurs effets cytopathogènes *in vitro* dans les cellules CEM, comparée à ceux des virus Nef positifs VIH-1 NL4.3 et VIH-1 LAI. Le potentiel fusogénique gouverné par les 18 premiers acides aminés de la portion N-terminale de la protéine Nef, tel qu'observé sur les liposomes (Curtain *et al.*, 1994; Thibodeau, non publié) et sur les immunosomes-Nef

(Nef associée à des liposomes) (Thibodeau, non publié) a été étudié ici dans le contexte d'une infection virale *in vitro*.

Le quatrième et dernier volet de cette étude consistait à produire et à purifier la protéine Nef recombinante, puis d'effectuer des essais sur le rôle de cette protéine dans l'infectivité et dans la cytopathogénicité du VIH-1 LAI quand cette dernière est fournie en *trans*.

Les résultats obtenus seront discutés en relation avec l'implication de la propriété fusogénique de la protéine Nef dans les mécanismes de la cytopathogénicité virale observée dans les cellules CEM *in vitro*, dans la cinétique de réplication virale et/ou dans l'augmentation de l'infectivité virale. L'importance de l'augmentation de l'infectivité virale et de la cytopathogénèse induite par Nef par rapport aux autres processus de la pathogénèse associée à l'infection par le VIH sera également discutée.

La réalisation de ce projet permettra de contribuer à la compréhension du rôle de Nef dans certains aspects de la pathogénèse associée à l'infection virale tel que l'origine encore ambiguë de l'augmentation de la charge virale et de la déplétion des cellules T CD4+ chez les sidéens. De plus, ce projet contribuera à porter un regard sur les perspectives de développement de vaccins avec le produit du gène *nef*, visant à développer une immunité protectrice préventive et/ou thérapeutique de longue durée chez l'humain.



## **2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 2.1 Syndrome de l'immunodéficience acquise humaine (SIDA)

### 2.1.1 Historique

Le syndrome de l'immunodéficience acquise humaine (SIDA) a été cliniquement reconnu pour la première fois comme une maladie en 1981 (Gottlieb *et al.*, 1981). Cette maladie mortelle est caractérisée par une forte immunodépression qui favorise l'apparition d'infections opportunistes, de désordres neurologiques et de certaines formes de cancers très rares (Broder *et al.*, 1994; Levy, 1994).

L'hypothèse que le SIDA pouvait être d'origine virale n'a été confirmée qu'en 1983, lorsque Montagnier et son équipe de l'Institut Pasteur de Paris isolent, à partir de ganglions lymphatiques d'un patient qui présentait une lympho-adénopathie généralisée associée à une immunodéficience, un rétrovirus qu'ils nomment LAV ("lymphadenopathy-associated virus") (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983). Ce virus était capable de se répliquer et de provoquer des effets cytopathogènes dans des cultures de lymphocytes du sang périphérique humain (Montagnier *et al.*, 1984a). Un an plus tard, Gallo et ses collaborateurs (1984) rapportent avoir isolé un rétrovirus cytopathogène à partir des lymphocytes d'un patient qui présentait une immunodéficience sévère, qu'ils nomment HTLV-III ("Human T-lymphotropic virus type III"). Peu de temps après, un autre virus similaire a également été isolé par Levy et ses collaborateurs (1984) qu'ils ont nommé ARV ("AIDS-related virus").

L'analyse des séquences du génome et les résultats de la microscopie électronique de ces virus (LAV, HTLV-III et ARV) ont permis de démontrer qu'ils présentaient les mêmes propriétés que les lentivirus de la famille des *Retroviridae* (Gonda *et al.*, 1985; Rabson *et al.*, 1985; Sanchez-Pescador *et al.*, 1985). Il fut démontré également que le

HTLV-III était en fait le même virus que celui isolé par le groupe de Montagnier (Bryant *et al.*, 1985; Chang *et al.*, 1993; Wain-Hobson *et al.*, 1991).

Par ailleurs, en 1985, un lentivirus lié à une maladie analogue au SIDA fut isolé d'un macaque d'Asie en captivité (Daniel *et al.*, 1985). Du fait de la ressemblance morphologique avec le HTLV-III, ce virus a été nommé STLV-III ("Simian T-lymphotropic virus type III"). En raison de l'immunodéficience grave causée par le STLV-III chez les macaques, l'hypothèse que les lentivirus humains seraient responsables du SIDA se consolidait davantage (Letvin *et al.*, 1985). Par la suite, en 1986, Montagnier et son équipe isolent d'un patient de Afrique de l'Ouest un autre lentivirus relié au SIDA qu'ils nomment VIH-2 (Clavel *et al.*, 1986).

Dès lors, les virus responsables du syndrome de l'immunodéficience acquise humaine et simienne ont été nommés VIH et VIS respectivement, sur la recommandation du comité international de taxonomie (Coffin *et al.*, 1986). Le VIH-1 est la souche qui prévaut dans différentes régions d'Afrique, d'Asie, d'Europe, et d'Amérique du Nord et du Sud, alors que le VIH-2, qui montre une différence génomique de plus 45% avec le VIH-1, ainsi qu'une période de latence plus longue et une immunodéficience moins sévère, est prévalent surtout dans certains pays de l'Afrique de l'Ouest (Quinn, 1994).

Plus récemment, un autre rétrovirus humain hors du commun, provenant de deux personnes d'origine camerounaise présentant une lympho-adénopathie généralisée, a été décrit par De Leys et ses collaborateurs (1990). Ce nouveau virus de l'immunodéficience humaine montre des propriétés morphologiques et biologiques semblables au VIH-1 et au VIH-2, mais présente des différences antigéniques importantes avec ces derniers. De plus, il présente des différences quant au poids moléculaire des protéines virales, aux sites

de clivage de celles-ci ainsi que des différences dans l'organisation de la région U3 (De Leys *et al.*, 1990). Ce virus a été classé dans un groupe à part, le VIH-1 groupe O (outlier), pour le distinguer du VIH-1 du groupe M (major) et du VIH-2.

### **2.1.2 Modes de transmission**

Les études épidémiologiques montrent que le VIH est transmis, par ordre d'importance, par la voie sexuelle (autant hétérosexuelle qu'homosexuelle), par la voie sanguine résultant de l'utilisation de seringues contaminées lors de l'injection de drogues intraveineuses ou par le biais de produits sanguins contaminés (avant 1985), et verticalement de la mère à l'enfant soit *in utero*, soit lors de l'accouchement ou lors de l'allaitement (McCune, 1991; Jones et Curran, 1994). Certaines voies potentielles sont considérées comme n'étant pas importantes dans la transmission du VIH-1. Il s'agit des contacts personnels non sexuels (Fridland *et al.*, 1986), l'exposition à la salive (Ho *et al.*, 1985a), l'exposition à l'urine (Skolnik, 1989) ainsi que l'exposition aux piqûres d'insectes (Castro *et al.*, 1988).

### **2.1.3 Évolution de la maladie**

#### **2.1.3.1 Primo-infection**

La maladie causée par le VIH débute par une primo-infection qui peut être asymptomatique ou se traduire, chez 50 à 70% des individus, par un syndrome qui ressemble à une mononucléose avec fièvre, maux de tête, lympho-adénopathie généralisée, nausées, diarrhées, malaises, léthargie, etc. On observe également une virémie, une baisse considérable du nombre de lymphocytes T CD4+ circulants, entre 3 à

6 semaines après l'infection, et une inversion du rapport CD4+/CD8+ (Tindall et Cooper, 1991). Ce syndrome peut aussi s'accompagner de signes et symptômes neurologiques comme des douleurs rétro-orbitales, une dépression, une photophobie, de l'irritabilité, etc (Niu *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1985b). La période d'incubation dure de quelques jours à 10 semaines. Durant cette phase, le virus se réplique abondamment et devient détectable dans le liquide céphalo-rachidien et dans le sang. Graduellement, la réplication diminue mais elle se poursuit activement dans les tissus lymphoïdes (Clark *et al.*, 1991). L'infection entre alors dans une phase dite asymptomatique.

### **2.1.3.2 Infection asymptomatique**

La durée de la phase asymptomatique est variable. Chez les adultes, la période d'incubation avant le développement du SIDA a été estimée à 10 ans en absence de thérapie (Curran *et al.*, 1988; Ragni *et al.*, 1990; Rutherford *et al.*, 1990). Le nombre ou le pourcentage de lymphocytes T CD4+ permet de prédire la progression de la maladie. Durant la phase asymptomatique, les lymphocytes T périphériques sont faiblement infectés, environ 1/1000. Les individus asymptomatiques présentent des comptes de cellules T CD4+ généralement supérieurs à 200/ $\mu$ L (Pantaleo *et al.*, 1994). Bien que la virémie soit faible, le virus se réplique activement dans les ganglions lymphatiques durant cette période (Clark *et al.*, 1991). Le facteur précis qui serait responsable de la variabilité dans la progression de la maladie chez les individus infectés par le VIH n'est pas encore clair. Des facteurs liés au virus, à l'hôte, à l'environnement, à l'infection par d'autres agents infectieux, ainsi que des facteurs génétiques sont avancés (Levy, 1993).

### 2.1.3.3 Infection symptomatique

Après une phase asymptomatique de durée variable, une variété de signes et de symptômes se manifestent : des fièvres importantes, des sueurs nocturnes, une perte de poids, des diarrhées et une lympho-adénopathie généralisée. La nomenclature du tableau clinique du SIDA a été révisée en 1993 par le CDC (“Centers for Disease Control and Prevention”). Elle est basée sur l’apparition de maladies opportunistes associées à une baisse significative du nombre de lymphocytes T CD4+, une atteinte du système nerveux central et une augmentation de la charge virale. Les patients avec ou sans symptômes et présentant des taux de CD4+ inférieurs à 200 cellules/ $\mu$ L sont considérés comme sidéens dans cette nouvelle classification (CDC, MMWR, 1993).

## 2.2 Virus de l’immunodéficience humaine (VIH)

### 2.2.1 Taxonomie des *Retroviridae*

Le VIH est un lentivirus humain classé dans la famille des *Retroviridae*. Les lentivirus ont comme particularité de présenter un développement très lent de la maladie qu’ils provoquent. De plus, le VIH est un virus cytolitique dont l’effet cytopathogène *in vitro* se traduit par la formation de cellules géantes ou syncytia avec ou sans présence de vacuoles, suivie d’une lyse cellulaire.

Le genre des lentivirus comprend, outre les lentivirus humains, des lentivirus de primates non humains et des lentivirus de non primates. Les lentivirus de primates non humains regroupent les rétrovirus simiens qui causent des déficiences immunitaires et des lymphomes chez le singe noir de Mangabey (VIS<sub>SMM</sub>), le singe de Sykes (VIS<sub>SYK</sub>), le chimpanzé (VIS<sub>CPZ</sub>), le singe de Mandrill (VIS<sub>MND</sub>) et le singe vert d’Afrique (VIS<sub>AGM</sub>)

(Hope *et al.*, 1990). Les lentivirus de non primates sont représentés par le virus Visna/maedi (VMV) qui cause des maladies neurologiques et respiratoires chez le mouton, le virus de l'arthrite et de l'encéphalite de la chèvre (VAEC), le virus de l'anémie infectieuse équine (VAIE), le virus de l'immunodéficience bovine (VIB), et le virus de l'immunodéficience féline (VIF) (Coffin, 1991; Murphy *et al.*, 1995).

### 2.2.2 Hétérogénéité du VIH

Les lentivirus humains regroupent deux sous-espèces, soit le VIH-1 et le VIH-2, qui sont antigéniquement différents. L'analyse de la séquence des génomes viraux clonés a montré qu'ils étaient phylogénétiquement assez éloignés (Myers *et al.*, 1992). La sous-espèce VIH-1 est subdivisée en deux groupes, M et O, basée sur une analyse phylogénétique (Barin, 1996). Les variations dans la séquence des gènes *env* et *gag* permettent de reconnaître dix sous-types pour le VIH-1 du groupe M (A à J), trois sous-types pour le VIH-1 du groupe O (O1, O2 et O3) (Myers, 1994; Barin, 1996), et cinq sous-types pour le VIH-2 (A à E) (Gao *et al.*, 1994).

Une très grande hétérogénéité est observée en Afrique où circulent les virus des sous-types A, B, C, D, G et H du groupe M du VIH-1. Le sous-type C est prévalent en Inde et le sous-type E en Thaïlande. Alors que le sous-type F est prévalent au Brésil et en Roumanie, le sous-type B est prévalent en Amérique et en Europe. Le VIH-1 du groupe O semble endémique au Cameroun et dans les pays limitrophes de l'Afrique centrale. Il a été également rapporté en Europe et aux États-Unis (Jaffe et Schochetman, 1998). Les sous-types du VIH-2 circulent surtout dans certains pays de l'Afrique de l'Ouest (Quinn, 1994; Gao *et al.*, 1994; Daudel *et al.*, 1999).

### 2.2.3 Morphologie du virion

Le VIH et le VIS présentent une morphologie similaire. Ces rétrovirus sont des virus enveloppés et sphériques d'environ 100 nm de diamètre. L'enveloppe est constituée de deux feuillets phospholipidiques dérivés de la membrane cellulaire de l'hôte. Elle est tapissée dans sa face interne par une protéine myristilée, la p17, qui forme la matrice. Sa face externe présente des saillies en forme de spicules d'environ 10 nm, constituées de la glycoprotéine gp120 associée de manière non covalente à la gp41, une glycoprotéine transmembranaire (Ozel *et al.*, 1988; Earl *et al.*, 1990). Une représentation schématique du VIH est présentée à la **figure 1**

### 2.2.4 Génome

Le génome du VIH-1 est constitué de deux molécules d'ARN de 9,2 Kb de polarité positive associées aux polypeptides p6/p7 et à la transcriptase inverse (RT) (Gallo *et al.*, 1984). Trois autres enzymes ont été identifiées au niveau de la ribonucléoprotéine : une ribonucléase (RNase H), une intégrase (IN) et une protéase (PR). Ce complexe ribonucléoprotéique est contenu dans une capsidie en forme de cône constituée par la protéine p24/25 qui protège l'information génétique du virion (Greene, 1991).

L'organisation de base de l'ADN proviral (**figure 2**) montre trois gènes structuraux, *gag*, *pol* et *env*, à partir de l'extrémité 5'. Les extrémités génomiques sont flanquées par des séquences répétitives appelées LTR ("long terminal repeat") (Sanchez-Pescador *et al.*, 1985).



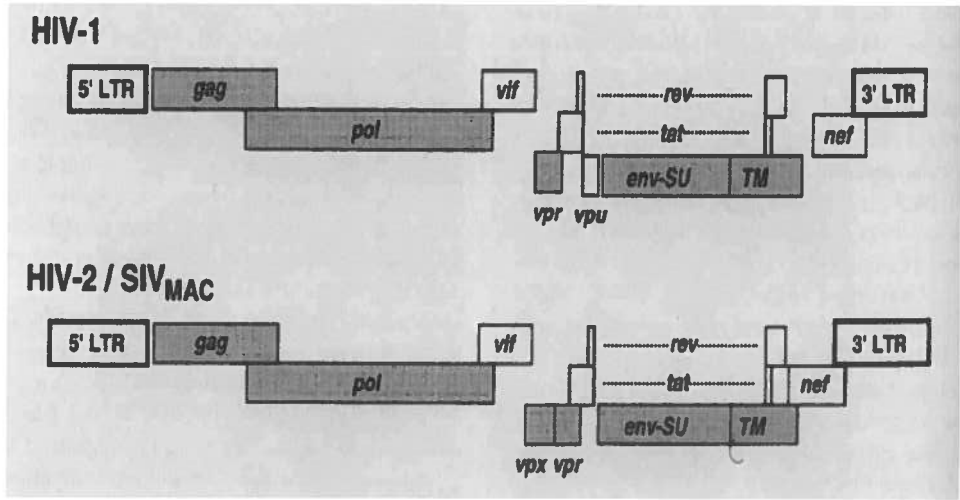
**Figure 1: Représentation schématique du VIH.**

Une représentation schématique d'une coupe transversale du VIH laisse voir l'enveloppe du virion constituée de deux feuillets de phospholipides tapissée dans sa face interne par la protéine p17/18, qui forme la matrice. La face externe de l'enveloppe virale présente des saillies en forme de spicules, constituées par la glycoprotéine gp120 associée de manière non covalente à la glycoprotéine gp41 qui est ancrée dans l'enveloppe par sa portion hydrophobe. Le génome est constitué de deux molécules d'ARN identiques associées aux polypeptides p6/p7 et à la transcriptase inverse. Cette ribonucléoprotéine est contenue dans une capsid en forme de cône constituée par la protéine p24/25.  
(Conception : Dr Lise Thibodeau. Production : service audio-visuelle de l'INRS-Institut Armand –Frappier)



**Figure 2 : Organisation génomique des lentivirus de primate.**

L'organisation de l'ADN proviral des lentivirus de primates montre les trois gènes de structure à partir de l'extrémité 5' : *gag*, *pol* et *env*. Ces trois gènes définissent la morphologie des virions matures et sont communs à tous les rétrovirus. Les gènes de régulation essentiels *tat* et *rev* ainsi que les gènes accessoires *nef*, *vif*, *vpr* sont communs au VIH-1 et au VIH-2. Le gène accessoire *vpu* retrouvé chez le VIH-1 est remplacé par le gène *vpx* chez le VIH-2 et le VIS. Les extrémités génomiques sont bordées par des séquences répétitives appelées LTR. Chez le VIH-1 et le VIS<sub>CPZ</sub>, le gène *nef* s'étend de l'extrémité 3' du gène *env* au domaine U3 du 3'LTR. Tandis que chez le VIH-2 et d'autres souches de VIS, l'extrémité 5' du gène *nef* chevauche l'extrémité 3' du gène *env* dans un cadre de lecture différent.



(D'après Fields *et al.*, 1996)

En plus des gènes de structure *gag*, *pol* et *env*, il existe deux gènes de régulation essentiels *tat*, *rev* ainsi que des gènes accessoires ou auxiliaires, *nef*, *vif*, *vpr* et *vpu* chez le VIH-1, alors que, chez le VIH-2, on retrouve *nef*, *vif*, *vpx* et/ou *vpr* (Gibbs *et al.*, 1994).

## **2.2.5 Protéines du virion**

### **2.2.5.1 Protéines internes**

Les protéines de la capside et de la matrice sont codées par le gène *gag* à partir du précurseur p55 qui, par clivage protéolytique par la protéase virale (PR), va donner les protéines matures de la capside, soit la protéine phosphorylée et myristilée de 15-17 kDa de la matrice (MA) p17, la protéine phosphorylée de 24-27 kDa de la capside (CA) p24, la nucléoprotéine (NC) p7, et les protéines p1, p2, p6 et p9 qui sont associées à l'acide nucléique viral (Henderson *et al.*, 1992; Sanchez-Pescador *et al.*, 1985; Mervis *et al.*, 1988).

La myristilation de la matrice est essentielle à l'assemblage et à la génération de particules infectieuses (Arthur *et al.*, 1992; Fantini *et al.*, 1993; Farnet et Haseltine, 1991). Les protéines de la capside ont pour rôle de protéger le génome viral. C'est la protéine virale la plus abondante et sa détection par un test ELISA sert de diagnostic dans l'infection avec le VIH.

Les enzymes virales, soit la PR, la RT, la RNase H et l'intégrase sont issues du clivage protéolytique de la protéine précurseur p160 codée simultanément par les gènes *gag* et *pol* par fusion et chevauchement du cadre de lecture de ces deux gènes (Jacks *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1988). La PR a comme fonction première le clivage de la protéine précurseur p160 (Lillehoj *et al.*, 1988). La RT permet la transcription de deux brins

d'ADN à partir de l'ARN monocaténaire (Veronese *et al.*, 1986). Cette enzyme est une ADN polymérase ARN dépendante, unique à ces virus et au virus de l'hépatite B (Baltimore, 1970). L'intégrase est nécessaire à l'intégration de l'ADN proviral dans l'ADN cellulaire (Coffin, 1991) alors que la RNase H est nécessaire à la dégradation de l'ARN dans le duplexe ADN-ARN permettant la synthèse de la deuxième molécule d'ADN lors de la réplication virale.

### 2.2.5.2 Enveloppe

Le gène *env* code pour la gp160, un précurseur de 850 à 880 acides aminés. Le clivage protéolytique par une protéase cellulaire donnera la forme mature de la glycoprotéine de l'enveloppe constituée de la sous-unité N-terminale de 550 acides aminés (gp120) et la sous-unité C-terminale de 350 acides aminés (gp41) (Veronese *et al.*, 1985).

La gp120 est fortement glycosylée, hydrophile et est située à la surface externe de la membrane des virions; elle est exprimée également à la surface des cellules infectées. Cette sous-unité comprend le domaine de liaison au récepteur CD4 présent sur les lymphocytes T CD4+, sur les macrophages et sur les cellules dendritiques (Kowalski *et al.*, 1987; Lasky *et al.*, 1987, Weiss, 1993). Cette glycoprotéine est formée de cinq domaines variables (V1 à V5) séparés par cinq séquences conservées (C1 à C5). Les domaines C3, C4, et C5 contribuent à la liaison au CD4 (Willey *et al.*, 1986). La boucle V3 a été très étudiée, car elle contient des épitopes pour la neutralisation du virus ainsi que des déterminants pour le tropisme cellulaire (Liu *et al.*, 1990). La boucle V3 est

immunodominante, hypervariable et correspond au domaine principal de neutralisation (Broliden *et al.*, 1990; Gormy *et al.*, 1991).

La gp41 est liée de manière non covalente à la gp120 et elle contient, à son extrémité aminée, une région hydrophobe responsable de la fusion de la membrane virale à la membrane cellulaire (Gallaher, 1987; Kowalski *et al.*, 1987).

### **2.2.5.3 Protéines de régulation**

#### **2.2.5.3.1 Tat**

La protéine Tat est issue de la traduction de deux exons. Le premier se situe entre les gènes *vpr* et *env* et le second chevauche le cadre de lecture des gènes *rev* et *env* (Arya *et al.*, 1985; Sodroski *et al.*, 1985). C'est une molécule de 14 à 25 kDa synthétisée durant les premières étapes de l'infection et indépendante du gène *rev*. La liaison du produit du gène *tat* à la structure TAR ("*Trans-activating region*"), située à l'extrémité de tous les transcrits viraux, permet d'augmenter l'initiation de la transcription et/ou l'élongation de l'ARN viral (Peterlin *et al.*, 1993).

#### **2.2.5.3.2 Rev**

La protéine Rev du VIH-1 est une molécule de 16 kDa issue également de la traduction de deux exons. Elle est exportée dans le noyau et dans le nucléole (Cohen *et al.*, 1988; Daar *et al.*, 1992). Rev est une protéine précoce comme la protéine Tat. Dans les cellules infectées, la protéine Rev se lie à la structure RRE ("*Rev-responsive element*") dans les transcrits viraux et assure leur transport vers le cytoplasme. De plus, elle assure le contrôle de l'épissage multiple des transcrits codant pour les protéines Tat,

Rev et Nef dans les premières étapes de la réplication ainsi que l'épissage, unique ou non, des transcrits codant pour les protéines structurales durant les dernières étapes de la réplication virale (Cullen, 1991).

#### **2.2.5.4 Protéines accessoires**

##### **2.2.5.4.1 Vif**

La protéine Vif du VIH est une molécule de 23 à 27 kDa. Elle est synthétisée à partir d'un cadre de lecture ouvert ("open reading frame") d'un gène codant pour une molécule de 193 acides aminés (Kan *et al.*, 1986). Tous les lentivirus, à l'exception du VAIE, possèdent le gène *vif*. Il est localisé immédiatement en aval du gène *pol* (O'Brien *et al.*, 1990). La protéine est accumulée dans le cytosol et dans la membrane cytoplasmique des cellules infectées (Goncalves *et al.*, 1994). Cependant, la protéine Vif n'a pas été détectée dans le virion (Fisher *et al.*, 1987). Des études récentes démontrent que la protéine Vif ne serait pas impliquée dans l'attachement et l'entrée du virus dans les cellules cibles, ni dans le bourgeonnement du virion. Par contre, elle augmenterait l'infectivité du VIH-1 après l'entrée du virus dans la cellule (Akari *et al.*, 1999). La protéine Vif serait donc nécessaire à l'infectivité des particules virales produites et jouerait probablement un rôle dans la morphogenèse et/ou dans la maturation des virions.

##### **2.2.5.4.2 Vpr**

La protéine Vpr est une molécule de 15 kDa associée à la nucléocapside dans les virions matures (Cohen *et al.*, 1990; Henderson *et al.*, 1988). Le VIH-1 ne contient que le gène *vpr* alors que le VIH-2 et quelques souches de VIS contiennent les gènes *vpr* et *vpx*



(Myers *et al.*, 1994). Une comparaison des séquences en acides aminés des protéines Vpr et Vpx a montré qu'elles étaient homologues. Le gène *vpx* serait donc une duplication du gène *vpr* (Tristem *et al.*, 1990). La protéine Vpr est traduite à partir d'un seul ARNm épissé dépendant de la fonction du gène *rev* et est exprimée tardivement après l'infection (Garret *et al.*, 1991; Schwartz, 1991). La localisation précise de Vpr dans la nucléocapside mature demeure inconnue. Des études génétiques de mutants pour ce gène montrent que la protéine Vpr serait impliquée dans la régulation de certains gènes viraux et cellulaires, en raison de son potentiel d'activer des LTR homologues, ainsi que des promoteurs de divers virus hétérologues (Cohen *et al.*, 1990). De ce fait, elle augmenterait le taux de réplication et accélérerait par conséquent l'effet cytopathogène du virus.

#### 2.2.5.4.3 Vpu

La protéine Vpu est codée par un petit gène localisé en 3' des premiers codons des gènes *tat* et *rev* du génome du VIH-1 et du VIS<sub>CPZ</sub>, qui lui est phylogénétiquement relié. Le VIH-2 et les autres lentivirus n'ont pas le gène *vpu* (Myers *et al.*, 1994). Le cadre de lecture de ce gène permet la synthèse d'une protéine de 81 acides aminés (Cohen *et al.*, 1988). L'analyse de la protéine Vpu par immunofluorescence de cellules infectées montre que cette dernière est localisée dans la région périnucléaire et serait également associée au réticulum endoplasmique (RE) et/ou au système du Golgi.

L'étude de la fonction du gène *vpu* a été effectuée avec des mutants de VIH-1 déficients pour ce gène. De tels virus se répliquent dans les cellules T CD4+, dans les lymphocytes T primaires et dans les macrophages. Cependant, leur capacité à libérer les

particules virales se trouve grandement affectée. L'analyse par microscopie électronique a montré une accumulation de virions dans des vésicules intracytoplasmiques, ce qui suggère que la protéine Vpu facilite le bourgeonnement des virions (Klimkait *et al.*, 1990, Terwilliger *et al.*, 1989). De plus, des études récentes révèlent que la protéine Vpu augmenterait la susceptibilité des cellules infectées par le VIH-1 à entrer en apoptose par un mécanisme impliquant la liaison de la protéine Fas à son ligand (FasL) (Casella *et al.*, 1999).

#### 2.2.5.4.4 Vpx

La protéine Vpx est une protéine de 14 à 16 kDa (Kappes *et al.*, 1988) traduite à partir d'un seul ARNm épissé. Elle est dépendante de la fonction du gène *rev*. La transcription du gène *vpx* s'effectue tardivement durant l'infection. La protéine Vpx est assemblée dans le virion. Le mécanisme de cet assemblage n'a pas encore été élucidé. Cette protéine a été détectée au niveau de la face interne de la membrane cellulaire des cellules infectées par le VIH-2 (Yu *et al.*, 1990). Le phénotype de ce gène reste encore mal défini. Toutefois, des études avec des virus mutants pour le gène *vpx* montrent que ce dernier serait requis pour une réplication efficace dans les lymphocytes T primaires (Guyader *et al.*, 1989; Kappes *et al.*, 1991) et dans les macrophages (Gibbs *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1991). L'intégration de la protéine Vpx dans le virion, comme celle de la protéine Vpr, suggère que la protéine Vpx jouerait un rôle dans les premières étapes de l'infection virale.

#### 2.2.5.4.5 Nef

Le gène *nef*, unique aux lentivirus de primates, s'étend de l'extrémité 3' du gène *env* au domaine U3 du LTR chez le VIH-1 et le VIS<sub>CPZ</sub>. Chez le VIH-2, l'extrémité 5' du gène *nef* chevauche l'extrémité 3' du gène *env* (**figure 2**). Le cadre de lecture du gène *nef* du VIH-1 présente quatre codons méthionine (atg) (**figure 3**) dont la traduction à partir du premier et du deuxième codon génère une protéine Nef de 27 kDa et 25 kDa respectivement. La protéine Nef chez le VIH-2 et le VIS est une molécule de 34 kDa. Cette protéine est exprimée très tôt après l'infection à partir d'un ARNm épissé (Kim *et al.*, 1989). La protéine Nef faisant l'objet de cette étude, elle sera vue plus en détail au point 2.3.

### 2.2.6 Réplication virale

#### 2.2.6.1 Tropisme cellulaire

La déplétion marquée des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez les sidéens ainsi que les effets cytopathogènes (cpe) induits par le VIH dans les PBL humains *in vitro* suggéraient un tropisme du VIH pour cette population cellulaire. Le VIH n'est pas seulement monotropique mais plutôt polytropique. Le tropisme des différentes souches du VIH-1 est déterminé par la spécificité de l'interaction entre la gp120 du virus et le co-récepteur. Les souches appelées T-tropiques infectent préférentiellement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>; ceci se traduit par une inversion du rapport CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. Les souches ayant un tropisme préférentiel pour les monocytes-macrophages appelés M-tropiques prédominent durant la première phase de l'infection (Zhu *et al.*, 1993). Bien qu'elles se répliquent tout au long de l'infection, ce sont les souches T-tropiques qui dominent dans la phase plus tardive de

l'infection (Schuitemaker *et al.*, 1991). On distingue aussi des souches qui ne présentent pas un tropisme préférentiel pour les cellules T ou les monocytes-macrophages.

En plus des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et des monocytes-macrophages (Gartner *et al.*, 1986; Ho *et al.*, 1986; Salahuddin *et al.*, 1986), d'autres types cellulaires présentent une susceptibilité limitée à l'infection par le VIH, incluant les cellules de Langerhans (Tschachler, 1987), certaines cellules lymphoblastoïdes B transformées par le virus Epstein-Barr (EBV) (Montagnier, 1984b), les cellules gliales (Dewhurst *et al.*, 1987), les cellules folliculaires dendritiques (Gallo *et al.*, 1984) et certaines cellules du colon (Adachi *et al.*, 1987; Nelson *et al.*, 1988).

#### **2.2.6.2 Récepteurs**

La molécule CD4, le ligand naturel du CMH-II, principalement exprimée sur les lymphocytes T matures, est le récepteur principal pour le VIH (Dalglish *et al.*, 1984; McDougal *et al.*, 1986). Cette molécule est aussi présente à la surface d'autres cellules susceptibles d'être infectées. Il a été démontré que certains anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes spécifiques situés au niveau du site de liaison de la gp120 à la molécule CD4 pouvaient bloquer l'infection par le VIH (Wong-Stall et Gallo, 1985).

Cependant, il existerait des récepteurs alternatifs impliqués dans l'attachement et l'entrée du virion. C'est le cas de certaines cellules nerveuses, certaines lignées de cellules tumorales colo-rectales, certaines lignées hépatiques, qui, bien que ne possédant pas la molécule CD4, sont néanmoins susceptibles à l'infection par le VIH (Li *et al.*, 1990). En effet, il a été démontré que la gp120 du VIH-1 pouvait se lier à la galactosyl céramide retrouvée dans les lignées des cellules gliales aussi bien que dans celles du

colon (Baht *et al.*, 1991; Harousse *et al.*, 1991; Long *et al.*, 1994), puisque des anticorps monoclonaux dirigés contre ce glycolipide pouvaient bloquer l'infection virale dans ces cellules (Fatani *et al.*, 1993; Yahi *et al.*, 1992).

### 2.2.6.3 Co-récepteurs

L'entrée du virus à l'intérieur des cellules requiert la présence d'une seconde molécule appelée co-récepteur. Les co-récepteurs pour le VIH sont tous membres de, ou similaires à, la famille des récepteurs pour les chémokines. Pour entrer dans les cellules, toutes les souches de VIH-1 utilisent le récepteur de chémokine lié à C-C (CCR-5) "C-C linked chemokine receptor-5", qui sert de récepteur cellulaire pour RANTES, MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  et/ou le récepteur de chémokine lié à CXC (CXCR-4) "CXC-linked chemokine receptor-4", qui sert de récepteur pour SDF-1 (Deng *et al.*, 1996; Berson *et al.*, 1996,1998; Deng *et al.*, 1997). Il a été démontré que les chémokines telles que RANTES, MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  agissaient comme des suppresseurs naturels de l'infection par le VIH (Cocchi *et al.*, 1995).

Le récepteur CCR-5, exprimé davantage sur les macrophages et sur les cellules T mémoires, servirait pour l'entrée des virus M-tropiques (Alkabit *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996), tandis que le récepteur CXCR-4, surtout exprimé sur les lymphocytes T, serait utilisé par les souches virales T-tropiques (Feng *et al.*, 1996). Des individus présentant une mutation homozygote dans le gène codant pour CCR-5 sont résistants à l'infection par le VIH. Ceci suggère que la présence d'un CCR-5 fonctionnel soit requise pour la transmission virale (Feng *et al.*, 1996).

D'autres récepteurs de chémokines comme CCR-2b, CCR-3, CCR8, CX3CR1 (Deng *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996), ainsi que d'autres molécules ressemblant à des récepteurs de chémokines, telles GPR-1, GPR-15/BOB, STRL-33/BONZO, APJ, ChemR23, ont également été décrits comme des co-récepteurs secondaires pouvant être utilisés par le VIS et certaines souches de VIH-1 (Choe *et al.*, 1996 et 1998; Doranz *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1997; Farzan *et al.*, 1997; Liao *et al.*, 1997; Reeves *et al.*, 1997; Rucker *et al.*, 1997; Edinger *et al.*, 1998a,b; Horuk *et al.*, 1998; Jinno *et al.*, 1998; Samson *et al.*, 1998; Shimizu *et al.*, 1999).

#### **2.2.6.4 Cycle de la réplication virale**

##### **2.2.6.4.1 Attachement et entrée du virus**

L'entrée du virus est médiée par une interaction entre l'enveloppe et les co-récepteurs. La liaison entre la gp120 du VIH et la molécule CD4 induit un changement de conformation dans la gp120 qui entraîne l'exposition de la boucle V3 et une augmentation de l'affinité de cette dernière pour le co-récepteur (Dimitrov *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 1999). La gp41 se dissocie de la gp120 et l'exposition des peptides de fusion situés au niveau de la région N-terminale de la gp41 initie la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire (Brasseur *et al.*, 1988).

Les facteurs qui pourraient influencer l'efficacité de l'entrée du virus comprennent les modifications post-traductionnelles des co-récepteurs comme la glycosylation, la sulfonation des résidus tyrosines (Farzan *et al.*, 1999) et l'efficacité de l'interaction entre la gp120 et le co-récepteur à la surface de la cellule (Dimitrov *et al.*, 1998). D'autres facteurs comme les molécules d'adhésion ou les glycosaminoglycans

pourraient également influencer l'entrée du virus via des interactions non spécifiques (Roderiquez *et al.*, 1995; Mondor *et al.*, 1998).

#### **2.2.6.4.2 Synthèse et intégration de l'ADN viral**

Le modèle de la synthèse de l'ADN viral par la transcriptase inverse est similaire à celui proposé pour les autres rétrovirus. La synthèse de l'ADN viral requiert la décapsidation du génome viral dont le mécanisme n'est pas connu. Le minimum requis pour cette étape de la réplication rétrovirale est deux copies d'ARN simple brin servant de matrice pour convertir ce dimère en une molécule d'ADN double brin linéaire, une amorce tRNA de l'hôte qui se lie au PrBS ("primer binding site") proche de l'extrémité 5' de la matrice ARN et une protéine hétérodimérique qui possède à la fois une activité RT et RNase (Fields *et al.*, 1996).

L'intégration de l'ADN viral est une étape essentielle de la réplication du virus. L'ADN viral synthétisé dans le cytoplasme s'associe avec la protéine intégrase (Farnet *et al.*, 1991). Des analyses biochimiques ont révélé que la protéine MA ferait partie de ce complexe (Bukrinsky *et al.*, 1993). Ce complexe de pré-intégration, une fois dans le noyau, s'intègre dans le génome cellulaire. Cette intégration ne semble pas tout à fait aléatoire (Shih *et al.*, 1988). L'analyse des séquences avoisinant le provirus révèle que cette intégration se fait à l'intérieur ou à proximité de séquences répétées telles que les séquences ALU et L1 (Stevens *et al.*, 1994).

#### **2.2.6.4.3 Régulation de l'expression des gènes viraux**

La régulation de l'expression des gènes viraux du VIH est très complexe et implique des éléments cis-régulateurs, des éléments trans-activateurs viraux et différentes protéines cellulaires. Leur coordination règle le niveau de base et les hauts niveaux d'expression des gènes viraux (Antoni *et al.*, 1994; Jones et Peterlin, 1994). Le VIH et le VIS codent pour des protéines de régulation désignées Tat et Rev, qui contrôlent l'expression des gènes viraux au niveau transcriptionnel et postranscriptionnel respectivement (Cullen, 1991). Les facteurs de transcription cellulaire se liant à TAR ("trans-activation response") et/ou à la protéine Tat vont induire une transcription provirale initiale à faible niveau ayant comme résultat l'expression des protéines précoces régulatrices virales Tat, Rev, ainsi que la protéine accessoire Nef (Alonso *et al.*, 1994). La protéine Tat agit sur l'élément viral TAR dans le LTR et amplifie l'expression de tous les produits des gènes viraux en augmentant l'initiation de la transcription et/ou l'élongation de l'ARN viral par un facteur de 100 à 500 (Peterlin *et al.*, 1993). La protéine Rev interagit avec la région RRE ("Rev Responsive Element") de l'ARN viral et assure la transition de la phase de régulation précoce à la phase tardive de l'expression des gènes viraux. Cette phase de régulation tardive est marquée par un haut niveau de synthèse des protéines de structure du virus, avec la régulation à la hausse de l'épissage et du transport de l'ARN viral du noyau vers le cytoplasme (Parslow, 1993).

#### **2.2.6.4.4 Assemblage et bourgeonnement du virion**

L'assemblage des particules virales est largement orchestré par la protéine p55, précurseur de Gag (Gelderblom, 1991; Hoxie *et al.*, 1986). Cette étape est marquée par la



migration des précurseurs Gag et Gag-Pol vers la face interne de la membrane plasmique et l'intégration des glycoprotéines d'enveloppe dans la membrane ainsi que celle des protéines accessoires Vpr et Vpx. L'ARN génomique viral est ensuite encapsidé de même que le tRNA. L'incorporation de l'ARN génomique dans le virion requiert des éléments cis-activateurs localisés dans le LTR (Aldovini et Young, 1990; Clavel *et al.*, 1986; Linial et Miller, 1990; Luban et Goff, 1994). L'auto-assemblage des précurseurs Gag et Gag-Pol associés à l'ARN génomique 35S, au tRNA et aux protéines d'enveloppe est déterminant pour la libération de la particule virale immature par bourgeonnement de la membrane plasmique. L'activité protéolytique de la polyprotéine p160 (Gag-Pol) mène à la production d'une nucléocapside mature dans le virion libéré par bourgeonnement. Cette nucléocapside est essentielle pour la maturation et l'infectivité du virus. (Kohl *et al.*, 1988).

## 2.3 Protéine Nef

### 2.3.1 Généralités

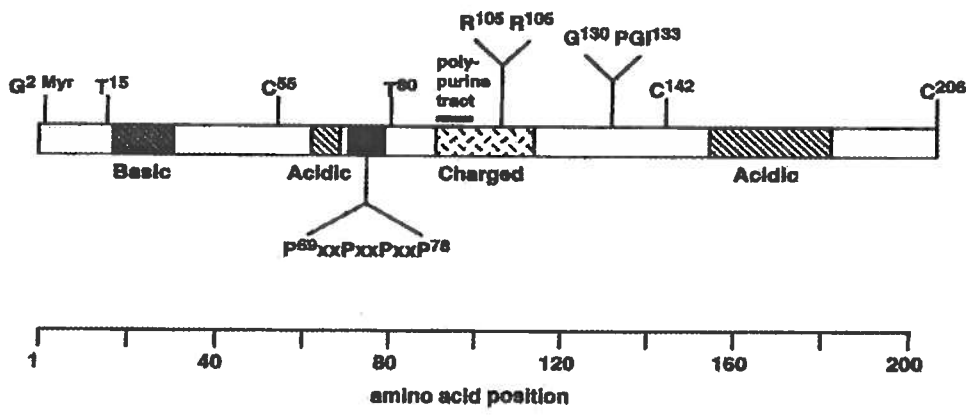
Les ARNm qui codent pour la protéine Nef constituent plus de 80% de la population totale d'ARNm transcrite durant la phase précoce (Cullen, 1992). Le rôle de la protéine Nef dans la réplication du VIH a été la source d'investigations considérables et de controverses. Des études initiales ont d'abord rapporté que le gène *nef* n'était pas nécessaire pour la réplication virale, et que des mutations dans le gène *nef* conduisent à une réplication virale plus efficace (Binninger *et al.*, 1991; Cheng-Mayer *et al.*, 1989; Luciw *et al.*, 1987). Ceci suggérait que la protéine Nef règle de façon négative le niveau de réplication du VIH en culture (Terwilliger *et al.*, 1986; Luciw *et al.*, 1987). Sur la base

de ces études, ce gène a été appelé *nef* “negative regulation factor gene” (gène qui code pour le facteur de régulation négative). Par la suite, d’autres études suggéraient que le mécanisme de cette régulation négative était relié à une répression de la transcription au niveau des éléments du promoteur dans le LTR du VIH par la protéine Nef (Ahmad et Venkastesan, 1988; Niederman *et al.*, 1989). Cependant, quelque temps après, d’autres groupes de chercheurs rapportaient ne pas avoir observé cet effet négatif de Nef sur la réplication virale (Kim *et al.*, 1989; Terwilliger *et al.*, 1991; Unger *et al.*, 1992; De Ronde *et al.*, 1992). Des études subséquentes ont ensuite largement démenti ces conclusions initiales, car elles ont démontré que la protéine Nef n’exercerait pas un effet détectable sur l’expression des gènes via le LTR (Hammes *et al.*, 1989; Benson *et al.*, 1993; Chowers *et al.*, 1994), mais qu’elle exercerait plutôt un effet positif sur la réplication virale (De Ronde *et al.*, 1992; Spina *et al.*, 1994; Terwilliger *et al.*, 1991; Zazopoulos *et al.*, 1992).

La séquence consensus de la protéine Nef du VIH-1 contient 206 acides aminés (**figure 3**). Les régions de la protéine Nef du VIH-1 qui sont conservées chez le VIH-2 et le VIS comprennent la région myristilée au début de la protéine, une séquence répétée riche en proline localisée entre les résidus 69 et 80 flanquée en aval par une région riche en résidus acides. De plus, il existe une région centrale composée de résidus chargés entre les acides aminés 90-115, au niveau de laquelle s’associe une séquence de 6 codons appelée PPT (“poly purine tract”) qui correspond à l’amorce de la RT. Les séquences hautement conservées comprennent aussi deux régions acidiqes dont une première entre les résidus 62-65, et une seconde proche de l’extrémité C-terminale (Fields *et al.*, 1996).

**Figure 3 : Représentation schématique des différentes régions très conservées de la protéine Nef.**

La séquence consensus de la protéine Nef du VIH-1 contient environ 206 acides aminés. Les régions de la protéine Nef du VIH-1 qui sont très conservées chez le VIH-2 et le VIS comprennent la région myristilée au début de la protéine (G<sub>2</sub>Myr), une séquence répétée riche en proline (PxxPxxP) localisée entre les acides aminés 69 et 80, une séquence de 25 acides aminés chargés entre les résidus 90 et 115 à laquelle s'associe une séquence de 6 codons appelée PPT "poly purine tract", deux régions acidiqes dont une première entre les acides aminés 62 et 65 et une seconde proche de l'extrémité C-terminale, une région basique entre les résidus 22 et 35 et, enfin, les cystéines aux positions 55, 142 et 206 (Fields *et al.*, 1996).



(D'après Fields *et al.*, 1996)

Enfin, on note également une région basique entre les résidus 22-35 et les résidus cystéine aux positions 55, 142 et 206 qui constituent des sites de phosphorylation et de formation de ponts di-sulfures intramoléculaires (Shugars *et al.*, 1993; Fields *et al.*, 1996).

Les analyses immuno-chimiques et biochimiques montrent que la protéine Nef est localisée principalement dans le cytoplasme et au niveau de la face interne de la membrane du virus (Niederman *et al.*, 1993; Yu et Felsted, 1992). Elle peut également être exprimée à la surface des cellules infectées et éventuellement être sécrétée dans le milieu extracellulaire (Fujii *et al.*, 1993).

La protéine Nef est une protéine myristilée et phosphorylée *in vitro* (Guy *et al.*, 1987) et *in vivo* (Coates *et al.*, 1997). Dans les cellules infectées, la thréonine 15 (Thr15) de la protéine Nef constitue un site de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) (Guy *et al.*, 1990). Cette thréonine n'est pas hautement conservée. Cependant, la Thr80 aussi bien que des résidus sérine (Bandres *et al.*, 1994) et cystéine (Shugars *et al.*, 1993) peuvent être phosphorylés. La myristilation de la protéine Nef serait pré-requise pour la phosphorylation, car elle permettrait d'assurer la proximité de la protéine Nef avec la PKC activée localisée au niveau de la membrane plasmique.

### **2.3.2 Principaux effets de Nef dans la cellule**

#### **2.3.2.1 Internalisation et dégradation des CD4**

L'internalisation et la dégradation des molécules CD4 constituent l'effet de la protéine Nef le plus connu *in vitro* (Sanfridson *et al.*, 1994). Des souris transgéniques exprimant la protéine Nef montrent une diminution significative de l'expression des

molécules CD4 à la surface des thymocytes doubles positifs immatures associée à une sélection compromise des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Skowronski *et al.*, 1993). Cette régulation négative de l'expression des molécules CD4 s'effectue par un mécanisme post-traductionnel, dans lequel on observe une accélération de leur endocytose sans que la synthèse et le transport à la surface de la cellule ne soient affectés. Les molécules CD4 endocytées sont accumulées dans des endosomes précoces puis dégradées dans les lysosomes (Anderson *et al.*, 1993; Garcia et Miller, 1991; Mariani et Skowronski, 1993; Rhee et Marsh, 1994; Aiken *et al.*, 1994).

Le mécanisme de cette internalisation ferait intervenir des motifs riches en tyrosine ou en leucine dans l'infection par le VIS et le VIH respectivement. Ces motifs sont associés à des adaptateurs de clatrine au niveau de la queue cytoplasmique de la molécule CD4 (Bresnahan *et al.*, 1999). Dans l'infection par le VIH, la liaison de la protéine Nef au motif de dileucine est précédée de la dissociation du complexe CD4-p56lck (Aiken *et al.*, 1994; Rossi *et al.*, 1996; Gratton *et al.*, 1996; Grzesiek *et al.*, 1996). Cette dissociation a pour rôle de permettre l'exposition de ce motif qui constitue le signal de reconnaissance pour l'endocytose (Sleckman *et al.*, 1992). La protéine Nef possède aussi un motif de dileucine conservé capable d'interagir avec des composantes de la machinerie d'endocytose cellulaire et qui servirait de signal pour l'endocytose (Oldridge et Marsh, 1998; Bresnahan *et al.*, 1998; Greenberg *et al.*, 1998; Piget *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1998; Greenberg *et al.*, 1997; Craig *et al.*, 1998; Mangasarian *et al.*, 1997; Foti *et al.*, 1997). Il a également été démontré que d'autres régions de la protéine Nef seraient importantes dans la liaison à la molécule CD4 ainsi que dans la dissociation du complexe CD4-p56lck (Grzesiek *et al.*, 1996; Iafrate *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999; Aiken *et al.*,

1996; Hua *et al.*, 1997). De plus, une mutation de la Gly2 de la protéine Nef, qui rend la myristilation impossible, abolirait la capacité de la protéine Nef à induire la régulation négative des CD4 (Aiken *et al.*, 1994).

### **2.3.2.2 Régulation négative du CMH-I**

La diminution de l'expression des molécules du CMH-I à la surface des cellules infectées découle de leur endocytose sans que la synthèse et leur transport à la surface ne soient affectés. Les molécules sont accumulées puis détruites dans les lysosomes (Schwartz *et al.*, 1996). Le mécanisme de cette endocytose des molécules du CMH-I de même que celui des molécules CD4 déjà décrit ci-dessus, sont très spécifiques (Schwartz *et al.*, 1996; Aiken *et al.*, 1994). En effet, la protéine Nef n'exerce aucun effet détectable sur les autres protéines exprimées à la surface des cellules infectées et dont la régulation est médiée également par endocytose. Les structures déterminantes de la protéine Nef interagissant avec la queue cytoplasmique des molécules du CMH-I sont l'hélice  $\alpha$  N-terminal et la région riche en proline (Mangasarian *et al.*, 1999; Greenberg *et al.*, 1998).

La protéine Nef conférerait donc une protection des cellules infectées contre les cellules T cytotoxiques (CTL) (Collins *et al.*, 1998) puisque l'internalisation des molécules du CMH-I rend impossible l'exposition des peptides viraux dans la niche peptidique, nécessaire à la reconnaissance et à la destruction des cellules infectées par les CTL (Kagi *et al.*, 1996).

### **2.3.2.3 Altérations dans les voies de signalisation par Nef**

Le rôle de Nef dans l'altération des voies de signalisation a fait l'objet de nombreuses études. Les altérations observées dans l'expression des gènes de l'hôte

découleraient des interactions multiples de la protéine Nef avec des protéines de transduction de signaux cellulaires. Toutefois, ces mécanismes ne sont pas encore complètement compris. Plusieurs effets contradictoires ont été rapportés pour un même événement de signalisation. Ces différences peuvent être dues à certaines variables comme les clones moléculaires utilisés, la lignée cellulaire, les conditions de culture ainsi que le niveau et la durée de l'expression de la protéine Nef.

Le blocage de la libération du calcium induit par l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>) constitue l'un des cas d'altération des voies de signalisation les mieux connus. En effet, l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate par la phospholipase C (PAL) donne du diacylglycérol (DAG) et de l'IP<sub>3</sub>. L'IP<sub>3</sub> libéré se lie à un récepteur spécifique dans le RE et induit la libération des ions calcium contenus dans les vésicules via une activité de la Ca<sup>2+</sup>ATPase. Cette libération de calcium est déterminante dans l'induction de la prolifération et de la croissance cellulaire. La protéine Nef serait donc capable d'interférer avec cette voie de signalisation (Guy *et al.*, 1987) en affectant le récepteur d'IP<sub>3</sub> (Graziani *et al.*, 1996) sans que la formation de l'IP<sub>3</sub> et l'activité de la Ca<sup>2+</sup>ATPase ne soient affectées.

Une autre forme d'altération des voies de signalisation cellulaire est la modulation de la transduction de signaux dans les cellules T. En effet, la molécule CD4 qui subit une régulation négative par la protéine Nef contribue à l'activation des cellules T auxiliaires. La molécule CD4 est étroitement associée au complexe TCR-CD3 et participe à la liaison spécifique de l'antigène avec l'aide du CMH-II. Ceci permet de déclencher la voie de signalisation de la transduction de diverses cytokines incluant l'interleukine 2 (IL-2) et l'interféron- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Ces cytokines sont essentielles pour l'expansion clonale des cellules



T réagissant avec l'antigène et pour le recrutement efficace d'autres cellules hématopoïétiques. Ainsi, la protéine Nef, en plus de régler négativement l'expression des CD4, interagit avec un ou plusieurs facteurs cellulaires spécifiques dans la voie de signalisation qui mène à l'expression de ces cytokines (Collette *et al.*, 1996a, 1996b).

Par ailleurs, l'expression de Nef dans les macrophages entraîne la production des protéines inflammatoires MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  qui exercent un chémoattractisme envers les cellules T. Cet événement rendrait les cellules T au repos voisines plus susceptibles à l'infection par le VIH (Swingler *et al.*, 1999). Alexander et ses collègues (1997) ont également montré une autre voie de stimulation des cellules T par la protéine Nef qui induit la production endogène d'IL-2 par les lymphocytes en culture, procurant ainsi un avantage significatif de croissance des souches de VIS Nef positif.

Plus récemment, des chercheurs ont rapporté une interaction de Nef avec la chaîne  $\zeta$  du TCR (Howe *et al.*, 1998; Bell *et al.*, 1998). Cette interaction serait dépendante du motif riche en proline de la protéine Nef (Xu *et al.*, 1999). Étant donné que la chaîne  $\zeta$  du TCR agit comme un effecteur essentiel dans la signalisation du TCR, il reste à déterminer comment la liaison de Nef avec ce dernier modulerait la réponse TCR (positivement ou négativement). De plus, la libération dans le cytoplasme de la protéine lck suite à la dissociation du complexe CD4-p56lck lors de la régulation négative des molécules CD4 jouerait un rôle dans l'activation des cellules T (Sleckman *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1999).

La protéine Nef aurait également le potentiel de moduler le signal apoptotique en induisant une régulation à la hausse du ligand pro-apoptotique du récepteur de Fas (FasL). L'expression de FasL est réglée par des facteurs de transcription tels que NFAT, NF- $\kappa$ B et AP-1 "Activator protein 1" (Kasibahtla *et al.*, 1999). Certains de ces facteurs

sont dépendants de l'expression de Nef. C'est le cas du facteur AP-1 induit dans les macrophages par la protéine Nef du VIH-1, suite à une réponse cellulaire spécifique qui requiert à la fois les événements de signalisation impliquant hck et MAPK (Biggs *et al.*, 1999). Les études de Xu et ses collaborateurs (1999) montrent également un rôle critique de l'interaction entre Nef et la chaîne  $\zeta$  du TCR dans l'expression de FasL induite par la protéine Nef. Cette interaction ayant pour conséquence une régulation à la hausse de FasL, serait à la base d'un mécanisme par lequel la protéine Nef endogène pourrait être impliquée dans la déplétion des cellules T observée *in vivo* (Zauli *et al.*, 1999).

L'effet le plus extrême d'altération des voies de signalisation par la protéine Nef est son aptitude à promouvoir une transformation morphologique de certaines lignées de fibroblastes. En effet, la possibilité qu'un allèle potentiel du gène *nef* du VIS puisse induire une transformation morphologique des fibroblastes immortalisés 3T3 a été démontrée (Du *et al.*, 1995).

Un autre cas d'altération des voies de signalisation par la protéine Nef a été observé dans le cerveau. En effet, dans le cerveau des personnes infectées par le VIH-1, le cycle de réplication virale est avorté dans les astrocytes. Toutefois, la synthèse des protéines régulatrices entraîne dans ces cellules une accumulation de la protéine Nef. Ambrossi et ses collaborateurs (1999) ont montré récemment que la protéine Nef pourrait altérer les fonctions des astrocytes en interférant avec l'expression et l'activation de la protéine kinase C, qui est un régulateur important dans les fonctions astrogliales et dans la réplication du VIH-1. Le mécanisme de cette interférence serait basé sur l'altération de l'expression des isoformes  $\beta$ II et  $\epsilon$  de la PKC qui seraient reliés à une inhibition de

l'activation du LTR. La myristilation de Nef et sa localisation membranaire sont essentielles pour l'induction des effets observés dans les cellules astrocytaires. Ces résultats expliqueraient la restriction de la réplication du VIH-1 dans les astrocytes (Ambrossi *et al.*, 1999).

### 2.3.3 Protéines interagissant avec Nef

En plus des molécules CD4 et CMH-1, d'autres protéines cellulaires interagissent avec la protéine Nef.

Sawai et ses collaborateurs (1994) ont été les premiers à rapporter que la protéine Nef s'associe à une phosphoprotéine de 65 kDa (p65) appelée NAK ("nef associated-kinase") qui est sérologiquement et fonctionnellement reliée à une PAK ("p21-activated kinase") (Lu *et al.*, 1996; Nunn et Marsh, 1996; Sawai *et al.*, 1996, Sawai *et al.*, 1997). Cette protéine serait capable de s'autophosphoryler et aurait comme substrat préféré l'histone H4 (Nunn et Marsh, 1996). Cette kinase a été récemment nommée PAK2 (Renkema *et al.*, 1999).

La protéine Nef interagit également avec différentes protéines de la famille des Src. Cette famille regroupe neuf membres connus : Blk, Fgr, Fyn, Hck, Lck, Lyn, Src, Yes et Yrk (Sudol, 1993; Brickell, 1992). Le rôle de ces protéines est de faire le relais entre des signaux de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule via des protéines transmembranaires. Il a été démontré que la protéine Nef se lie à la protéine tyrosine kinase Hck ("human hematopoietic cell kinase") principalement exprimée par les monocytes (Saksela *et al.*, 1995; Foti *et al.*, 1999; Briggs *et al.*, 1997; Moarefi *et al.*, 1997; Baur *et al.*, 1997; Dutartre *et al.*, 1998), à Lck, une protéine kinase spécifique aux

lymphocytes (Collette *et al.*, 1996a; Greenway *et al.*, 1995,1996; Zaur *et al.*, 1997; Dutartre *et al.*, 1998), à Lyn (Briggs *et al.*, 2000; Saksela *et al.*, 1995) à Fyn (Lee *et al.*, 1995; Arold *et al.*, 1997) et à Src (Du *et al.*, 1995). L'interaction de Nef avec ces protéines met en jeu le domaine riche en proline de Nef et le domaine SH3 de ces dernières (Ren *et al.*, 1993).

D'autres protéines interagissant avec la protéine Nef ont également été rapportées, telles que l'isoforme  $\theta$  de la PKC (Smith *et al.*, 1996), la thioestérase humaine II (Liu *et al.*, 1997; Cohen *et al.*, 2000), la protéine MAP Kinase ("mitogen-activated protein kinase") (Greenway *et al.*, 1995; Greenway *et al.*, 1996), la protéine Raf1 kinase (Hodge *et al.*, 1998), la chaîne  $\zeta$  du TCR (Xu *et al.*, 1999; Howe *et al.*, 1998; Bell *et al.*, 1998), les protéines vacuolaires (Vav) (Fackler *et al.*, 1999), l'ATPase vacuolaire (V-ATPase) (Lu *et al.*, 1998), les adaptines (Bresnahan *et al.*, 1998; Greenberg *et al.*, 1998; Piget *et al.*, 1998) et les filaments d'actine (Fackler *et al.*, 1997).

### **2.3.4 Rôle de Nef dans la pathogenèse**

L'importance de Nef dans la pathogenèse a été démontrée par les observations suivantes : 1) l'infection des macaques avec un virus VIS *nef* négatif se traduisait par une atténuation virale (Kestler *et al.*, 1991) qui procure des effets protecteurs lorsqu'utilisé comme vaccin dans ce modèle animal (Daniel *et al.*, 1992; Wyand *et al.*, 1996); 2) la faible virémie et l'absence d'évidence de progression vers le SIDA chez des macaques adultes et chez un groupe d'australien infectés respectivement par le virus de l'immunodéficience simienne (VIS) et le VIH qui portent des mutations dans le gène *nef* (Learmont *et al.*, 1992; Deacon *et al.*, 1995). En effet, ce groupe de neuf australien hémophiles a été infecté accidentellement avant 1985 par transfusion de sang provenant

d'un même donneur séropositif. Les individus de ce groupe ont montré une absence de la progression de la maladie et une faible charge virale même plusieurs années après l'infection (Learmont *et al.*, 1992). Le séquençage de ces virus a montré qu'ils présentaient des délétions dans le gène *nef* (Deacon *et al.*, 1995; Kirchhof *et al.*, 1995). Les cinq survivants de ce groupe sont encore asymptomatiques 14 à 18 ans après l'infection sans thérapie antivirale, alors que le donneur ne commençait une thérapie qu'en février 1999 (Learmont *et al.*, 1999).

La possibilité d'une pression sélective se traduisant par une réparation partielle du gène *nef* défectif chez des survivants à long terme, suffisante pour rétablir certains mécanismes de la pathogenèse *in vitro*, a été démontrée récemment (Carl *et al.*, 2000). De plus, on a démontré que la protéine Nef du VIH-1 pouvait se substituer à la protéine Nef du VIS<sub>MAC</sub> *in vivo* pour produire une infection symptomatique ainsi qu'une persistance de la charge virale dans la plupart des cas observés (Alexander *et al.*, 1999).

La protéine Nef serait également impliquée dans la neuropathogenèse. Elle serait un médiateur dans le recrutement et la migration des leucocytes dans le système nerveux central. En effet, des niveaux élevés d'IL-6, de TNF- $\alpha$  et d'IFN- $\gamma$  ont été observés dans le liquide céphalo-rachidien 6 heures après l'injection intra-citernale de la protéine Nef chez le rat (Koedel *et al.*, 1999). Elle changerait les propriétés cellulaires des astrocytes en altérant leur croissance et leur morphologie. Ceci contribuerait à l'activation et l'induction d'une transformation des astrocytes dans le système nerveux central des individus atteints du SIDA (Kohleinsen *et al.*, 1999).

Cependant, d'autres chercheurs ont récemment mis en doute l'association entre les caractéristiques de la séquence de Nef et l'état clinique des patients (Mourich *et al.*,

1999). Des études sur un groupe de toxicomanes italiens non progresseurs n'ont pas indiqué que les délétions ou la perte des motifs fonctionnels dans le gène *nef* joueraient un rôle majeur dans le retard ou la non progression de la maladie (Catucci *et al.*, 2000). En effet, aucune corrélation n'a pu être établie entre la présence d'un gène *nef* défectif ou intact et la progression ou non de la maladie à l'intérieur de cette même cohorte (Brambilla *et al.*, 1999). Toutefois, le nombre d'études dans lesquelles il a été démontré que Nef était impliquée dans la pathogenèse dépasse largement celles qui démontreraient le contraire.

### **2.3.5 Rôle de Nef dans l'infectivité virale *in vivo* et *in vitro***

Le rôle de la protéine Nef dans l'augmentation de l'infectivité virale a été rapporté dans plusieurs études (Chowers *et al.*, 1994; Goldsmith *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1995). La protéine Nef réglerait différentes étapes du cycle de la réplication virale et augmenterait la production de virus en agissant sur l'efficacité de la synthèse d'ADN viral dans les cellules infectées (Aiken *et al.*, 1995; Chowers *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1995), sur l'efficacité de la transcription ainsi que sur la libération des virus (Collette *et al.*, 1999). Elle faciliterait la réplication du virus dans les tissus lymphoïdes *in vivo* en augmentant le nombre de cellules infectées productrices de virus et en contribuant à l'activation des lymphocytes avec l'induction de la production endogène d'IL-2 (Glushakova *et al.*, 1999).

Récemment, Adachi et ses collaborateurs (1999) ont montré que les virions produits en absence de la protéine Nef auraient du mal à synthétiser complètement leur ADN et montreraient également une faible capacité à entrer dans les cellules. Ces

données récentes démontrent que Nef est importante depuis la transcription du génome viral jusqu'à l'étape de la production du virion. Son rôle serait également critique durant la phase précoce du cycle de la réplication virale, de l'adsorption et de l'intégration (Adachi *et al.*, 1999). Récemment, on a suggéré que Nef fournie en *trans* inhibe la synthèse cellulaire en facilitant les voies métaboliques impliquées dans la réplication du virus. De plus, Nef modulerait la susceptibilité à l'infection par le VIH-1 et serait capable d'accentuer l'effet d'un stimulus apoptotique pouvant faciliter la libération des virions néoformés (Pugliese *et al.*, 1999).

Par ailleurs, Nef augmenterait le niveau de la réplication virale par un nouveau mécanisme impliquant la production de IL-15 (Quaranta *et al.*, 1999). En effet, ces derniers ont remarqué que la protéine Nef exogène était capable d'induire, suite à la production d'IL-15, une activation des lymphocytes du sang périphérique et une modulation de la production de cytokines (augmentation de la production d'IFN- $\gamma$ , de TNF- $\alpha$  et d'IL-6, la production d'IL-2 restant non affectée).

D'autres mécanismes impliquant Nef pourraient contribuer à rendre les particules plus infectieuses, notamment les effets directs de Nef liés à sa présence dans le virion. En effet, les particules virales comporteraient de 10 à 100 molécules de la protéine Nef (Welker *et al.*, 1998; Pandori *et al.*, 1996; Kotov *et al.*, 1999). La plupart des molécules incorporées sont clivées par la protéase virale dans une région hautement conservée entre l'extrémité N-terminale qui se lie à la membrane et le domaine central conservé de la protéine (Welker *et al.*, 1998). La signification de ce clivage est encore mal connue. En effet, des mutations empêchant le clivage et des mutations dans d'autres régions

conservées de la protéine Nef n'affectant pas le clivage donnent le même phénotype (Pandori *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 1997).

Alternativement, d'après certains auteurs, l'augmentation de l'infectivité de la particule virale découlerait des effets indirects de Nef, tel que le recrutement des protéines cellulaires de l'hôte dans le virion. Il a été démontré que la protéine Nef augmente l'incorporation d'une sérine kinase cellulaire dans le virion, qui pourrait induire une augmentation de la phosphorylation de la protéine de la matrice (Swingler *et al.*, 1997). Cet événement serait associé à une augmentation de l'infectivité des particules (Bukrinskaya *et al.*, 1996). De plus, la liaison de la protéine Nef avec la protéine PAK2 assure la phosphorylation de la protéine de la matrice du VIH entraînant également une augmentation de l'infectivité des particules virales (Peter, 1998).

D'autres effets indirects de la protéine Nef dans l'environnement intracellulaire qui pourraient conduire également à l'augmentation de l'infectivité ont été proposés, tels que la régulation négative des molécules du CMH-I ou l'activation des lymphocytes T. Cependant, le rôle de la régulation négative des molécules CD4 dans l'augmentation de l'infectivité est très controversé. Différentes études montrent que la régulation négative des CD4 ne serait pas critique à l'augmentation de l'infectivité des particules virales (Hua *et al.*, 1997; Goldsmith *et al.*, 1995; Wiskerchen et Cheng-Mayer, 1996; Saksela *et al.*, 1995). Toutefois, la régulation négative des CD4 par la protéine Nef pourrait favoriser la libération des particules virales en prévenant l'interférence que la molécule CD4 pourrait exercer sur les différentes étapes de l'assemblage et de la libération des particules virales (Peter, 1998). La régulation négative de ce récepteur permettrait également de prévenir la surinfection qui pourrait conduire à la mort précoce de la cellule hôte (Benson *et al.*,



1993; Peter, 1998). Lama et ses collaborateurs (1999) ont montré récemment que l'incapacité des virus négatifs pour la protéine Nef à induire une régulation négative des molécules CD4 entraîne une baisse de l'infectivité des virions en raison du blocage de l'incorporation de l'enveloppe virale par bourgeonnement. Cependant, l'équipe de Ross (1999), avec le même système expérimental, a démontré que l'inhibition de la libération de la progéniture virale était plutôt reliée à l'absence de l'expression de la protéine Nef sans que l'infectivité virale ne soit affectée. Ainsi, le rôle de la régulation négative des molécules CD4 induite par Nef dans l'infectivité de la particule du VIH reste incertain.

#### **2.4 Hypothèses et objectifs**

Bien que les connaissances sur la structure du gène *nef* et les fonctions de la protéine Nef *in vitro* et *in vivo* aient rapidement progressées, son implication dans la pathogenèse associée à l'infection virale présente encore certaines ambiguïtés et quelques controverses. De plus, l'activité fusogénique exercée par la protéine Nef sur les liposomes (Curtain *et al.*, 1994; Thibodeau, non publié) et les Immunosomes-Nef (Nef associée à des liposomes) (Thibodeau, non publié), particulièrement par les 18 premiers acides aminés de la portion N-terminale de la protéine (Curtain *et al.*, 1994), laisse croire que cette région serait fortement impliquée dans les mécanismes de la cytopathogénicité virale observée dans les cellules CEM *in vitro*. Ces effets sont caractérisés par la fusion des cellules infectées suivant différents degrés : primaire, secondaire et tertiaire, avec la formation de syncytia et de vacuoles issus de la mise en commun des membranes plasmiques des cellules fusionnées.

L'objet de notre recherche est d'apporter une contribution à l'étude de certaines propriétés de la protéine Nef du VIH-1, notamment son rôle dans la cytopathogénicité virale et dans la cinétique de réplication du VIH-1 et/ou dans l'augmentation de l'infectivité virale. L'étude du rôle de la protéine Nef dans la cytopathogénicité sera effectuée dans le but de vérifier l'existence d'une corrélation entre l'activité fusogénique associée à la région N-terminale et le processus de fusion cellulaire associé à la formation de vacuoles qui caractérisent les effets cytopathogènes de l'infection par le VIH-1 *in vitro*. L'incidence de cette région N-terminale sur la cinétique de réplication du VIH-1 ainsi que son rôle dans l'infectivité virale seront également étudiés.

Pour répondre à certaines de ces questions et vérifier nos hypothèses, l'étude du rôle de Nef suivant notre approche expérimentale, requiert : a) la construction de virus portant diverses mutations dans le gène *nef* et b) une protéine Nef recombinante purifiée. Ainsi, ce projet a été articulé autour de quatre objectifs :

1) Le premier objectif consiste à construire par mutagenèse dirigée trois virus VIH-1 portant des mutations dans le gène *nef* : un virus isogène qui est potentiellement négatif pour la protéine Nef et deux virus qui ont le potentiel de n'exprimer qu'un segment de la protéine Nef. Ces deux segments distincts et complémentaires sont représentés par la portion C-terminale de la protéine Nef et les 19 premiers acides aminés qui constituent la portion N-terminale potentiellement responsable de l'activité fusogénique observée sur les liposomes et sur les immunosomes (Curtain *et al.*, 1994, Thibodeau, non publié).

2) Le second objectif consiste à effectuer une caractérisation physique (génotypique) de ces virus mutants par le séquençage du gène *nef* des virus construits.

3) Le troisième objectif consiste à procéder à une caractérisation biologique (phénotypique) de ces virus mutants en déterminant la cytopathogénicité et la cinétique de réplication de chacun d'eux comparée à celle du virus sauvage *nef* positif VIH-1 NL4.3.

4) Enfin, le quatrième objectif consiste à produire et purifier la protéine Nef et à étudier son rôle dans l'infectivité et dans la cytopathogénicité du VIH-1 LAI, lorsque cette dernière est fournie en *trans*.

### **3. APPROCHE EXPÉRIMENTALE**

### **3.1 Construction des provirus mutants.**

#### **3.1.1 pNL4.3 : le provirus sauvage**

Le plasmide pNL4.3 (Adachi *et al.*, 1986) d'environ 14 800 pb est un clone recombinant proviral obtenu du "NIH AIDS Reagent Program". Il est composé de la portion 5' de l'ADN de l'isolat VIH-1 NY5 et de la portion 3' de l'ADN de l'isolat VIH-1 LAI. La jonction des deux portions correspond au site EcoRI aux positions 5743-5748 situé dans le gène *vpr*. Le génome du VIH-1, bordé par les portions de l'ADN cellulaire, est localisé au niveau du site PvuII du vecteur pUC18 tel que montré dans la cartographie présentée à la **figure 4**. Cette cartographie a été réalisée par le Dr Claude Lavallée dans le laboratoire du Dr Thibodeau.

Le système de numérotation des nucléotides dans le Genbank a été utilisé (numéro d'identification : M199211). Le gène *nef* s'étend du nucléotide 8787 au nucléotide 9407. Tel que montré dans la séquence partielle du plasmide pNL4.3 présentée à la **figure 5**, il comporte quatre codons Met (atg). Le premier représente le codon d'initiation au début du gène aux positions 8787-8789 tandis que le second codon Met interne qui constitue le deuxième codon d'initiation du gène *nef* se situe aux positions 8844-8846. Les deux autres codons Met, qui se situent aux positions 9021-9023 et 9303-9305, ne présenteraient pas de potentiel d'initiation de la transcription.

#### **3.1.2 Description des provirus isogènes construits**

Les trois constructions moléculaires isogènes nommées pNL4.3 CDS1, pNL4.3 CDS2 et pNL4.3 CDS1.2 ont été construits à partir du clone sauvage pNL4.3.

**Figure 4 : Cartographie du plasmide pNL4.3.**

Cette cartographie partielle réalisée par le Dr Claude Lavallée est basée sur la séquence de pNL4.3 publiée dans GenBank (numéro d'identification: M199211). Elle met en évidence l'organisation du génome proviral pNL4.3 (Adachi *et al.*, 1986). Ce plasmide d'environ 14 800 pb est un clone recombinant proviral composé de la portion 5' de l'ADN de l'isolat VIH-1 NY5 et de la portion 3' de l'ADN de l'isolat VIH-1 LAI. La jonction des deux portions correspond au site EcoRI aux positions 5743-5748 présent dans le gène *vpr*. Le génome du VIH-1 est cloné dans le vecteur pUC18 au niveau du site PvuII.



**Figure 5 : Séquence partielle de pNL4.3 contenant le gène *nef*.**

Le gène *nef* est situé entre les nucléotides 8787 et 9407 dans la séquence du plasmide pNL4.3. Le premier codon d'initiation (1) est au début du gène tandis que le second codon d'initiation interne (2) se situe aux positions 8844-8846. Les deux autres codons Met internes se situent aux positions 9021-9023 (3) et 9303-9305 (4) respectivement. Le site BamHI (ggatcc, 8465-8480) localisé en amont du gène *nef* ainsi que les sites XhoI (ctcga, 8887-8891) et Asp 718 (ggtacc, 9006-9011) localisés à l'intérieur du gène *nef* mais en aval du second codon Met interne ont servi à la mutagenèse et/ou au clonage des différents fragments portant les mutations dans le gène *nef* générés par PCR.





Le plasmide pNL4.3 CDS1 est une construction dans laquelle le premier codon d'initiation du gène *nef* (8788-8891) a été éliminé en introduisant un site *Sma*I (cccggg, 8787-8792) couplé à un codon de terminaison prématuré (*tag*, 8797-8799) situé juste en aval (**figure 6**). Ainsi, la séquence du gène *nef* avoisinant le premier codon d'initiation (*atg*) dans la séquence du provirus sauvage, qui était 5'-a ttt tgc tat aag **atg** ggt ggc aag tgg tca aaa ag-3', a été remplacée par 5'-a ttt tgc tat aac **ccg ggt ggc tag** tgg tca aaa ag-3'. Pour construire ce plasmide, nous avons effectué une mutagenèse dirigée par une série de trois PCR : un premier PCR (PCR-1 : 8458-8809) avec les amorces  $A_1$  (8458-8476) : 5'-agt gaa cgg atc ctt agc a-3'(sens) et  $A_2$  (8809-8774): 5'-ttt ttg acc act agc cac ccg ggt tat agc aaa at-3'(antisens) et le pNL4.3 comme matrice; un second PCR (PCR-2 : 8774-9016) avec les amorces  $A'_2$  (8774-8809): 5'-att ttg cta taa ccc ggg tgg cta gtg gtc aaa aa-3'(sens) et  $A_3$  (9016-8997): 5'-ctt aaa ggt acc tga ggt gt-3' (antisens) et le pNL4.3 comme matrice également; et un dernier PCR (PCR-3 : 8458-9016), en utilisant les produits purifiés des réactions PCR-1 et PCR-2 comme matrice et les amorces  $A_1$  (sens) et  $A_3$  (antisens). La séquence des oligonucléotides  $A_2$  et  $A'_2$  qui contenait les modifications décrites ci-haut est montrée dans le **Tableau I**.

Le plasmide pNL4.3 CDS2 est une construction dans laquelle le second codon d'initiation potentiel du gène *nef* (8844-8846) a été éliminé en introduisant un site *Xba*I ou *Bgl*II (agatctaga, 8841-8849) couplé à un codon de terminaison (*tga*, 8850-8852) juste en aval (**figure 6**). Ainsi, la séquence du gène *nef* avoisinant le second codon d'initiation dans le provirus sauvage qui était 5'-ta agg gaa aga **atg** aga cga gct gag cga-3' a été remplacée par 5'-ta agg gaa **aga tct** aga **tga** gct gag cga -3'.

**Figure 6: Séquences partielles du gène *nef* des différents provirus isogènes.**

Ces séquences partielles montrent les différentes modifications propres à chaque construction. Le gène *nef* du pNL4.3 CDS1 ne possède pas le premier codon d'initiation (atg, 8788-8791) suite à l'introduction d'un site SmaI (cccggg, 8787-8792) couplé à un codon de terminaison prématuré (tag, 8797-8799) juste en aval. Le gène *nef* de pNL4.3 CDS2 ne possède pas le second codon d'initiation (atg, 8844-8846) suite à l'introduction d'un site XbaI ou BglII (agatctaga, 8841-8849) couplé également à un codon stop prématuré (tga, 8850-8852) juste en aval. Le gène *nef* du pNL4.3 CDS1.2 ne possède ni le premier ni le second codon d'initiation suite à la combinaison des modifications décrites dans pNL4.3 CDS1 et pNL4.3 CDS2. Les mutations ponctuelles effectuées dans la séquence du provirus sauvage pNL4.3 sont représentées en majuscule dans la séquence des provirus isogènes.

8761 NL4.3 gggcttggaa aggatTTTgc tataa**gatgg** gtggcaagtg gtcaaaaagt agtgtgattg  
CDS1 gggcttggaa aggatTTTgc tataa**CCGg** **gtggcTagt**g gtcaaaaagt agtgtgattg  
CDS2 gggcttggaa aggatTTTgc tataa**gatgg** gtggcaagtg gtcaaaaagt agtgtgattg  
CDS1.2 gggcttggaa aggatTTTgc tataa**CCGg** **gtggcTagt**g gtcaaaaagt agtgtgattg

8821 NL4.3 gatggcctgc tgtaaggaa **agaatg**agac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag  
CDS1 gatggcctgc tgtaaggaa **agaatg**agac gagctgagcc agcagcagat ggggtgggag  
CDS2 gatggcctgc tgtaaggaa **agaTCTagaT** **gagctgagcc** agcagcagat ggggtgggag  
CDS1.2 gatggcctgc tgtaaggaa **agaTCTagaT** **gagctgagcc** agcagcagat ggggtgggag

8881 NL4.3 cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca  
CDS1 cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca  
CDS2 cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca  
CDS1.2 cagtatctcg agacctagaa aaacatggag caatcacaag tagcaataca gcagctaaca

Pour réaliser la construction pNL4.3 CDS2, nous avons effectué une seule réaction d'amplification par PCR (PCR-4 : 8458-8895) en utilisant les amorces  $A_1$  (sens) et  $A_4$  (8895-8833) : 5'- ggt ctc gag ata ctg ctc cca ccc cat ctg ctg ctg gct cag ctc atc tag atc ttt ccc tta- 3' (antisens) qui porte les modifications décrites dans cette construction et le pNL4.3 comme matrice (**Tableau I**).

Le plasmide pNL4.3 CDS1.2 est une construction qui présente les modifications décrites dans pNL4.3 CDS1 et dans pNL4.3 CDS2 (**figure 6**). Pour construire ce plasmide, nous avons également effectué une seule réaction d'amplification par PCR (PCR-5 : 8458-8895) en utilisant les amorces  $A_1$  (sens) et  $A_4$  (antisens) et le provirus mutant pNL4.3 CDS1 comme matrice.

### 3.1.3 Mutagenèse dirigée par PCR

#### 3.1.3.1 Les oligonucléotides

Tous les oligonucléotides utilisés (**Tableau I**) ont été obtenus de la compagnie Life Technologies sous forme lyophilisée. Ils ont été reconstitués dans de l'eau déionisée stérile et quantifiés par spectrophotométrie (spectrophotomètre PMQ3 Zeiss, Allemagne) suivant la formule :

$$\text{Concentration de l'oligo } (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times \text{masse/DO} \times \text{FD}$$

avec :  $A_{260}$  = absorbance à 260 nm.  
FD = facteur de dilution

Une aliquote de chaque oligonucléotide a été ajustée à 20  $\mu\text{M}$  pour les réactions d'amplification par PCR. La température optimale d'hybridation de chaque

**Tableau I: Les oligonucléotides utilisés**

	Utilisation	Modification	Séquence
<i>A</i> <sub>1</sub> (8458-8476) (sens)	PCR-1, PCR-3, PCR-4, PCR-5, séquençage	N/A	5'-agt gaa cgg atc ctt agc a-3'
<i>A</i> <sub>2</sub> (8774-8809) (sens)	PCR-2	premier codon d'initiation	5'-att ttg cta taa <b>ccc ggg</b> tgg cta gtg gtc aaa aa-3'
<i>A</i> ' <sub>2</sub> (8809-8774) (antisens)	PCR-1	premier codon d'initiation	5'-ttt ttg acc <b>act agc cac ccg ggt</b> tat agc aaa at-3'
<i>A</i> <sub>3</sub> (9016-8997) (antisens)	PCR-2, PCR-3 et séquençage	N/A	5'-ctt aaa ggt acc tga ggt gt-3'
<i>A</i> <sub>4</sub> (8895-8833) (antisens)	PCR-4, PCR-5	deuxième codon d'initiation	5'-ggt ctc gag ata ctg ctc cca ccc cat ctg ctg ctg gct cag ctc <b>atc tag atc</b> ttt ccc tta-3'
<i>A</i> <sub>5</sub> (8741-8760) (sens)	RT-PCR et séquençage	N/A	5'-tat tcg cca cat acc tag aa-3'
<i>A</i> <sub>6</sub> (9460-9441) (antisens)	RT-PCR et séquençage	N/A	5'-cca cgc ctc cct gga aag tc-3'

oligonucléotide a été également évaluée en calculant la  $T_m$  (“melting temperature”) selon la formule :

$$T_m = 59,9 + 41 (\%GC) - (675 / \text{longueur de l'amorce})$$

### 3.1.3.2 Les réactions d'amplification par PCR

Le milieu réactionnel est constitué de : a) 1,0  $\mu\text{M}$  de chaque oligonucléotide (sens et antisens); b) la matrice d'ADN préalablement dénaturée à 100°C pendant 5 min (10 ng de pNL4.3 dans les réactions PCR-1, PCR-2 et PCR-4; 10 ng de pNL4.3 CDS1 dans la réaction PCR-5 et 25 ng de chacun des produits PCR-1 et PCR-2 purifiés dans la réaction PCR-3); c) 0,2 mM de chaque dNTP (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada); d) 50 mM de tampon Tris.HCl (pH 8,3); e) 10 mM KCl et de 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$  et le tout est complété à 99,5  $\mu\text{L}$  avec de l'eau distillée puis chauffé à 100°C pendant 5 min avant d'ajouter 0,5  $\mu\text{L}$  (2,5 U) d'enzyme polymérase Taq (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada). Après avoir bien mélangé et centrifugé cette préparation quelques secondes, 100  $\mu\text{L}$  d'huile minérale ont été ajoutés sur la phase aqueuse pour éviter l'évaporation durant la réaction d'amplification. Les tubes ont été placés dans le thermocycleur (Perkin Elmer Cetus, DNA Thermal Cycler) en effectuant une nouvelle dénaturation des acides nucléiques à 94°C pendant 3 min suivi de 25 cycles de réaction d'amplification selon le programme suivant: 94°C pendant 2 min, 44°C pendant 2 min et 72°C pendant 2 min. Pour terminer, la réaction a été complétée par un cycle d'extension des produits amplifiés à 72°C pendant 3 min.

### 3.1.3.3 Analyse électrophorétique des produits PCR

À la fin des réactions PCR, une solution de tampon de chargement 6X (10 mM Tris.Cl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 0,25% xylène cyanol FF et 30% glycérol) a été diluée (1:6) avec 10 µL de la phase aqueuse des différents échantillons. Le tout a été déposé dans différents puits d'un gel d'agarose 1,8% préparé dans du tampon TAE (40 mM Tris-acétate, 1mM EDTA). Le gel a été immergé dans du tampon d'électrophorèse TAE contenant 1 µg/mL de bromure d'éthidium. Des marqueurs de hautes masses moléculaires (ADN génomique du phage λ digéré par HindIII) et de faibles masses moléculaires (échelle de fragments de multiples de 100 pb) mélangés également avec du tampon de chargement 6X (tampon dilué 1:6) ont été utilisés comme référence. Un voltage constant de 100 volts a été appliqué à travers le gel avec un générateur de puissance (Pharmacia, EPC 500/400, USA). À la fin de l'électrophorèse, les gels ont été examinés sous éclairage UV et photographiés.

Après une analyse satisfaisante, l'huile minérale déposée au-dessus de la phase aqueuse des échantillons a été éliminée par une extraction avec un volume égal de chloroforme. Les produits des différentes amplifications ont été ensuite purifiés selon la même procédure de purification de minipréparation de plasmide décrite un peu plus loin. Ceci consiste à effectuer une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) suivie d'une extraction au chloroforme-alcool isoamylique (24:1) et d'une précipitation à l'éthanol (voir section 3.1.4.2).



### 3.1.3.4 Clonage des fragments PCR

Les fragments d'ADN purifiés issus des réactions PCR-3, PCR-4 et PCR-5 portant les modifications attendues dans les constructions pNL4.3 CDS1, pNL4.3 CDS2 et pNL4.3 CDS1.2 ainsi que le provirus sauvage pNL4.3 (20 µg) ont été digérés avec 20 U de l'enzyme BamHI et 20 U de l'enzyme XhoI (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada) pendant 3 heures à 37°C. Les inserts avec les extrémités cohésives BamHI et XhoI ont ensuite été clonés au niveau de ces mêmes sites dans le provirus pNL4.3 en remplacement du fragment original correspondant, en effectuant une réaction de ligation durant la nuit à 16°C suivant un rapport molaire 1:3 qui favorise le clonage de l'insert.

### 3.1.4 Amplification et purification des plasmides

#### 3.1.4.1. Transformation bactérienne

Des bactéries compétentes *E. coli* de la souche XL-1 Blue MRF' (Stratagene, CA, USA) ont été préparées au laboratoire par le Dr Claude Lavallée et conservées à -60°C sous forme d'aliquotes de 1 mL. Un volume de 5 µL de l'échantillon de ligation, issu du clonage des fragments PCR comportant les modifications du gène *nef*, a été mélangé avec 200 µL de la suspension bactérienne préalablement décongelée à 0°C pendant 10 min. Le tout a été incubé sur glace pendant 1 heure, puis à 42°C pendant exactement 90 secondes et de nouveau sur glace pendant 2 min. Un mL de milieu L-Broth (LB) (10 g de bactotryptone, 5 g d'extrait de levure et 10 g de NaCl dissout dans 1 L d'eau) (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada) sans antibiotique a été ajouté et les bactéries ont été incubées à 37°C pendant 30 min. Après une centrifugation à 12 000 g (Eppendorf

Centrifuge 5112, CA, USA) pendant 1 min, le culot de bactéries a été remis en suspension dans 200 µL de milieu LB sans antibiotique. Des volumes de 50 et 150 µL de la suspension bactérienne ont été étalés sur des géloses de milieu LB agar contenant 60 µg/mL d'ampicilline (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada). Les géloses ont été ensuite incubées à 37°C en position inversée pendant 16 heures.

#### **3.1.4.2 Minipréparation de plasmide**

Une série de tubes contenant 4 mL de milieu LB stérile additionné de 100 µg/mL d'ampicilline a été inoculée avec différentes colonies bactériennes choisies au hasard sur les géloses en conditions stériles. Les cultures ont été incubées durant la nuit à 37°C avec une agitation de 200 rpm. Les suspensions bactériennes ont été ensuite centrifugées à 12 000 g dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL pendant 30 sec. Les culots de bactéries ont été ensuite resuspendus dans 100 µL de la solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris.HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA) et les bactéries ont été incubées à la température de la pièce pendant 10 min. Un volume de 200 µL de la solution II (0,2 N NaOH, 1% SDS) a été ajouté et les préparations ont été ensuite incubées dans la glace pendant 10 min, avant d'ajouter finalement 150 µL de la solution III (600 mL d'acétate de potassium 5M, 115 mL d'acide acétique glacial et 285 mL d'eau distillée pour 1 L). Après une incubation dans la glace pendant 15 min, le milieu a été clarifié par une centrifugation à 12 000 g durant 10 min. Aux différents surnageants recueillis, un volume égal de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) a été ajouté. Après une vigoureuse agitation au vortex, les préparations ont été centrifugées de nouveau dans les mêmes conditions. La phase aqueuse qui contient l'ADN a été récupérée et un volume égal d'un mélange

chloroforme-alcool isoamylique (24:1) a été ajouté et mélangé vigoureusement suivi d'une centrifugation dans les mêmes conditions. La phase aqueuse contenant l'ADN a été de nouveau récupérée et précipitée à -20°C pendant 20 min avec 2 volumes d'éthanol froid 100% et 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5,2). Les préparations ont été ensuite centrifugées à 12 000 g durant 20 min. Les différents culots d'ADN obtenus ont été lavés avec 100 µL d'éthanol froid 70% puis séchés et solubilisés dans 20 µL de tampon Tris-EDTA (10 mM Tris.HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0) contenant 20 µg/mL de RNase A (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada). Les clones de plasmides purifiés ont été ensuite analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1% avant et après digestion par des endonucléases de restriction.

#### **3.1.4.3 Maxipréparation de plasmide**

Un litre de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline a été inoculé avec un volume de 50 à 100 µL de la suspension d'une minipréparation bactérienne d'un clone présomptif. Le milieu a été incubé à 37°C pendant 18 heures sous agitation à 250 rpm. Les bactéries ont été centrifugées à 2 500 rpm (Beckman GPR, CA, USA) pendant 20 min à 4°C puis resuspendues dans 30 mL de la solution I additionnée de 2 mL d'une solution de 10 mg/mL de lysosyme fraîchement préparée dans du tampon Tris.HCl 10 mM (pH 8,0). Le milieu a été incubé à la température de la pièce pendant 10 min. Soixante mL de la solution II ont été ajoutés à la préparation suivi d'une incubation dans de la glace pendant 15 min. Un volume de 45 mL de la solution III a par la suite été ajouté, suivi d'une incubation dans de la glace pendant 30 min. Après une centrifugation à 3 000 rpm pendant 20 min à 4°C, le surnageant contenant les acides nucléiques a été filtré

sur cinq épaisseurs de coton fromage. Le filtrat a été ensuite précipité avec 1/2 volume d'isopropanol (environ 140 mL) puis incubé à la température de la pièce pendant un minimum d'une heure. La préparation a été centrifugée à 3 000 rpm pendant 30 min. Le culot obtenu a été séché puis solubilisé dans 7,5 mL de tampon TE. La solution d'acide nucléique a été précipitée avec 2,5 mL d'acétate d'ammonium 10 M et conservée sur glace pendant 1 heure. Le surnageant a été ensuite récupéré après une centrifugation à 4 000 rpm (Sorvall RC Refrigerated Superspeed Centrifuge, CA, USA) pendant 20 min à 4°C, puis précipité avec 2 volumes d'éthanol froid 100% dans de la glace pendant 20 min. Après une centrifugation à 5 000 rpm pendant 30 min à 4°C, le précipité a été solubilisé dans 7 mL de tampon TE contenant 20 µg/mL de RNase A suivi d'une incubation à 37°C pendant 30 min. Trois mL d'une solution de NaCl 5 M et 2,5 mL d'une solution de 30% polyéthylène glycol (PEG 6000), 2,5 M NaCl ont été ajoutées à la préparation et le milieu a été incubé à 4°C pendant 30 min. Après une centrifugation à 5 000 rpm pendant 20 min à 4°C, le culot obtenu a été solubilisé dans 1 à 3 mL de tampon TE. Les plasmides ont été ensuite extraits deux fois avec un volume égal de phénol-chloroforme (1:1). L'échantillon a été vigoureusement mélangé et centrifugé à 1 000 rpm pendant 10 min à 4°C. La phase aqueuse a été récupérée et soumise à une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) puis au chloroforme-alcool isoamylique (24:1). La phase aqueuse contenant l'ADN a été récupérée et précipitée à -20°C pendant 20 min avec 2 volumes d'éthanol froid 100% et 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M. Après une centrifugation à 1 000 rpm pendant 20 min à 4°C, le culot a été lavé avec un volume égal d'éthanol froid 70%, séché et solubilisé dans 1 mL de tampon TE. Une fois la concentration de la maxipréparation de plasmide ajustée à 1 µg/µL, la préparation a été

distribuée en aliquotes de 1mL et conservée à 4°C. Cette préparation de plasmides a été utilisée pour le séquençage et pour les expériences de transfection des cellules CEM.

### **3.1.5 Analyse des plasmides**

#### **3.1.5.1 Évaluation des quantités d'ADN par spectrophotométrie**

L'évaluation quantitative de la production de plasmides a été faite par spectrophotométrie en déterminant la densité optique à 260 nm de la maxipréparation de plasmide suivant une dilution appropriée telle que la densité optique à 260 nm soit supérieure à 0,2. La concentration de plasmide ( $\mu\text{g/mL}$ ) a été estimée selon la formule suivante :

$$\text{Concentration en plasmide (mg/mL)} = (A_{260} \times \text{F.D}) / 21$$

avec :  $A_{260}$  = absorbance à 260 nm.  
FD = facteur de dilution

#### **3.1.5.2 Digestion avec des endonucléases de restriction**

Les minipréparations de plasmides des différents clones (2  $\mu\text{L}$ ) ont été analysées qualitativement en vérifiant leur taille moléculaire après électrophorèse sur un gel d'agarose 1% ainsi que leur profil de migration avant et après digestion avec des enzymes de restriction. Les différentes réactions de digestion ont été effectuées selon le protocole du manufacturier des enzymes de restriction (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada).

Les provirus isogènes construits présentent un patron de migration différent de celui du provirus sauvage pNL4.3 après une digestion avec certaines enzymes spécifiques. Cette propriété a été utilisée comme moyen de criblage pour les différentes

constructions. Ainsi, le provirus pNL4.3 CDS1 a été digéré par SmaI pour vérifier la forme linéaire du plasmide avec la présence de ce site de restriction unique qui a été introduit lors de la mutagenèse. Le provirus pNL4.3 CDS2 a été digéré par BglII ou XbaI pour vérifier la présence d'un site additionnel pour cette enzyme de restriction introduit également avec la mutagenèse, tandis que le provirus pNL4.3 CDS1.2 a été digéré par SmaI, puis par BglII ou XbaI pour vérifier le phénotype de pNL4.3 CDS1 et de pNL4.3 CDS2.

### **3.1.5.3 Analyse électrophorétique sur gel d'agarose**

Une solution 6X de tampon de chargement (0,25% xylène cyanol FF, 30% glycérol dans du Tris-EDTA 1 mM) a été diluée 1:6 avec le produit des différentes digestions puis le tout a été déposé dans différents puits d'un gel d'agarose 1% préparé dans du tampon Tris-acétate/EDTA (TAE) (40 mM Tris-acétate, 1 mM EDTA). L'électrophorèse a été ensuite effectuée dans les mêmes conditions que celles décrites au point 3.1.3.3.

### **3.1.5.4 Analyse des provirus isogènes par séquençage**

Le séquençage des nucléotides a été effectué sur les différents clones des provirus isogènes pNL4.3 CDS1, pNL4.3 CDS2 et pNL4.3 CDS1.2 qui répondaient aux critères qualitatifs des modifications attendues sur gel d'agarose. Ces séquençages effectués avec un séquenceur par capillarité (310 Genetic Analyser, Perkin Elmer, USA) ont été réalisés par le personnel du service de séquençage de l'INRS-Institut Armand-Frappier (Santé Humaine) en utilisant des amorces antisens, soit  $A_3$  (9016-8997) : 5'-ctt aaa ggt acc tga

ggt gt-3' ou  $A_6$  (9460-9441): 5'-cca cgc ctc cct gga aag tc-3' pour le séquençage du brin sens de l'ADN bicaténaire et des amorces sens, soit  $A_1$  (8458-8476) : 5'-agt gaa cgg atc ctt agc a-3' ou  $A_5$  (8741-8760): 5'-tat tcg cca cat acc tag aa-3' pour le séquençage du brin antisens de l'ADN bicaténaire

### 3.2 Production des virus isogènes dans les cellules CEM.

Les premières progénitures virales présentant les modifications respectives introduites dans le gène *nef* du provirus sauvage pNL4.3 ont été obtenues en transfectant des cellules de la lignée CEM avec les provirus isogènes.

#### 3.2.1 Lignée cellulaire CEM

Les cellules CEM nous ont été gracieusement fournies par le Pr Luc Montagnier (Institut Pasteur, Paris, France). Ces cellules sont des lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup> isolées à l'origine chez une fillette atteinte d'une leucémie lymphoblastoïde aiguë. Les cellules ont été décongelées rapidement à 37°C dans un bain-marie (Aquatherm Water Bath Shaker, New Brunswick Scientific, New Brunswick, Canada), puis mises en culture dans du milieu RPMI-1640 (GIBCO-BRL, Life Technologies, NY, USA) additionné de 50 µg/mL de gentamicine (GIBCO-BRL, Life Technologies, NY, USA), 2 mM de glutamine (GIBCO-BRL, Life Technologies, NY, USA), 10 µM de 2-mercapto-éthanol (ICN Biochemicals, Cleveland, OH, USA) et 10% de sérum fœtal bovin (SFB) (MEDICORP, Montréal, Canada) (RPMI complet). Les cellules ont été maintenues en culture dans du RPMI complet à une concentration de  $0,4 \times 10^6$  cellules au mL à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub> dans des flacons de polystyrène de 25 cm<sup>2</sup>

(Corning Costar Corporation, Cambridge, USA). Les cellules ont été comptées deux fois par semaine et la concentration cellulaire a été ajustée à  $0,4 \times 10^6$  cellules par mL.

### 3.2.2 Transfection des cellules CEM

Des cellules CEM ont été réparties dans des tubes à raison de  $10 \times 10^6$  cellules par échantillons de transfection. Après une centrifugation à 900 rpm (Beckman GPR, CA, USA) pendant 5 min à la température de la pièce, les cellules ont été remises en suspension, lavées avec 10 mL de milieu RPMI sans SFB et centrifugées. Les culots cellulaires, repris dans 1 mL de milieu RPMI sans SFB, ont été incubés à  $37^\circ\text{C}$  pendant 1 heure avec la solution de transfection composée de 10  $\mu\text{g}$  du plasmide, 150  $\mu\text{L}$  de DEAE-dextran 0,5% et 2 mL de milieu RPMI sans SFB. Après 30 min d'incubation, la suspension cellulaire a été mélangée délicatement. Les cellules ont été ensuite centrifugées à 900 rpm pendant 5 min et les culots cellulaires ont été lavés avec du milieu RPMI sans SFB. Les cellules ont été reprises dans 10 mL de milieu RPMI complet puis transférées dans des flacons en polystyrène de 25  $\text{cm}^2$  et incubées à  $37^\circ\text{C}$  sous atmosphère humide en présence de 5% de  $\text{CO}_2$ . Les cultures ont été observées quotidiennement avec un microscope inversé (Leitz-Diavert, Allemagne) et les cpe ont été notés. Des passages cellulaires à  $0,5 \times 10^6$  cellules/mL ont été effectués tous les 3 jours. Le taux de mortalité, estimé par un test d'exclusion au bleu de trypan 0,5 %, a été noté régulièrement. Le suivi de la réplication virale a été évalué quantitativement avec un microscope inversé sur la base du nombre de syncytia observés par champ microscopique à un grossissement de 400X selon l'échelle suivante : + = 1-2, ++ = 3-9, +++ = 10-20, ++++ = > 20. Des lames pour immunofluorescence ont été préparées à chaque passage cellulaire en vue de déterminer, en pourcentage, le nombre de cellules exprimant les



protéines virales. Les différentes données enregistrées, durant les 12 à 15 jours après la transfection, ont permis de dresser une cinétique de la mortalité cellulaire et de l'expression des protéines virales. Ceci aura permis de déterminer le pic de l'infection caractérisé par une expression maximale des protéines virales. Les progénitures virales dans les surnageants infectieux récoltés au moment du pic de l'infection ont été ensuite amplifiées en vue de constituer des banques virales.

### **3.2.3 Infection des cellules CEM**

Des cellules CEM ont été infectées avec les différents surnageants infectieux provenant de la transfection des cellules CEM dans le but de produire une banque virale nécessaire aux études ultérieures.

#### **3.2.3.1 Production des banques virales.**

La production des banques virales VIH-1 CDS1, VIH-1 CDS2, VIH-CDS1.2 et VIH-1 NL4.3 a été effectuée en infectant 5 millions de cellules CEM dans des flacons de polystyrène de 25 cm<sup>2</sup> contenant 10 mL de milieu RPMI complet avec 100 µL des surnageants infectieux provenant de la transfection des cellules CEM avec les provirus pNL4.3 CDS1, pNL4.3 CDS2, pNL4.3 CDS1.2 et pNL4.3 respectivement. Les cellules ont été maintenues en culture à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Un passage cellulaire a été effectué après trois jours en ramenant la concentration cellulaire à 0,5 x 10<sup>6</sup> cellules au mL avec du milieu frais. Après l'apparition des premiers cpe, les cellules infectées ont été amplifiées dans des flacons de polystyrène de 75 cm<sup>2</sup> contenant 40 mL de milieu RPMI complet. Lorsque les cpe sur les cellules CEM ont été à leur maximum, les milieux de cultures ont été centrifugés à 900 rpm pendant 5 min à la

température de la pièce et les surnageants infectieux respectifs ont été répartis en aliquotes de 1 mL puis conservés à -70°C.

### 3.2.3.2 Évaluation des effets cytopathogènes

Quatre millions de cellules CEM ont été infectées avec les virus VIH-1 NL4.3, VIH-1 CDS1, VIH-1 CDS2, VIH-1 CDS1.2 et VIH-1 LAI à un indice de multiplicité de 0,1 DICT<sub>50</sub>/cellule. Des culots cellulaires de  $4 \times 10^6$  cellules ont été mis en contact avec chacun des virus pendant 1 heure à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été ensuite transférées dans des flacons de polystyrène de 25 cm<sup>2</sup> dans un volume final de 10 mL de milieu RPMI complet et incubées à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub> durant 7 jours. Les cpe ont été évalués quotidiennement et les titres ont été déterminés sept jours post-infection par la formule de Kärber (voir section 3.5.3).

### 3.2.4 Analyse des progénitures virales

#### 3.2.4.1 Amplification du gène *nef* par RT-PCR

Dans le but d'effectuer une caractérisation physique du gène *nef* des virus construits (analyse électrophorétique sur un gel d'agarose et séquençage des nucléotides), nous avons amplifié ce gène par RT-PCR à partir de l'ARN génomique viral purifié. Les réactions RT-PCR ont été réalisées avec un kit pour RT-PCR "Titan One Tube" selon le protocole du manufacturier (Roche Molecular Biochemicals, Laval, QC, Canada). Les amorces  $A_5$  (8741-8760): 5'-tat tcg cca cat acc tag aa-3' (sens) et  $A_6$  (9460-9441): 5'-cca cgc ctc cct gga aag tc-3' (anti-sens) situées en amont et en aval du gène *nef* respectivement ont été utilisées. Les culots d'ARN ont été obtenus après

ultracentrifugation des surnageants infectieux respectifs dans des tubes de 4,5 mL à 40 000 rpm (Beckman L8-80 Ultracentrifuge, CA, USA) pendant 1 heure puis purifiés après 3 à 4 extractions au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1). Les tubes contenant les différentes composantes de la réaction RT-PCR ont été placés dans le thermocycleur (modèle 9600, Perkin Elmer, CA, USA) en appliquant le programme suivant : une réaction avec la transcriptase inverse à 45°C pendant 30 min; un cycle de dénaturation à 94°C pendant 3 min; une première étape de PCR sur 10 cycles de réactions selon le programme suivant: 94°C pendant 2 min, 42°C pendant 30 sec et 68°C pendant 2 min; une seconde étape de PCR sur 25 cycles avec le même programme auquel une réaction d'extension de 2 sec à 68°C par cycle a été ajouté. Pour terminer, la réaction a été complétée par un cycle d'extension des produits amplifiés à 68°C pendant 5 min. Les différents produits d'amplification ont été ensuite analysés sur un gel d'agarose suivant la procédure décrite à l'article 3.1.3.3.

#### **3.2.4.2 Analyse des nucléotides par séquençage**

Le séquençage des nucléotides a été effectué sur les produits de l'amplification par RT-PCR du gène *nef* à partir de l'ARN génomique purifié des virus VIH-1 CDS1, VIH-1 CDS2 et VIH-1 CDS1.2. Ces séquençages effectués avec un séquenceur par capillarité ont été réalisés par le personnel du service de séquençage de l'INRS-Institut Armand-Frappier (Santé Humaine) dans les mêmes conditions que celles décrites à l'article 3.1.5.4.

### **3.2.4.3 Détection des protéines virales du VIH par immunofluorescence indirecte**

Afin de détecter la présence des protéines virales dans les cellules transfectées ou infectées, une technique d'immunofluorescence indirecte sur lame a été utilisée. Un volume de 0,5 à 1 mL de cellules CEM transfectées ou infectées a été lavé avec 15 mL de PBS, puis centrifugé à 900 rpm pendant 5 min. Le surnageant a été vidangé et le culot a été remis en suspension avec le surnageant résiduel. Quinze  $\mu\text{L}$  de cellules ont été déposés dans 2 cupules distinctes d'une lame de 12 cupules (ICN Biomedicals, OH, USA). Les lames ont été observées au microscope inversé pour s'assurer de la présence d'une quantité suffisante de cellules. Les cellules ont été séchées sous la hotte biologique pendant 30 min, puis fixées pendant 30 min dans de l'acétone froide à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Les lames ont été ensuite lavées avec de l'eau distillée pendant 3 min puis asséchées sous le laminaire. La coloration pour l'examen au microscope à fluorescence a été réalisée en ajoutant 30  $\mu\text{L}$  de sérum humain anti-VIH-1 dilué 1:100 par puits. Un sérum humain négatif a été aussi utilisé comme témoin négatif. Après une incubation à  $37^{\circ}\text{C}$  sous atmosphère humide avec 5% de  $\text{CO}_2$  pendant 2 heures, les lames ont été lavées trois fois pendant 3 min avec agitation dans du PBS. Les cellules exprimant les antigènes du VIH ont été révélées en ajoutant 20  $\mu\text{L}$  d'un mélange d'anti-immunoglobulines (Fab') A, G et M humaines conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine dilué 1:100 dans du PBS contenant 1/25 de rhodamine (Difco Laboratories, Michigan, USA). Les lames ont été ensuite incubées à  $37^{\circ}\text{C}$  sous atmosphère humide avec 5% de  $\text{CO}_2$  pendant 1 heure. Après une série de trois lavages de 5 min avec agitation dans du PBS, le montage entre lame et lamelle a été effectué en ajoutant une goutte de glycérol 90% dans du PBS. Les lames ont

été ensuite observées sous un microscope à fluorescence (Leitz Laborlux S, Allemagne) et le pourcentage des cellules qui expriment les protéines du VIH fut déterminé.

#### 3.2.4.4 Titrage viral

Pour déterminer la dose infectieuse 50% en culture de tissu (DICT<sub>50</sub>), les titrages des virus produits ont été effectués par la méthode de dilution limite dans des plateaux de 24 puits. Les surnageants des cellules infectées par les différents virus ont été dilués suivant un facteur décimal de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup> avec du milieu RPMI sans SFB. Un culot de 1,6 x 10<sup>6</sup> cellules CEM a été mis en contact avec 100 µL de chaque dilution virale pendant 1 heure à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules infectées par chaque dilution virale ont été ensuite réparties dans 4 puits distincts à raison de 4 x 10<sup>5</sup> cellules par puits dans un volume final de 1 mL. Les plateaux ont été incubés à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après 4 jours, 1 mL de milieu frais a été ajouté dans chaque puits. Un suivi de la multiplication virale a été effectué quotidiennement pendant 7 jours par une évaluation visuelle des cpe à l'aide d'un microscope inversé. Ces effets sont caractérisés par l'apparition d'agglomérations de cellules, de fusions primaires et secondaires ainsi que par la formation de vacuoles. Après 7 jours, le titre viral a été calculé selon la méthode de Kärber avec la formule suivante :

$$\text{DICT}_{50} = -\Delta - \delta (S - 0,5)$$

Où :  $\Delta$  = log<sub>10</sub> de la dilution virale montrant 100% de cpe

$\delta$  = log<sub>10</sub> du facteur de dilution

S = somme des puits présentant des cpe incluant ceux de la dilution où il y a 100% de cpe. Cette dernière a pour valeur l'unité, et chaque autre dilution une fraction de l'unité.

### **3.2.4.5 Détermination de la cinétique de réplication virale**

La cinétique de réplication des virus isogènes mutants de la protéine Nef a été effectuée dans le but de déterminer si la protéine Nef est impliquée dans la pathogenèse associée à l'infection virale. Cent  $\mu\text{L}$  de dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) de surnageants clarifiés de cellules infectées par les virus isogènes VIH-1 CDS1, VIH-1 CDS2, VIH-1 CDS1.2 ainsi qu'avec le virus sauvage VIH-1 NL4.3 ont été incubés avec  $1,6 \times 10^6$  cellules CEM durant un temps de contact d'une heure à  $37^\circ\text{C}$ . Quatre mL de RPMI complet ont ensuite été ajoutés dans chacun des tubes et chaque échantillon correspondant à une dilution a été répartie dans quatre puits distincts à raison de  $4 \times 10^5$  cellules par puits. Les cultures ont été incubées à  $37^\circ\text{C}$  sous atmosphère humide en présence de 5% de  $\text{CO}_2$  durant 7 jours. Après 4 jours, 1 mL de milieu complet a été ajouté dans chaque puits. La cinétique de réplication de ces virus a été évaluée en faisant un suivi de la croissance virale par une lecture quotidienne pendant 7 jours, à l'aide d'un microscope inversé Leitz-Diavert. L'évaluation des cpe, caractérisés par l'apparition d'agglomérations de cellules, de fusions primaires et secondaires ainsi que la formation de vacuoles a été effectuée selon l'échelle suivante : - = aucun cpe; + : agrégats ; ++ = fusions primaires ; +++ = syncytia et vacuoles et ++++ = fusions secondaires, débris cellulaires, cpe maximaux.

### **3.3 Production de la protéine Nef recombinante dans les cellules High-Five**

La protéine recombinante Nef a été produite dans le système d'expression baculoviral dans des cellules d'insectes High-Five. Cette technique a été mise au point

dans le laboratoire du Dr Lise Thibodeau par le Dr Claude Lavallée qui a également construit le baculovirus recombinant comportant le gène *nef* du VIH-1 LAI.

### 3.3.1 Lignée cellulaire High-Five

La lignée cellulaire High-Five (Invitrogen, CA, USA) est dérivée de cellules ovariennes de *Trichoplusiani*. Un vial retiré de l'azote liquide a été décongelé rapidement à 37°C dans un bain-marie. Les cellules ont été transférées dans un flacon en polystyrène de 25 cm<sup>2</sup> contenant 4 mL de milieu sans sérum ExCell-400 (JRH Biosciences, Kansas, USA) additionné de 2 mM de glutamine et 10 µg/mL de gentamicine. Après une incubation de 30 à 45 min à 28°C, le surnageant cellulaire a été décanté pour éliminer le DMSO, puis a été remplacé par 10 mL de milieu frais. Après 24 heures, les cellules ont été mises en culture à 28°C dans un flacon en polystyrène de 25 cm<sup>2</sup> à raison de 0,1 x 10<sup>6</sup> cellules au mL dans du milieu ExCell-400. Les cellules ont été comptées deux fois par semaine et la concentration cellulaire a été ajustée à 0,1 x 10<sup>6</sup> cellules au mL avec du milieu frais.

### 3.3.2 Infection des cellules High-Five

La première étape de la production de la protéine consistait à infecter 1 x 10<sup>9</sup> cellules High-Five avec le baculovirus recombinant pour la protéine Nef à un MOI de 1 DICT<sub>50</sub>/cellule. Une infection de 1,5 x 10<sup>8</sup> cellules dans les mêmes conditions avec le virus parental ou sauvage de la polyédrie nucléaire de *Autographa californica* (AcNPV) a également été effectuée pour servir de témoin et de référence de l'évolution de l'infection (avec de l'expression exclusive de la polyédrine dans les noyaux des cellules infectées

avec ce virus). Les cellules ont été mises en contact avec les baculovirus pendant 1 heure à 28°C en rotation continue (1 à 2 révolutions par min) dans des bouteilles de culture de tissus de 495 cm<sup>3</sup> en polystyrène. La densité cellulaire a ensuite été ajustée à 1 x 10<sup>6</sup> cellules/mL avec du milieu ExCell-400 additionné de 2 mM de glutamine et 10 µg/mL de gentamicine. Les cellules ont été ensuite placées à 28°C en rotation continue (1 à 2 révolutions par min) à raison de 150 mL par bouteille.

### **3.3.3 Extraction de la protéine Nef**

Les cellules infectées ont été récoltées 4 jours post-infection. Un volume de 1,5 mL de chaque culture a été conservé pour être analysé par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 14%. Le milieu restant a été centrifugé à 1 500 rpm pendant 10 min à 4°C et le surnageant infectieux récolté a été conservé pour d'autres infections éventuelles. Le culot cellulaire a été lavé dans 20 mL de PBS puis le milieu a été centrifugé à 1 500 rpm pendant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire obtenu a été remis en suspension dans du tampon phosphate 100 mM pH 7,5 contenant 500 mM NaCl et 1mM PMSF. La protéine Nef a été ensuite extraite par sonication (Sonic Dismembrator, Fisher Scientific, ON, Canada) en appliquant 6 cycles de 15 secondes à 50 unités. La suspension a été clarifiée par une centrifugation à 8 000 rpm pendant 40 min à 4°C suivie d'une ultracentrifugation à 25 000 rpm (Beckman L8-80 Ultracentrifuge, CA, USA) pendant 1 heure à 4°C. Le surnageant recueilli a été dilué 10 X puis successivement filtré sur un filtre de 0,45 microns puis de 0,22 microns. Le volume final du filtrat a été noté avant de passer à la purification sur colonne, tandis que le culot a été remis en suspension dans 100 mL de tampon phosphate 10 mM, 50 mM NaCl, 0,1 mM PMSF (pH 7,5) puis conservé à 4°C.



### **3.3.4 Purification de la protéine Nef**

La purification a été effectuée à 4°C sur une colonne héparine-sépharose (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada) équilibrée avec du tampon phosphate 10 mM, 50 mM NaCl (pH 7,5). L'application de l'échantillon a été réglée à 30 mL par heure. La colonne a été ensuite lavée avec du tampon phosphate 10 mM, 50 mM NaCl (pH 7,5) et des fractions de 9 mL ont été récoltées (Gilson Microfractionator, Medical Electronics, Middleton, WI, USA). Une élution finale avec du tampon phosphate 10 mM, 0,5 M NaCl (pH 7,5) a été effectuée dans le but de détacher les protéines plus fortement adsorbées. Les fractions ont été analysées sur un gel de polyacrylamide 14%. Les échantillons qui contenaient une protéine dont la masse moléculaire relative était de 25-27 kDa ont été regroupés. Le pool de fractions obtenu a été dialysé pendant 48 heures dans du PBS stérile renouvelé régulièrement. Le dialysat a été lyophilisé (Dura Dry  $\mu$  TM, FTS System) et la poudre recueillie a été solubilisée dans un petit volume d'eau distillée stérile.

### **3.3.5 Analyse physico-chimique de la protéine Nef recombinante**

#### **3.3.5.1 Évaluation de la concentration en protéine par le test de Bio-Rad**

La concentration en protéine a été évaluée par le test de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). À cette fin, une courbe étalon a été d'abord réalisée à partir d'une solution standard d'albumine (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) en préparant différentes concentrations du standard, de 0 à 100  $\mu$ g/100  $\mu$ L additionnées de 5 mL du réactif de Bio-Rad. Après une incubation de 30 min à la température de la pièce, la densité optique a été mesurée à 595 nm avec un spectrophotomètre (PMQ3

Zeiss, Allemagne). Les densités optiques de différentes dilutions de l'échantillon de la protéine Nef de concentration inconnue dans un volume final de 100  $\mu\text{L}$  d'eau distillée ont été évaluées de la même manière. La concentration de la protéine Nef a été ensuite extrapolée en se référant à la portion linéaire de la courbe étalon.

### **3.3.5.2 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide**

#### **3.3.5.2.1 Préparation des gels et des échantillons.**

Les analyses électrophorétiques ont été effectuées sur des gels de 18 cm x 16 cm x 1,5 mm. La concentration en polyacrylamide du gel de séparation était de 14% alors que celle du gel de regroupement était de 5%. La préparation des solutions d'acrylamide ainsi que les différents tampons utilisés sont détaillés en annexe. Après la polymérisation de l'acrylamide, les gels ont été introduits dans le réservoir (Hoefer Scientific Instrument, 600, USA) contenant le tampon d'électrophorèse.

L'analyse des lysats cellulaires provenant des échantillons prélevés à chacune des récoltes de cellules infectées avec le baculovirus recombinant de Nef a été effectuée en remettant en suspension les culots cellulaires correspondant à  $1 \times 10^6$  cellules dans 100  $\mu\text{L}$  de tampon Laemmli. Un dixième de ce volume, soit l'équivalent de  $1 \times 10^5$  cellules, a été utilisé pour les analyses. L'analyse des fractions de la chromatographie a été effectuée en ajoutant 25  $\mu\text{L}$  de tampon Laemmli 4X à 75  $\mu\text{L}$  de la fraction à caractériser. Après avoir déterminé la concentration de la protéine Nef purifiée, des échantillons de 5, 10 et 15  $\mu\text{g}$  dans un volume final de 15  $\mu\text{L}$  ont été préparés. Des standards de faibles masses moléculaires (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) ont été utilisés comme référence. Les échantillons dans un volume final de 80  $\mu\text{L}$  dans le tampon

Laemmlis de concentration 1X ont été dénaturés à 100°C pendant 5 min avant d'être déposés dans les puits du gel.

### **3.3.5.2.2 Analyse électrophorétique**

La migration des protéines sous l'influence d'un champ électrique est fonction de leur poids moléculaire. Un voltage constant de 50 à 70 volts a été appliqué à travers le gel durant environ 15 heures. Le courant a été interrompu lorsque le front de migration a atteint le bas du gel. Les gels ont été fixés dans un mélange méthanol/eau/acide acétique 5/4/1 (V/V/V) pendant 15 min. La révélation des protéines a été faite par une coloration au bleu brillant de Coomassie (Bio-Rad Laboratories) en incubant les gels pendant 2 heures dans une solution de Coomassie de 0,25% préparée dans un mélange méthanol/eau/acide acétique 50/45/7 (V/V/V). Les gels ont été ensuite décolorés par une série de 3 à 4 lavages avec une solution méthanol/eau/acide acétique 3/6/1 (V/V/V) jusqu'à ce que les bandes de protéines apparaissent clairement. Les gels ont été photographiés, puis conservés dans une solution d'acide acétique 10%.

## **3.4 Essais sur le rôle de la protéine Nef dans la cytopathogénicité et l'infectivité du VIH-1 LAI dans les cellules CEM**

### **3.4.1 Rôle de la protéine Nef dans la cytopathogénicité associée à l'infection**

Dans le but d'étudier le rôle de Nef dans la cytopathogénicité du VIH-1 LAI *in vitro*, un culot de  $1,6 \times 10^6$  cellules CEM a été mis en contact avec 100 ou 500 ng de la protéine Nef pendant 1 heure à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été ensuite lavées avec du RPMI puis ont été mises en contact avec 100 µL de chaque dilution du VIH-LAI ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) pendant 1 heure à 37°C. Des cellules CEM

n'ayant pas été mises en contact avec la protéine Nef ont été infectées avec la même préparation virale et dans les mêmes conditions à titre de témoin. Les cellules infectées ont été ensuite réparties dans 4 puits distincts à raison de  $4 \times 10^5$  cellules par puits dans un volume final de 1 mL. Les plateaux ont été incubés à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après 4 jours, 1 mL de milieu complet a été ajouté dans chaque puits. Les cultures cellulaires ont été observées quotidiennement à l'aide d'un microscope inversé Leitz-Diavert et les cpe ont été notés.

### **3.4.2 Rôle de la protéine Nef dans l'infectivité du VIH-1 LAI**

Des cellules CEM ( $1,6 \times 10^6$ ) préalablement mises en contact ou non avec la protéine Nef (100 ou 500 ng), ont été infectées avec le VIH-1 LAI dans les mêmes conditions à un MOI de 0,1 DICT<sub>50</sub>/cellule dans 100 µL. Après un temps de contact d'une heure à 37°C, quatre mL de RPMI complet ont été ajoutés dans chaque tube, puis les cellules ont été mises en culture en quadruplicat dans des plateaux de 24 puits à raison de  $4 \times 10^5$  cellules par puits dans un volume final de 1 mL. Les plateaux ont été incubés à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après 4 jours, 1 mL de milieu frais a été ajouté dans chaque puits. Les cpe ont été notés quotidiennement et les titres viraux ont été calculés selon la formule de Kärber (voir section 3.2.4.4), sept jours post-infection.

## 4. RÉSULTATS

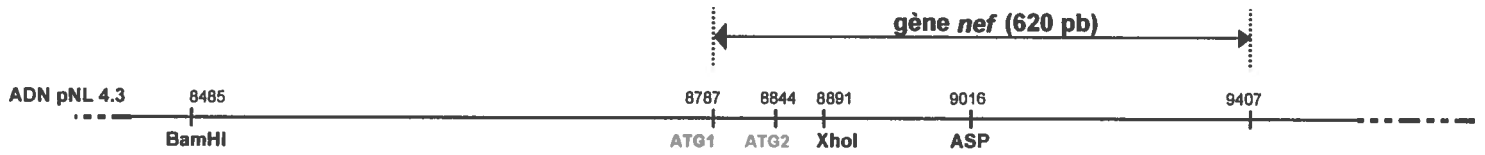
#### 4.1 Construction des provirus isogènes

La construction de virus mutants portant des délétions partielles ou totales dans la protéine Nef était une étape nécessaire à l'étude de certaines de ses propriétés ainsi que pour déterminer si elle joue un rôle dans la pathogenèse associée à l'infection par le VIH.

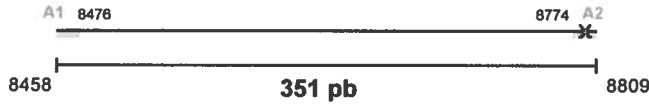
La première étape de la génération de ces virus mutants consistait à introduire, par mutagenèse dirigée par PCR, des mutations prédéterminées dans le gène *nef* du provirus pNL4.3 VIH-1. Les différents produits d'amplification réalisés (PCR-1 à 5), qui ont servi à la construction des trois provirus mutants isogènes (pNL4.3 CDS1, CDS2 et CDS1.2), sont illustrés schématiquement dans la **figure 7**. La première construction a été effectuée par une amplification de gène en trois étapes (PCR-1 à 3), alors que les deux dernières n'auront nécessité qu'une seule étape de réaction d'amplification, soit les réactions PCR-4 et PCR-5. L'analyse électrophorétique des fragments d'ADN issus des réactions PCR-1, PCR-2 et PCR-3, qui ont servi à la construction du provirus mutant pNL4.3 CDS1, est présentée à la **figure 8**. Ces produits correspondent aux fragments d'ADN attendus de 351, 242 et 558 pb, respectivement. En effet, le produit de la réaction PCR-3 est la résultante de l'amplification simultanée des fragments d'ADN issus des réactions PCR-1 et PCR-2 qui se chevauchent sur la longueur de l'amorce  $A_2$  (ou  $A'_2$ ) (35 pb) utilisée dans les deux premières réactions. L'analyse électrophorétique des produits des réactions PCR-4 et PCR-5, qui ont servi à la construction des provirus mutants pNL4.3 CDS2 et CDS1.2 respectivement, est présentée à la **figure 9**. Ces deux produits d'amplification correspondent au fragment d'ADN attendu de 437 pb. En effet, ces deux

**Figure 7 : Mutagenèse dirigée par PCR des provirus mutants isogènes pNL4.3 CDS1, CDS2 et CDS1.2.**

La construction du provirus mutant pNL4.3 CDS1 a nécessité trois réactions (PCR : PCR-1, PCR-2 et PCR-3) qui ont généré les fragments attendus de 351 pb, 242 pb et 558 pb. Le fragment de 558 pb a été obtenu en utilisant les produits purifiés de PCR-1 et PCR-2 comme matrices et les amorces A<sub>1</sub> (qui couvre le site BamHI) et A<sub>3</sub> (qui couvre le site Asp). La construction des mutants pNL4.3 CDS2 (PCR-4) et pNL4.3 CDS1.2 (PCR-5) n'a nécessité qu'une seule réaction de PCR qui a généré le fragment attendu de 437 pb. Les mutations de la construction CDS1 (×), entraînant l'élimination du premier codon d'initiation (ATG<sub>1</sub>), ont été initialement introduites dans l'amorce (A<sub>2</sub>). Par contre, les mutations de la construction CDS2 (\*), entraînant l'élimination du second codon d'initiation (ATG<sub>2</sub>) ont été initialement introduites dans l'amorce A<sub>4</sub>. La construction CDS1.2 est une construction qui présente les modifications décrites dans CDS1 et dans CDS2. Pour construire ce plasmide, nous avons utilisé les amorces A<sub>1</sub> et A<sub>4</sub> et le provirus mutant pNL4.3 CDS1 comme matrice. Les amorces A<sub>1</sub> et A<sub>3</sub> ne comportant aucune mutation sont parfaitement complémentaires de la matrice utilisée (pNL 4.3 pour CDS1 et CDS2, et pNL4.3 CDS1 pour CDS1.2). La digestion par BamHI et XhoI des fragments d'ADN issus des réactions PCR-3, PCR-4 et PCR-5 produit des inserts mutants homologues (IM) de 426 pb chacun, qui permettront de générer les différents provirus mutants une fois clonés au niveau de ces mêmes sites de restriction dans le provirus sauvage pNL4.3, en remplacement de l'insert original (IO). La numérotation utilisée ici est celle de pNL4.3.



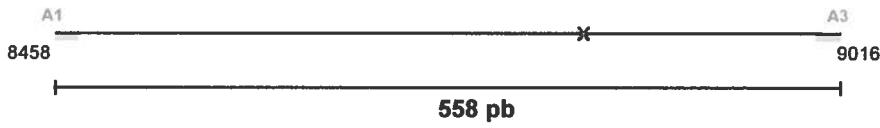
**Insert original de 426 pb (IO)**



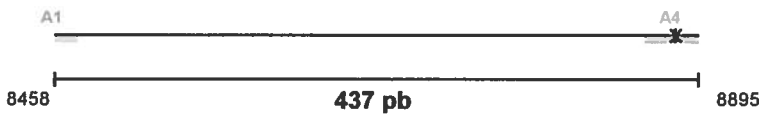
**PCR - 1**



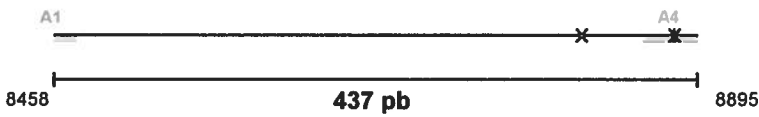
**PCR - 2**



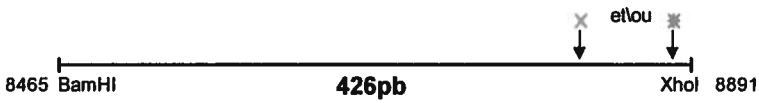
**PCR - 3 / CDS 1**



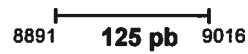
**PCR - 4 / CDS 2**



**PCR - 5 / CDS 1.2**



**Insert mutant de 426 pb  
cloné (IM)**

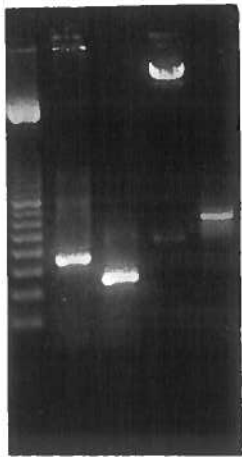




**Figure 8: Analyse du produit des réactions PCR-1, PCR-2 et PCR-3 sur un gel d'agarose 1,8%.**

À la fin des réactions d'amplification, des volumes de 10  $\mu$ L de la phase aqueuse des réactions PCR-1 (puits 2), PCR-2 (puits 3) et PCR-3 (puits 5) ont été analysés sur un gel d'agarose 1,8%. Ces produits correspondent respectivement aux fragments d'ADN attendus de 351 pb, 242 pb et 558 pb. Le puits 4 représente le provirus pNL4.3 digéré par BamHI et XhoI qui génère un petit fragment de 426 pb. Le puits 1 contient un marqueur à échelle multiple de 100 pb. Les amplifications ont été effectuées sur 25 cycles de réactions selon la programmation suivante: 94°C / 2 min, 44°C / 2 min et 72°C / 2 min. Cette série de réactions a été précédée d'un cycle de dénaturation à 94°C pendant 3 min et terminée par un cycle d'extension des produits amplifiés à 72°C pendant 3 min.

1 2 3 4 5



351 pb

242 pb

100 pb

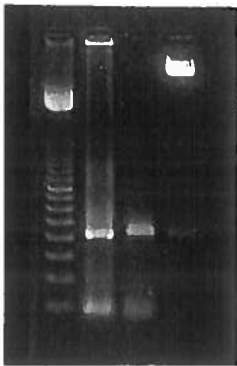
558 pb

426 pb

**Figure 9: Analyse du produit des réactions PCR-4 et PCR-5 sur un gel d'agarose 1,8%.**

La construction des mutants pNL4.3 CDS2 (PCR-4) et pNL4.3 CDS1.2 (PCR-5) aura nécessité une seule étape de PCR. À la fin de la réaction d'amplification, des volumes de 10  $\mu$ l de la phase aqueuse des réactions PCR-4 (puits 2) et PCR-5 (puits 3) ont été analysés sur un gel d'agarose 1,8%. Ces produits correspondent chacun au fragment d'ADN attendu de 437 pb. La taille de ces fragments correspond environ à celle du fragment original libéré après la digestion du provirus sauvage pNL4.3 (VIH-1) par BamHI et XhoI qui est de 426 pb précisément (puits 4). On note la présence de résidus d'amplification d'environ 100 pb dans ces deux réactions. Le puits 1 contient un marqueur à échelle multiple de 100 pb. Les amplifications ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles décrites à la **figure 8**.

1 2 3 4



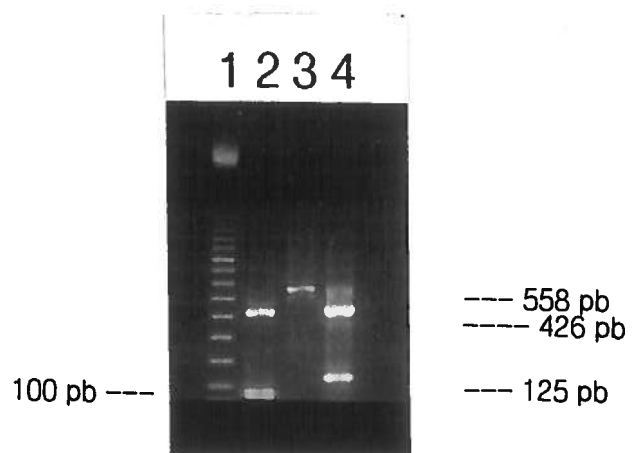
437 pb ---

100 pb ---

--- 426 pb

**Figure 10: Analyse des inserts mutants homologues sur un gel d'agarose 1,8% avant le clonage de ces derniers dans pNL4.3**

Après sa purification, le produit de la réaction PCR-3 (puits 3), qui correspond au fragment d'ADN attendu de 558 pb, a été digéré par BamHI et XhoI (puits 4) générant deux fragments d'ADN dont l'insert attendu de 426 pb qui porte les mutations ciblées dans la construction CDS2 et un petit fragment de 125 pb (on note que la digestion est partielle). La taille de cet insert mutant de 426 pb correspond à celle de l'insert mutant qui porte les mutations ciblées dans CDS2, issu du produit de la réaction PCR-4 digéré également par BamHI et XhoI figurant dans le puits 2. On note la présence de résidus d'amplification d'environ 100 pb dans la réaction PCR-4 comme dans la réaction PCR-5 (voir **figure 9**). Le puits 1 contient un marqueur à échelle multiple de 100 pb. Les amplifications ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles décrites à la **figure 8**.



réactions ont été effectuées dans les mêmes conditions avec les mêmes amorces, sauf que, dans la réaction PCR-5, c'est le provirus mutant pNL4.3 CDS1 qui a servi de matrice au lieu du provirus sauvage NL4.3.

Ainsi, cette première étape de la mutagenèse dirigée nous a permis de disposer de différents fragments portant les mutations ciblées dans le gène *nef* des provirus isogènes pNL4.3 CDS1, CDS2 et CDS1.2 (**figure 7**). Ces fragments d'ADN, issus respectivement des réactions PCR-3, PCR-4 et PCR-5, ont ensuite été digérés par BamHI et XhoI et les inserts homologues respectifs de 426 pb résultants (**figure 10**) ont été clonés au niveau de ces mêmes sites de restriction dans le provirus sauvage pNL4.3, en remplacement du fragment d'ADN original de même taille moléculaire tel que montré dans le puits 4 des **figures 8 et 9**. Pour ce faire, nous avons effectué une ligation durant la nuit à 16°C entre les inserts qui contiennent les mutations ciblées et le provirus sauvage pNL4.3 digérés par ces mêmes enzymes de restriction suivant un rapport molaire 3:1 favorisant le clonage de l'insert.

Une fois les plasmides mutants reconstitués sous leur forme circulaire, des bactéries compétentes ont été transformées avec les produits de ligation. Des minipréparations de ces plasmides mutants ont été réalisées à partir des différentes colonies bactériennes choisies au hasard sur les géloses. Un criblage par digestion de l'ADN des différentes minipréparations de plasmides avec des endonucléases de restriction aura permis d'identifier différents provirus mutants isogènes présomptifs (résultats non montrés). Cette première étape de criblage était basée sur l'analyse du patron de migration de l'ADN digéré et non digéré des minipréparations de ces plasmides mutants.

La première construction pNL4.3 CDS1 possède un site unique pour *SmaI* introduit initialement dans l'amorce CDS1 lors de la mutagenèse de ce provirus. Les minipréparations de plasmides de cette construction ont été digérées par *SmaI* pour confirmer, par électrophorèse sur un gel d'agarose 1%, la présence de ce site qui se traduit par la linéarisation de l'ADN du plasmide mutant. Les minipréparations de plasmides de la seconde construction pNL4.3 CDS2 ont été digérées par *BglII* pour vérifier la génération d'un fragment d'ADN additionnel dans le patron de migration, puisque nous avons introduit un site de restriction *BglII* additionnel dans l'amorce *A<sub>4</sub>* lors de la mutagenèse de ce provirus. Enfin, dans la troisième et dernière construction pNL4.3 CDS1.2, les minipréparations de plasmides ont été digérées successivement par *SmaI* et *BglII* pour vérifier l'apparition des deux phénotypes précédents.

Par la suite, les mutations introduites dans les différents clones moléculaires présomptifs qui répondaient aux critères qualitatifs de cette étape de criblage ont été doublement confirmées par une caractérisation physique. Celle-ci a consisté en un premier séquençage du gène *nef* effectué directement sur les trois provirus mutants présomptifs (résultats non montrés) et par un second séquençage effectué cette fois-ci sur les progénitures virales correspondantes qui ont été produites (voir plus loin).

Cette première caractérisation physique de la région du gène *nef* par séquençage des différents provirus mutants construits nous a permis de confirmer que les modifications apportées avaient été conservées et que, en dehors de la région modifiée, l'intégrité du génome proviral était demeurée intacte. Cette confirmation était nécessaire avant de passer à l'étape de la production d'une banque virale de chacun des virus mutants isogènes.



## 4.2 Les virus mutants isogènes VIH-1 CDS1, CDS2 et CDS1.2

### 4.2.1 Production d'une banque virale par transfection de cellules CEM avec les provirus isogènes mutants

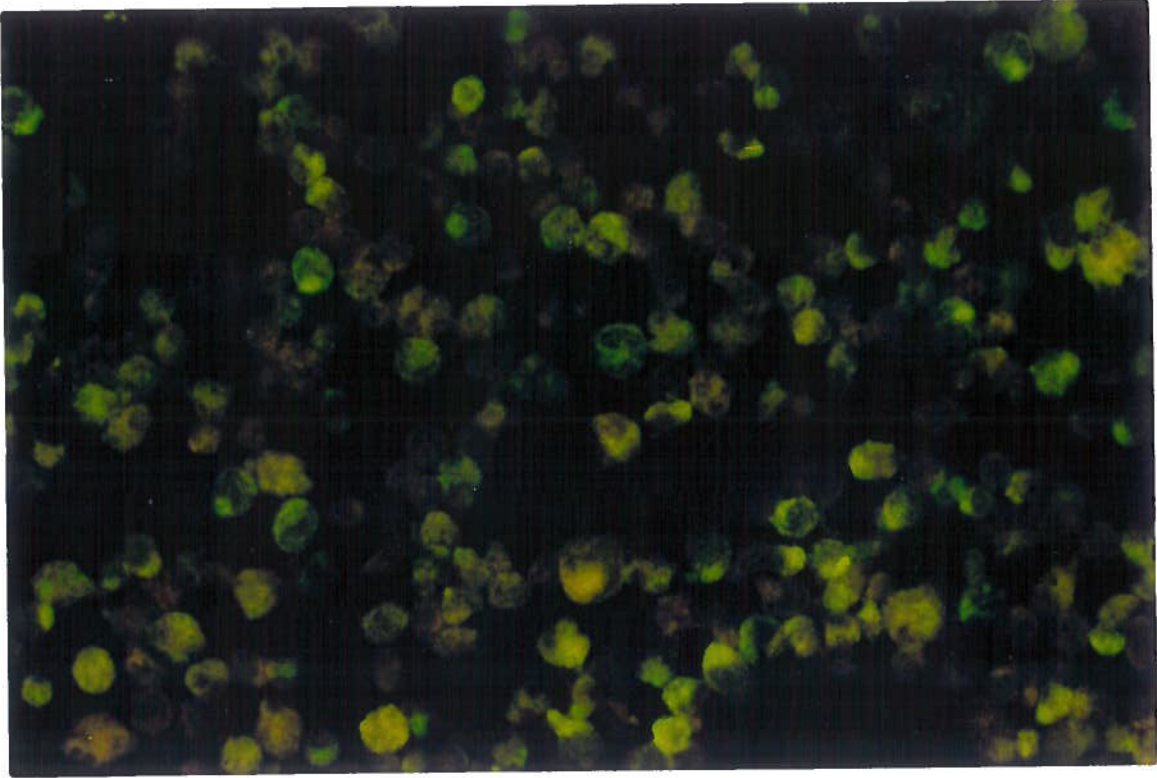
La production des virus mutants isogènes VIH-1 CDS1, CDS2 et CDS1.2 a été réalisée par la transfection de cellules CEM avec les provirus mutants isogènes pNL4.3 CDS1, CDS2 et CDS1.2, respectivement. Les cellules transfectées maintenues en culture ont produit graduellement les différentes progénitures virales durant les 12 à 14 jours qui ont suivi la transfection.

Le taux de mortalité des cellules CEM se situait entre 30 à 45% dans les premières heures qui ont suivi la transfection et était similaire pour l'ensemble des constructions. Cette mortalité est attribuable à la toxicité du DEAE-dextran dont la présence est nécessaire à la transfection. Entre 5 et 6 jours post-transfection, le taux de mortalité a diminué considérablement pour osciller entre 5 et 10%. Dès l'apparition des cpe, le taux de mortalité était proportionnel à celui de la réplication virale. Pour chacune des constructions, la progression de la réplication virale a été évaluée par la détection des antigènes du VIH par immunofluorescence indirecte. Le pic de l'expression des protéines du VIH-1 se situait entre 12 et 14 jours post-transfection dans tous les cas. A ce stade, la majorité des cellules étaient positives pour le VIH-1. La **figure 11A** montre une microphotographie d'une culture cellulaire représentative de cellules transfectées avec les diverses constructions dans un essai par immunofluorescence. On observe que plus de 90% des cellules sont reconnues par un sérum de référence humain positif pour les antigènes du VIH contrairement aux cellules non transfectées qui ne montrent aucune réactivité (**figure 11B**). Cette forte expression des protéines du VIH est associée

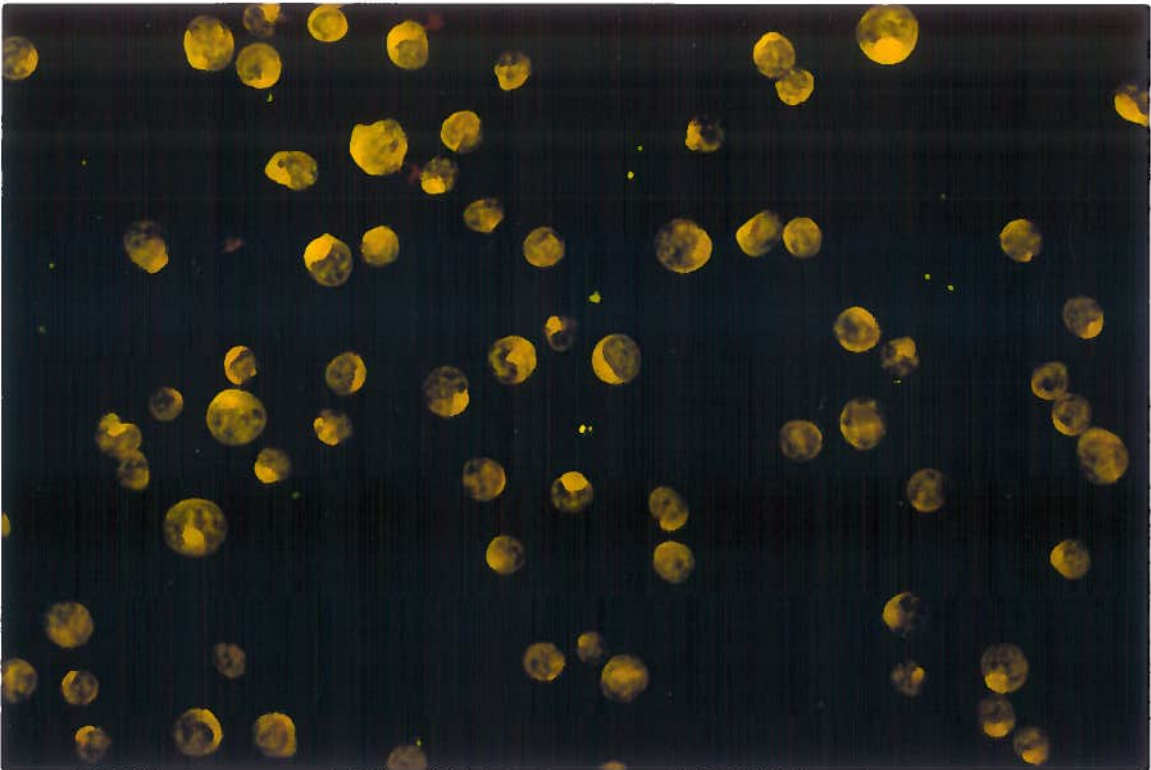
**Figure 11 : Microphotographie de culture de cellules CEM transfectées exprimant les protéines du VIH détectées par immunofluorescence indirecte.**

Des cellules transfectées après 12 jours avec un provirus isogène (pNL4.3 XR) caractéristique des constructions réalisées (A) ou non transfectées (B) ont été fixées à l'acétone et incubées avec un antisérum humain positif pour les antigènes du VIH (dilué 1:100). Les cellules exprimant des protéines immunoréactives ont été révélées à l'aide d'anticorps anti-Ig A, G et M humains préparés chez la chèvre et couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine (dilué 1:100 dans du PBS contenant 1/25 de rhodamine). Les observations ont été faites avec un microscope à fluorescence Leitz avec un facteur d'agrandissement de 1000 X.

**A**



**B**



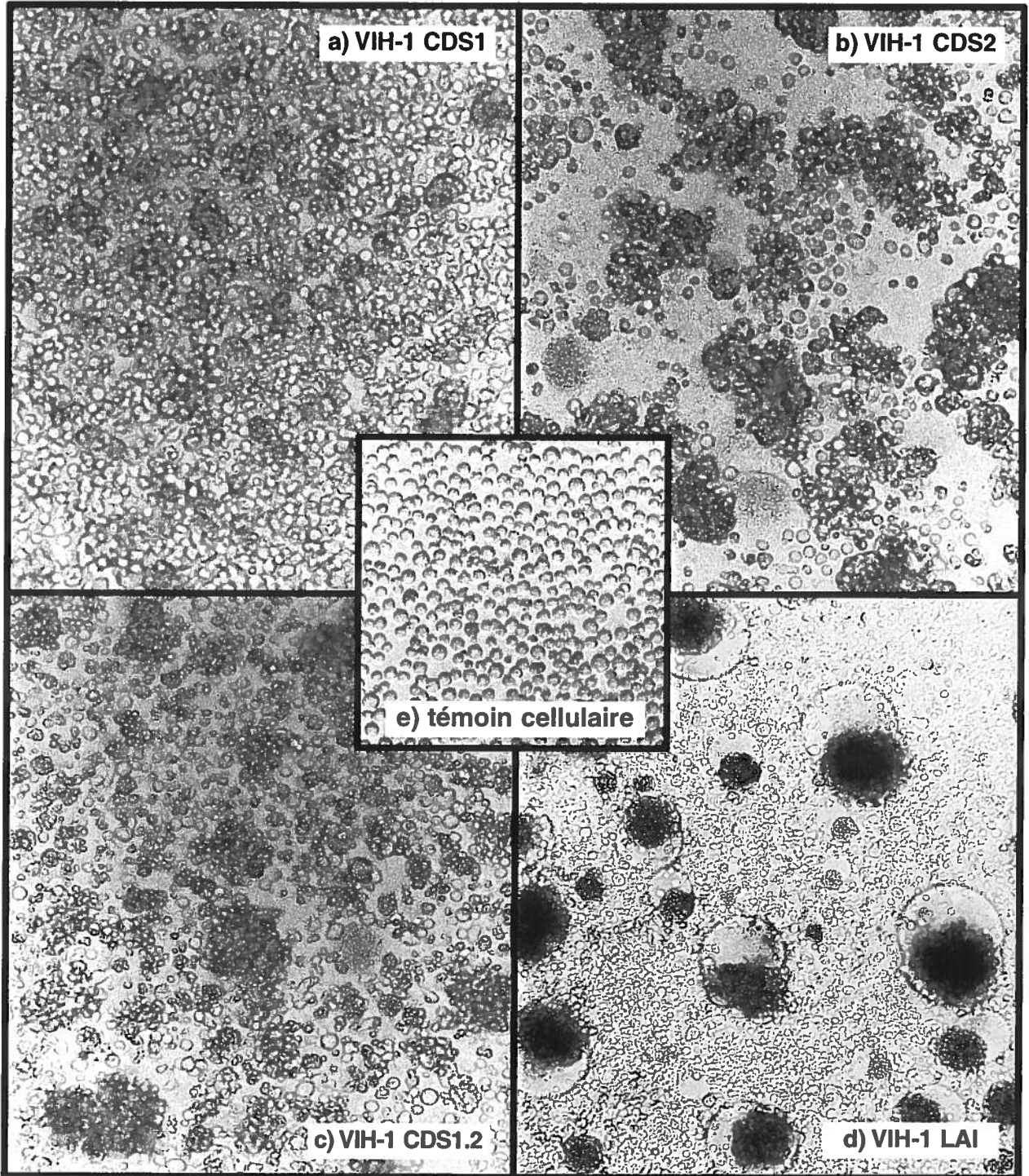
également à une mortalité cellulaire plus élevée et des effets cytopathogènes variables selon le mutant utilisé. Une banque des différents virus a été produite au moment où l'expression virale était à son maximum dans les surnageants des cultures cellulaires transfectées.

L'infection de cellules CEM avec cette première progéniture virale issue de la transfection nous a permis d'observer des différences dans le degré des cpe induits par les trois virus mutants. Les microphotographies présentées dans les **figures 12a, 12b et 12c** illustrent les cpe induits par chacun des virus mutants isogènes VIH-1 CDS1, CDS2 et CDS1.2 sur les cellules CEM 10 jours post-infection. Les cellules ont été infectées avec 100 µL de surnageant infectieux récolté au moment du pic de l'expression des protéines du VIH dans les cellules transfectées avec chacun des provirus.

Dans la microphotographie des cellules CEM infectées par le virus VIH-1 CDS-1 (**figure 12a**), on ne note que des agrégats cellulaires et des fusions primaires. Dans la microphotographie des cellules infectées avec le virus VIH-1 CDS2 (**figure 12b**), on note la formation de gros agrégats cellulaires, de fusions primaires, peu de syncytia et quelques vacuoles. Dans la microphotographie des cellules CEM infectées par le virus VIH-1 CDS1.2 (**figure 12c**), on note surtout la formation d'agrégats cellulaires, quelques fusions primaires et très peu de fusions secondaires. La microphotographie présentée à la **figure 12d** montre des cpe typiques observés dans le cas d'une infection avec le virus sauvage VIH-1 LAI, soit la formation d'agrégats cellulaires, de fusions primaires, de syncytia, de vacuoles et de fusions secondaires, contrairement aux cellules CEM non infectées qui ne montrent aucun cpe (**figure 12e**).

**Figure 12 : Microphotographie de cellules CEM infectées par les virus mutants**

Les cpe du VIH-1 CDS1 (12a), VIH-1 CDS2 (12b), VIH-1 CDS1.2 (12c) ont été observés 10 jours p.i. Quatre millions de cellules CEM dans un flacon en polystyrène de 25 cm<sup>2</sup> contenant 10 mL de milieu RPMI ont été infectées avec 100 µL de surnageant infectieux récolté au moment correspondant au pic de l'expression des protéines du VIH dans les cellules transfectées avec les provirus correspondants. Les cpe du VIH-1 CDS1 sont marqués par des agrégats cellulaires et des fusions primaires. Les cpe du VIH-1 CDS2 observés sont marqués par la formation d'agrégats cellulaires, de quelques fusions primaires, très peu de fusions secondaires et quelques vacuoles. Tandis que les cpe du VIH-1 CDS1.2 montrent la formation d'agrégats cellulaires, de fusions primaires et de quelques fusions secondaires. Les cpe caractéristiques de la souche sauvage VIH-1 LAI sur les cellules CEM (observés 4 jours p.i (MOI de 0,1 DICT<sub>50</sub>/cellule) sont marqués par la formation de syncytia, de fusions secondaires et de très grosses vacuoles. La microphotographie 12e présente des cellules CEM non infectées. Les cultures ont été observées à l'aide d'un microscope inversé (Leitz-Diavert). Le facteur d'agrandissement est d'environ 400 X.



#### 4.2.2 Caractérisation physique du génotype des virus mutants isogènes par séquençage

Le séquençage du gène *nef* effectué sur les provirus mutants ayant confirmé la présence des modifications introduites, une deuxième caractérisation physique du gène *nef* a été effectuée directement sur les progénitures virales issues des transfections. L'ARN génomique a été extrait des différents virus mutants, purifié et amplifié par RT-PCR. Le séquençage a été effectué directement sur les produits d'amplification. Ce second séquençage, identique à celui effectué sur le DNA proviral, a été réalisé dans le but de s'assurer que les mutations initialement introduites dans le provirus sauvage avaient été conservées dans les progénitures virales. Cette étape était un pré-requis à la caractérisation phénotypique des différents virus mutants.

Tel que montré dans la **figure 13**, les différents produits RT-PCR issus des virus isogènes VIH-1 CDS1, CDS2 et CDS1.2 ainsi que des virus VIH-1 LAI et NL4.3 (qui ont servi de témoins) correspondent au fragment d'ADN attendu de 719 pb. Ces produits ont été obtenus en utilisant les amorces  $A_5$  et  $A_6$  (**tableau I**) situées en amont et en aval du gène *nef*, respectivement.

L'élimination du premier codon d'initiation dans le gène *nef*, caractéristique de la construction VIH-1 CDS1, a été confirmée dans le profil de séquençage partiel du brin antisens du fragment d'ADN provenant de l'amplification du gène *nef* obtenu à partir de l'ARN génomique du VIH-1 CDS1 (**figure 14a**). On note ici la présence du site SmaI cccggg, (nucléotides 206-211), unique dans le génome de ce mutant, couplé à un codon de terminaison prématuré cta (nucléotides 199-201) introduit lors de la mutagenèse dirigée par PCR.

Les modifications caractéristiques de la construction VIH-1 CDS2, ont été aussi confirmées dans le profil de séquençage partiel du brin antisens du fragment d'ADN provenant de l'amplification du gène *nef* à partir de l'ARN génomique du VIH-1 CDS2 présenté dans la **figure 14b**. On note l'élimination du second codon d'initiation avec l'apparition du site XbaI ou BglII agatct (nucléotides 151-156) couplé à un codon de terminaison prématuré tca (nucléotides 145-147).

Enfin, la confirmation de la combinaison des modifications introduites dans les virus mutants VIH-1 CDS1 et VIH-1 CDS2 dans la séquence du gène *nef* du mutant VIH-1 CDS1.2 est illustrée dans le profil de séquençage partiel (**figure 14c**) du brin antisens du fragment d'ADN provenant de l'amplification du gène *nef* à partir de l'ARN génomique de ce mutant. On voit, en effet, l'élimination du premier et du second codon d'initiation faisant apparaître à leur place, respectivement, le site SmaI cccggg unique (nucléotides 206-211) couplé à un codon de terminaison prématuré cta (nucléotides 199-201) et le site XbaI ou BglII agatct (nucléotides 151-156) couplé à un codon de terminaison prématuré tca (nucléotides 145-147).

#### **4.2.3 Caractérisation biologique des virus mutants isogènes**

##### **4.2.3.1 Potentiel d'expression des différentes formes de la protéine Nef des virus mutants isogènes**

Les différentes mutations introduites dans le gène *nef* ont été conçues dans le but de générer deux virus (VIH-1 CDS1 et VIH-1 CDS2) qui auront le potentiel d'exprimer une seule portion de la protéine Nef. Chacune de ces deux portions de la protéine est



**Figure 13 : Analyse du produit de l'amplification du gène *nef* des différents virus isogènes obtenu par RT-PCR.**

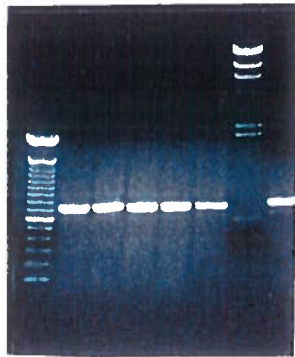
L'amplification du gène *nef* par RT-PCR à partir de l'ARN génomique viral purifié génère un fragment attendu de 719 pb en utilisant les amorces A<sub>5</sub> et A<sub>6</sub>. La taille attendue de ce fragment est confirmée dans l'analyse du profil électrophorétique sur ce gel d'agarose 1,8% des produits RT-PCR de l'ensemble des virus mutants isogènes construits, soient les virus VIH-1 CDS1, CDS2 et CDS1.2 (puits 2, 3 et 4). Il en est de même pour les virus VIH-1 NL4.3, XR (un autre virus isogène) et LAI analysés comme témoin dans les puits 2, 6 et 8. Le puits 1 contient un marqueur à échelle multiple de 100 pb. Le puits 7 contient l'ADN du phage  $\lambda$  digéré par HindIII.

Les réactions RT-PCR ont été effectuées selon la programmation suivante : une réaction avec la transcriptase inverse à 45°C pendant 30 min; un cycle de dénaturation à 94°C pendant 3 min; une première étape de PCR sur 10 cycles de réactions selon le programme suivant: 94°C pendant 2 min, 42°C pendant 30 sec et 68°C pendant 2 min; et d'une seconde étape de PCR sur 25 cycles avec le même programme, auquel une réaction d'extension de 2 sec par cycle a été ajoutée. Pour terminer, la réaction a été complétée par un cycle d'extension des produits amplifiés à 68°C pendant 5 min.

1 2 3 4 5 6 7 8

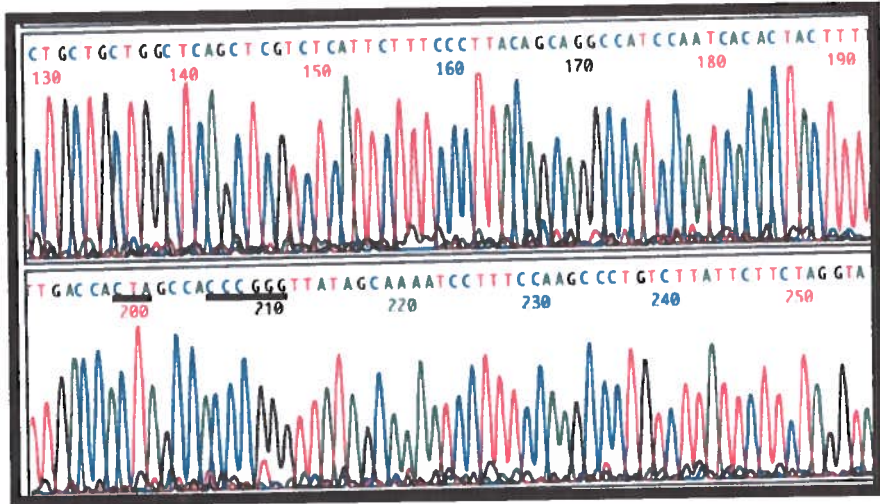
719 pb ---

100 pb ---

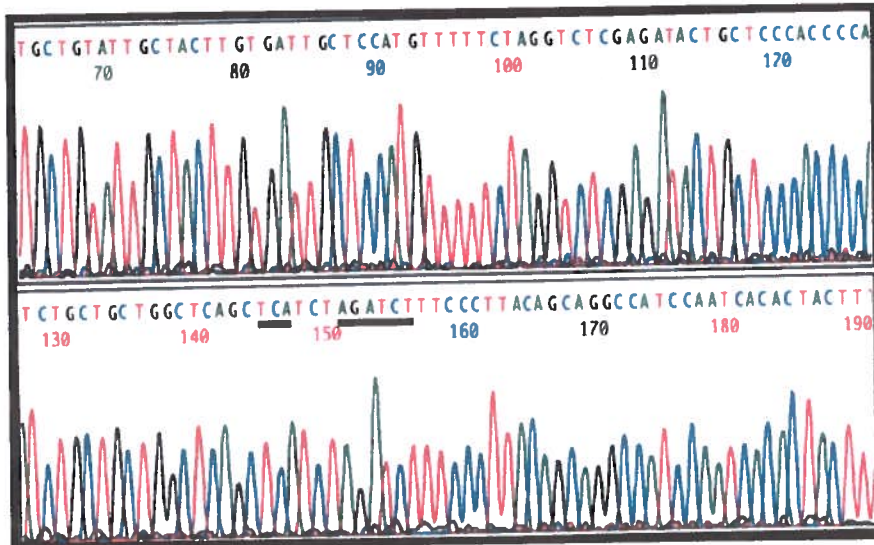




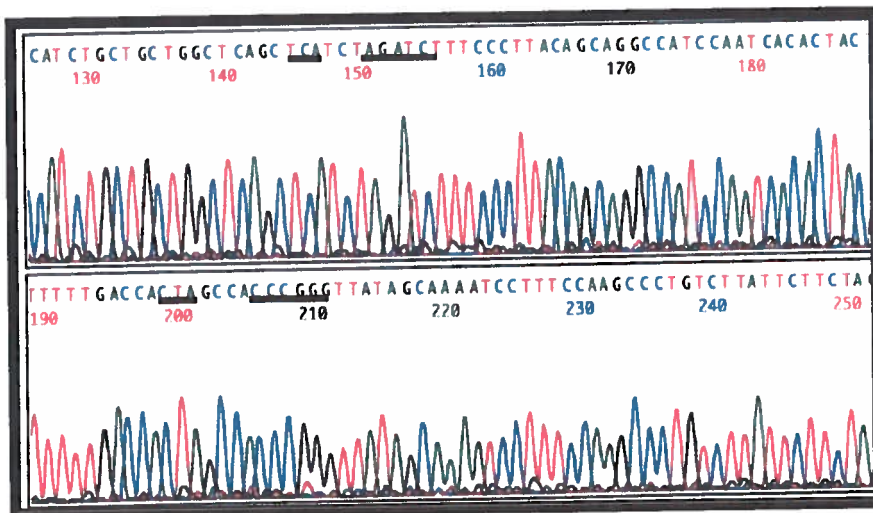
CDS1



CDS2



CDS1.2



distincte mais complémentaire. Quant au troisième virus (VIH-1 CDS1.2), il n'aurait pas le potentiel d'exprimer cette protéine.

La **figure 15** illustre la séquence en acides aminés attendue lors de l'expression du gène *nef* des différents virus mutants isogènes construits. La protéine Nef exprimée par le virus mutant VIH-1 CDS1 serait une protéine tronquée, formée par les résidus 20-206, en raison de l'élimination des 19 premiers acides aminés au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine. Elle est donc traduite à partir du second codon d'initiation puisque le premier codon d'initiation a été éliminé (**figure 14a**). Ce virus a donc le potentiel d'exprimer uniquement une longue portion C-terminale non myristilée de 187 acides aminés de la protéine. Quant à la protéine Nef exprimée par le virus mutant VIH-1 CDS2, traduite à partir du premier codon d'initiation, elle serait myristilée, mais tronquée également en raison de l'introduction d'un codon de terminaison prématuré en plus de l'élimination du second codon d'initiation (**figure 14b**). Ce virus mutant se retrouve avec le potentiel de produire uniquement une courte portion N-terminale de la protéine constituée par les 19 premiers acides aminés. Enfin, le virus mutant VIH-1 CDS1.2, n'exprimerait pas la protéine Nef car les deux premiers codons d'initiation du gène *nef* ont été supprimés (**figure 14c**). Ce virus double mutant a donc la propriété d'être potentiellement négatif pour la protéine Nef.

#### **4.2.3.2 Analyse phénotypique des virus mutants isogènes de la protéine Nef**

Afin de déterminer si la protéine Nef est impliquée dans la pathogenèse associée à l'infection par le VIH, nous avons utilisé l'approche expérimentale *in vitro* suivante : a)

**Figure 15 : Séquence de la protéine Nef potentiellement exprimée par les virus mutants isogènes.**

Chacun des virus VIH-1 CDS1 et VIH-1 CDS2 a le potentiel d'exprimer un segment de la séquence de 206 acides aminés de la protéine Nef exprimée dans sa totalité par le virus sauvage VIH-1 NL4.3 (ou VIH-1 LAI). La séquence en acides aminés attendue de la protéine Nef des virus mutants isogènes serait formée par les résidus 20-206 formant la longue portion C-terminale de la protéine Nef chez le virus VIH-1 CDS1, et par les résidus 1-19 formant le court segment N-terminale de la protéine Nef chez le virus VIH-1 CDS2. Le troisième virus mutant, le VIH-1 CDS1.2, serait potentiellement négatif pour la protéine Nef.

## Nef VIH-1

**1** NL4.3 MGGKWSKSSVIGWPAVRERMRAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITSSNTAA  
 CDS1 .....(aa20)MRAEPAADGVGAVSRDLEKHGAITSSNTAA  
 CDS2 MGGKWSKSSVIGWPAVRER x R.....  
 CDS1.2 .....

**51** NL4.3 NNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGL  
 CDS1 NNAACAWLEAQEEEEVGFPVTPQVPLRPMTYKAAVDLSHFLKEKGGLEGL  
 CDS2 .....  
 CDS1.2 .....

**101** NL4.3 IHSQRRQDILDLWIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWICYKLVPEPD  
 CDS1 IHSQRRQDILDLWIYHTQGYFPDWQNYTPGPGVRYPLTFGWICYKLVPEPD  
 CDS2 .....  
 CDS1.2 .....

**151** NL4.3 KVEEANKGENTSLHHPVSLHGMDDPEREVLEWRFDLSRLAFHHVARELHP  
 CDS1 KVEEANKGENTSLHHPVSLHGMDDPEREVLEWRFDLSRLAFHHVARELHP  
 CDS2 .....  
 CDS1.2 .....

**201** NL4.3 EYFKNC  
 CDS1 EYFKNC  
 CDS2 .....  
 CDS1.2 .....

l'évaluation des cpe produits par chacun des virus mutants de la protéine Nef dans les cellules CEM; b) la détermination de la cinétique de réplication virale, qui se traduit par la quantité de virus infectieux produite dans le surnageant des cultures cellulaires 7 jours post-infection (titre viral exprimé en  $DICT_{50}/mL$ ). Il est à noter qu'il n'y a pas de corrélation directe entre la virulence d'une souche virale, inductrice de syncytia (SI) ou non-inductrice de syncytia (NSI) et la vitesse de réplication du virus.

Cette étude nécessitait deux préalables : a) que le MOI utilisé pour infecter les cellules CEM soit le même pour chaque mutant; b) que la progéniture virale issue de ces infections soit utilisée directement pour évaluer la cytopathogénicité et le rendement en virus infectieux, dans des essais où un volume identique pour chacun des mutants est utilisé.

Après avoir produit une banque virale et déterminé le titre infectieux pour chacun des virus mutants de Nef, les cellules CEM ont été infectées en quadruplicat avec chacun des virus mutants ainsi qu'avec le virus sauvage VIH-1 NL4.3, dans les mêmes conditions et en utilisant le même MOI (0,1  $DICT_{50}/cellule$ ). Sept jours post-infection, les cultures ont été récoltées, centrifugées et les surnageants clarifiés utilisés. Les cpe ont été notés quotidiennement durant 7 jours. Les **tableaux II-A à II-D** montrent que les cpe, représentés par des agrégats, des fusions cellulaires primaires et secondaires et des syncytia accompagnés ou non de vacuoles, sont quantitativement et qualitativement différents selon le mutant isogène VIH-1 CDS1, CDS2, CDS1.2 ou le virus sauvage NL4.3 utilisé. Ces différences sont observables à toutes les dilutions. À la dilution  $10^{-1}$ , les cellules infectées soit par le virus mutant CDS1 (qui exprimerait potentiellement la longue portion C-terminale de la protéine Nef) ou le virus sauvage NL4.3, montrent des



cpe maximums 4 jours post-infection (**tableaux II-A et II-D**), alors que, dans les mêmes conditions, les cpe induits par les virus mutants CDS2 (qui exprime uniquement les 19 premiers acides aminés de la portion N-terminale) et CDS1.2 (négatif pour la protéine Nef) sont minimums. À la dilution limite ( $10^{-5}$ ), ces deux mutants se montrent incapables d'induire des cpe significatifs, même 7 jours post-infection (**tableaux II-B et II-C**). Ces deux virus se comportent comme des souches non-inductrices de syncytia.

Les virus mutants s'étant montrés différents dans leur cytopathogénicité, nous avons procédé à une évaluation quantitative de leurs progénitures dans les surnageants des cultures infectées. Ainsi, afin d'apprécier le potentiel infectieux et la vitesse de réplication des progénitures virales de chacun des mutants isogènes,  $1,6 \times 10^6$  cellules CEM ont été infectées avec la même quantité de virus ( $100 \text{ DICT}_{50}$ ) et les titres viraux ont été déterminés 7 jours post-infection. Les résultats sont présentés dans le **tableau III**. On observe que le phénotype du virus mutant VIH-1 CDS1 est sensiblement le même que celui du virus sauvage VIH-1 NL4.3 pour ce qui a trait à la vitesse de réplication, qui se traduit ici par le nombre d'unités infectieuses produites sept jours post-infection. En effet, le mutant CDS1 (ayant le potentiel d'exprimer toute la portion C-terminale de Nef, à l'exclusion des 19 premiers acides aminés) présente un titre de  $10^{6,35} \text{ DICT}_{50}/\text{mL}$ , semblable à celui du virus sauvage NL4.3 qui est de  $10^{6,1} \text{ DICT}_{50}/\text{mL}$ . Quant aux virus mutants VIH-1 CDS2 (ayant le potentiel d'exprimer uniquement les 19 premiers acides aminés de la protéine Nef) et VIH-1 CDS1.2 (aucune expression de Nef), ils présentent des phénotypes semblables avec des titres identiques de  $10^{5,1} \text{ DICT}_{50}/\text{mL}$ . La différence entre les titres plus faibles observés chez les mutants CDS2 et CDS1.2 et ceux observés

**Tableau II: Analyse phénotypique des virus mutants isogènes VIH-1 CDS1, VIH-1 CDS2, VIH-1 CDS1.2 et du virus sauvage VIH-1 NL4.3.**

Cent  $\mu\text{L}$  de dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) de surnageants clarifiés de cellules infectées par les virus VIH-1 CDS1, VIH-1 CDS2, VIH-1 CDS1.2, et VIH-1 NL4.3 ont été incubés avec  $1,6 \times 10^6$  cellules CEM durant un temps de contact d'une heure à  $37^\circ\text{C}$ . Quatre mL de RPMI complet ont été ensuite ajoutés dans chacun des tubes et chaque échantillon a été réparti dans quatre puits distincts à raison de  $4 \times 10^5$  cellules par puits. Les cultures ont été incubées à  $37^\circ\text{C}$  sous atmosphère humide avec 5% de  $\text{CO}_2$  durant sept jours. Après quatre jours, 1 mL de milieu complet a été ajouté dans chaque puits. Les cultures cellulaires ont été observées quotidiennement à l'aide d'un microscope inversé Leitz-Diavert et les cpe ont été notés selon la convention :

- : aucun cpe
- + : agrégats
- ++ : fusions primaires
- +++ : syncytia et vacuoles
- ++++ : fusions secondaires, cpe maximal

**II-A : VIH-1 CDS1**

Jours p.i	dilutions					
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1	-	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-
3	+++	++	+	+	-	-
4	++++	++	+	+	-	-
5	++++	+++	++	+	+	-
6	++++	++++	+++	++	++	-
7	++++	++++	+++	+++	++	-

**II-B : VIH-1 CDS2**

Jours p.i	dilutions					
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	++	+	+	-	-	-
4	++	+	+	-	-	-
5	+++	++	+	+	-	-
6	+++	+++	++	++	+	-
7	++++	++++	+++	++	+	-

**II-C : VIH-1 CDS1.2**

Jours p.i	dilutions					
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1	-	-	-	-	-	-
2	+	-	+	-	-	-
3	++	+	+	-	-	-
4	++	+	+	-	-	-
5	++++	+++	++	+	-	-
6	++++	+++	++	+	+	-
7	++++	+++	++	+	+	-

**II-D : VIH-1 NL4.3**

Jours p.i	dilutions					
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
1	-	-	-	-	-	-
2	++	+	+	-	-	-
3	+++	+++	++	+	-	-
4	++++	+++	++	+	-	-
5	++++	++++	+++	++	+	-
6	++++	++++	++++	++	++	-
7	++++	++++	++++	+++	+++	-

**Tableau III : Détermination des titres des virus mutants VIH-1 CDS1, VIH-1 CDS2, VIH-1 CDS1.2 et du virus sauvage VIH-1 NL4.3 7 jours post-infection.**

	NL4.3	CDS1	CDS2	CDS1.2
<b>Titre viral (DICT<sub>50</sub>/mL)</b>	10 <sup>6,1</sup>	10 <sup>6,35</sup>	10 <sup>5,1</sup>	10 <sup>5,1</sup>

1,6 M de cellules CEM ont été infectées avec 100 DICT<sub>50</sub> des divers virus dans les mêmes conditions.. Après 7 jours, 100 µL des surnageants respectifs ont été récoltés et dilués suivant un facteur décimal de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup> avec du milieu RPMI complet. Un culot de 1,6 x 10<sup>6</sup> cellules CEM a été mis en contact avec 100 µL de chaque dilution virale pendant 1 heure à 37°C. Les cellules infectées ont été ensuite réparties dans 4 puits distincts à raison de 4 x 10<sup>5</sup> cellules par puits dans un volume final de 1 mL. Les plateaux ont été incubés à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après 4 jours, 1 mL de milieu complet a été ajouté dans chaque puits. Les cpe ont été notés quotidiennement et les titres viraux ont été calculés selon la formule de Kärber, sept jours post-infection.

chez le virus sauvage NL4.3 et le virus mutant CDS1 (titres plus élevés) sont significatives puisqu'il s'agit d'un écart de dix à vingt fois.

Afin de vérifier le potentiel fusogénique de la protéine Nef observé avec les immunosomes-Nef (Nef associée à des liposomes) (Thibodeau, non publié), qui serait potentiellement dirigée par les 19 premiers acides aminés (Curtain *et al.*, 1994), une étude comparative de l'incidence de syncytia associés à des vacuoles a été effectuée. Les cellules CEM ont été infectées dans les mêmes conditions avec chacun des virus mutants isogènes ainsi qu'avec la souche sauvage à titre de référence.

Le suivi a été effectué en faisant quotidiennement une évaluation visuelle du nombre et de la taille des syncytia associés à des vacuoles, sur une période de sept jours. Comme le montre le **tableau IV**, aucune ou très peu de vacuoles ont été observées dans les cultures cellulaires infectées par les virus mutants CDS1 et CDS1.2. Au contraire, les cellules infectées par le virus mutant CDS2 présentent de nombreuses vacuoles semblables à celles observées avec les virus sauvages VIH-1 NL4.3 et LAI. Ces différences phénotypiques ont également été observées dans les cellules CEM infectées avec les surnageants infectieux issus des expériences de transfection (**figure 12**) lors des amplifications virales pour la constitution des différentes banques de virus.

#### **4.3 Production et purification de la protéine Nef recombinante**

Pour investiguer plus à fond le rôle de la protéine Nef dans la pathogenèse, il nous fallait disposer d'une protéine Nef purifiée. Le baculovirus recombinant de la protéine

**Tableau IV: Fréquence relative de la formation de syncytia associés à des vacuoles dans les cellules CEM 7 jours post-infection avec les virus mutants isogènes et sauvages.**

<b>virus</b>	<b>LAI</b>	<b>NL4.3</b>	<b>CDS1</b>	<b>CDS2</b>	<b>CDS1.2</b>
<b>Fréquence relative des vacuoles</b>	20	10-20	0-1	10-20	0-1

Des cellules CEM ont été infectées avec les divers virus dans les mêmes conditions en utilisant le même indice de multiplicité (MOI de 0.1  $DICT_{50}$ /cellule). L'importance relative de la formation des vacuoles a été évaluée quantitativement sur la base du nombre de vacuoles observé par champ microscopique à un grossissement de 400 X avec un microscope inversé Leitz-Diavert selon l'échelle suivante :

Nef avait déjà été construit dans le laboratoire du Dr Thibodeau par le Dr Claude Lavallée; nous l'avons donc utilisé pour produire Nef.

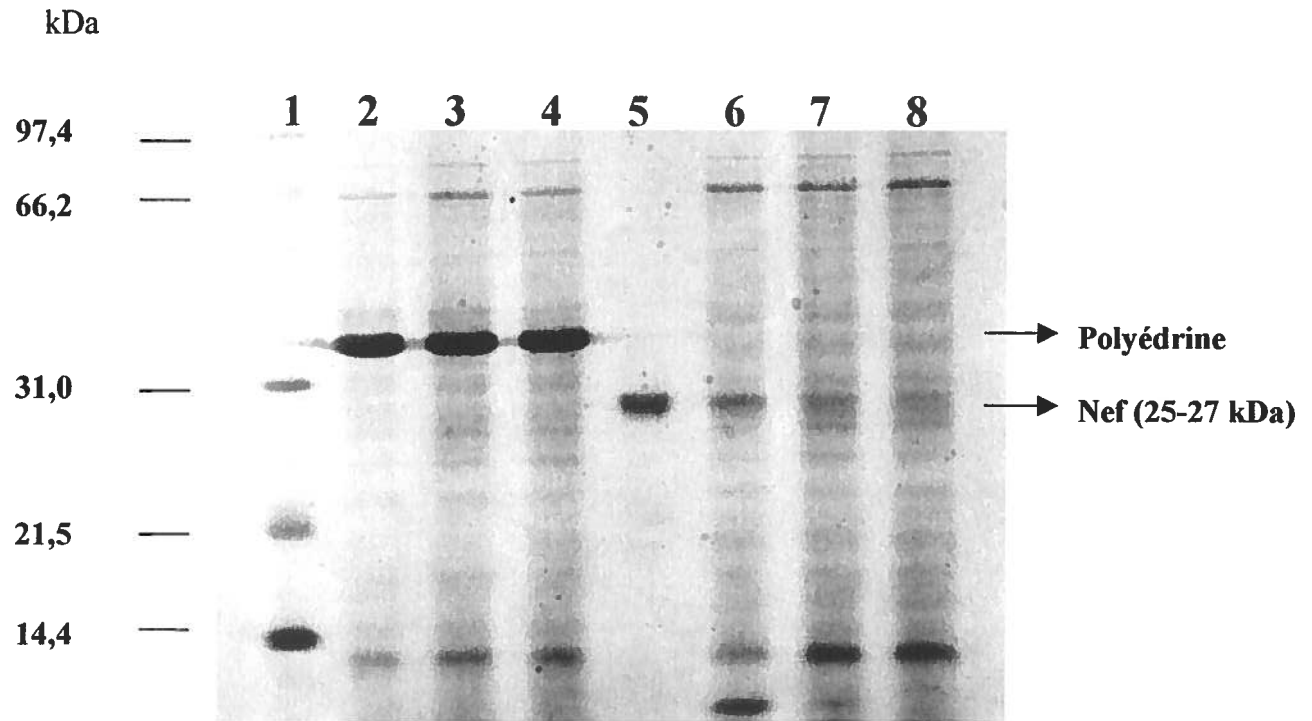
Des cellules d'insecte High-Five ont été infectées avec le virus recombinant dont le gène *nef* du VIH-1 LAI avait été substitué au gène de la polyédrine du baculovirus. Quatre jours post-infection, les cultures ont été clarifiées par centrifugation et les surnageants infectieux ont été conservés pour servir d'inoculum viral pour d'autres infections. Les cellules infectées avec le baculovirus recombinant ont été lysées dans le tampon de Laemmli quatre jours post-infection et analysées sur un gel de polyacrylamide à 14%. La protéine Nef présente dans les lysats cellulaires (100 000 cellules) issus de trois productions distinctes correspond à la bande de 25-27 kDa observée dans les puits 6, 7 et 8 de la **figure 16**. Cette bande est absente des lysats de cellules infectées avec le virus sauvage de la polyédrine nucléaire de *Autographa californica* (AcNPV) utilisé comme témoin. Dans ce cas, on observe une imposante bande de 35 kDa qui correspond à la polyédrine (puits 2, 3 et 4). Cette protéine n'est pas produite dans les cellules infectées avec le baculovirus recombinant car le gène *nef* du VIH-1 LAI a été cloné dans le gène de la polyédrine. L'expression précoce (24 heures p.i.) de la polyédrine, qui est facilement observable au microscope inversé dans les noyaux des cellules infectées, permettait d'apprécier l'évolution de l'infection dans les cellules infectées avec le virus recombinant de Nef et indiquait le moment opportun de la récolte, puisque ce dernier n'induit aucun cpe.

Les cellules infectées avec le baculovirus recombinant exprimant Nef ont été récoltées quatre jours post-infection puis centrifugées. Les culots cellulaires ont été

**Figure 16: Analyse de la protéine Nef recombinante sur gel de polyacrylamide 14%**

Un milliard de cellules d'insecte High-Five ont été infectées à un MOI de 1 DICT<sub>50</sub>/cellule avec le baculovirus recombinant de la protéine Nef. Les puits 6, 7 et 8 montrent des lysats cellulaires de 100 000 cellules issus de trois productions distinctes de Nef avec le baculovirus recombinant. La protéine Nef correspond à la bande d'environ 25-27 kDa. Les culots cellulaires recueillis après centrifugation ont été soumis à une sonication afin d'extraire la protéine Nef qui se retrouve ancrée dans la membrane cellulaire. La protéine fut ensuite purifiée par chromatographie sur une colonne héparine-sépharose. Les fractions qui contenaient la protéine Nef pure à plus de 80% des protéines totales ont été regroupées, puis dialysées et lyophilisées. Le puits 5 montre la protéine Nef purifiée (10 µg). Les puits 2, 3 et 4 montrent les lysats cellulaires de 100 000 cellules issus trois infections distinctes avec le baculovirus sauvage AcNPV qui servait de témoin. La polyédrine exprimée uniquement dans les cellules infectées avec ce virus est représentée par la bande de masse moléculaire d'environ 35 kDa. Le puits 1 correspond aux marqueurs de référence de faible masse moléculaire: phosphorylase b, 97,4 kDa; albumine de sérum bovin, 66,2 kDa; anhydrase carbonique, 31,0 kDa; inhibiteur de trypsine de fève de soya, 21,5 kDa; et lysosyme, 14,4 kDa. L'électrophorèse a été effectuée sur un gel de polyacrylamide 14% en milieu réducteur ( $\beta$ -mercaptoéthanol) et dénaturant (SDS). Le gel a été coloré au bleu de Coomassie.





soumis à une sonication afin d'extraire la protéine Nef qui se trouve ancrée dans les membranes cellulaires.

La protéine a été ensuite purifiée par chromatographie sur une colonne d'héparine-sépharose équilibrée avec du tampon phosphate 10 mM, 50 mM NaCl (pH 7,5) puis lavée avec le même tampon. Les fractions qui contenaient la protéine Nef pure à plus de 80% des protéines totales ont été regroupées, dialysées dans du PBS dilué au cinquantième et lyophilisées. Le puits 5 montre 10 µg de la protéine Nef purifiée reconstituée dans de l'eau pure après la lyophilisation. On voit que la protéine Nef est pure à 80 à 90%. Le rendement moyen des productions était de 3,5 µg de protéine pour 100 000 cellules (puits 6); un milliard de cellules furent utilisées dans chacune de ces productions.

#### **4.4 Essais sur le rôle de la protéine Nef dans la cytopathogénicité et dans l'infectivité du virus VIH-1 LAI**

##### **4.4.1 Rôle de la protéine Nef recombinante dans la cytopathogénicité du VIH-1 LAI dans les cellules CEM**

Afin de déterminer si la protéine Nef joue un rôle dans la cytopathogénicité du VIH-1 LAI, nous avons infecté des cellules CEM, préalablement mises en contact ou non pendant une heure avec 100 ou 500 ng de la protéine Nef recombinante, avec le VIH-1 LAI à un MOI de 0,1 DICT<sub>50</sub>/cellule. Le rendement en virus infectieux a été déterminé dans des essais où des volumes identiques de 100 µL ont été titrés par la méthode de Kärber (dilutions de 10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup>). Les cpe ont été notés quotidiennement durant 7 jours. Le **tableau V** montre que les cpe sont quantitativement et qualitativement différents selon que les cellules CEM ont été mises en contact ou non avec la protéine Nef recombinante

avant l'infection. En effet, la comparaison des cpe aux dilutions virales  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$  montre clairement que la protéine Nef est impliquée dans la cytopathogénicité.

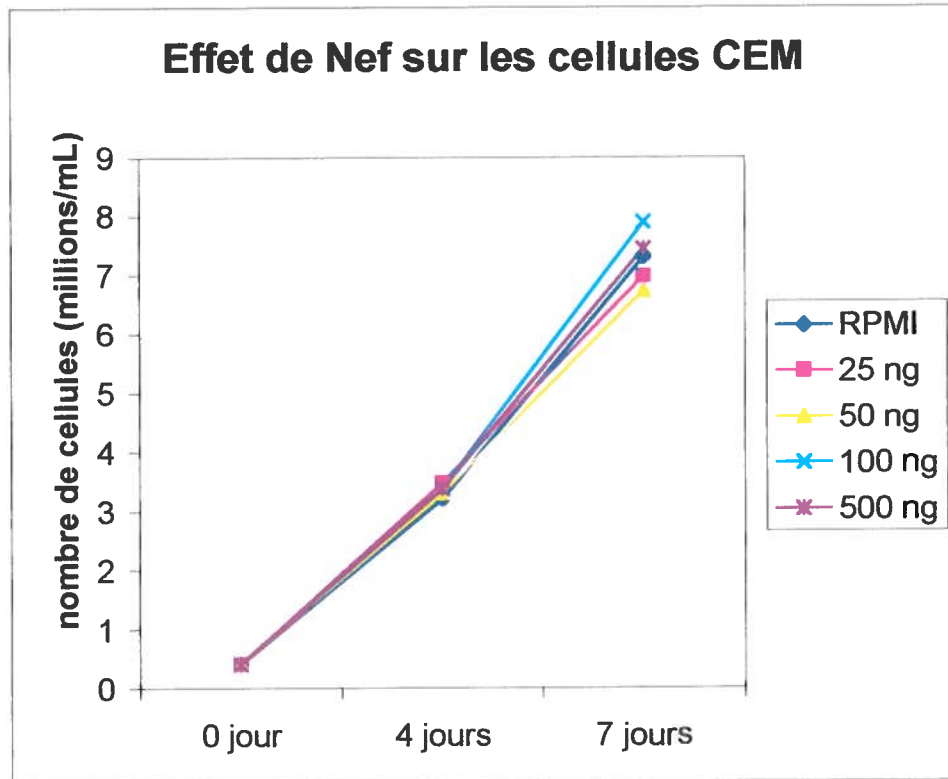
À la dilution virale de  $10^{-4}$ , les cpe sont minimaux en l'absence préalable de contact avec la protéine Nef recombinante, alors que les cellules infectées avec la même dilution virale montrent des cpe maximaux lorsque les cellules ont été pré-incubées avec cette même protéine. Le même phénomène est observé à la dilution  $10^{-5}$ . L'effet de la protéine Nef sur la cytopathogénicité est encore plus évident à la dilution limite de  $10^{-6}$ . Aucun cpe n'a été observé en absence de Nef, alors que le contact avec 100 ou 500 ng de Nef avec les cellules avant l'infection par le VIH-1 LAI induit la formation de fusions primaires, de syncytia et de quelques fusions secondaires. Les cellules CEM non infectées préalablement mises en contact avec 25, 50, 100 et 500 ng de Nef puis lavées ont été observées après 4 et 7 jours à titre de témoin. Quelque soit la quantité de Nef utilisée, la viabilité cellulaire n'est pas affectée par Nef et aucun effet de cytotoxicité sur les cellules CEM n'a été observé (**figure 17**).

#### **4.4.2 Rôle de la protéine Nef dans l'infectivité du VIH-1 LAI**

Afin d'apprécier le potentiel infectieux et la vitesse de réplication du VIH-1 LAI en présence ou en absence de la protéine Nef et de vérifier si les différences de cpe observées quand Nef est fournie en *trans* étaient en relation avec le rendement en virus, nous avons infecté des cellules CEM dans les mêmes conditions en présence ou en l'absence de Nef et les titres viraux ont été déterminés sept jours post-infection.

**Figure 17 : Effet de la protéine Nef recombinante sur les cellules CEM non infectées.**

Un culot de  $0.4 \times 10^6$  cellules CEM a été mis en contact avec 25, 50, 100 ou 500 ng de la protéine Nef pendant 1 heure à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été ensuite lavées avec du RPMI puis entretenues dans du RPMI à 37°C en atmosphère humide en présence de 5% de CO<sub>2</sub>. Un comptage cellulaire a été effectué après 4 et 7 jours dans ces différentes conditions.



**Tableau V : Rôle de la protéine Nef recombinante dans la cytopathogénicité du VIH-1 LAI**

Dilutions virales	RPMI	Nef 100 ng	Nef 500 ng
$10^{-1}$	++++	ND	ND
$10^{-2}$	++++	ND	ND
$10^{-3}$	++++	ND	ND
$10^{-4}$	++	++++	++++
$10^{-5}$	+	+++	++++
$10^{-6}$	-	++	+++

Un culot de  $1,6 \times 10^6$  cellules CEM a été mis en contact avec 100 ou 500 ng de la protéine Nef pendant 1 heure à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été ensuite lavées avec du RPMI puis mises en contact avec 100 µL de chaque dilution du VIH-LAI ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) pendant 1 heure à 37°C. Des cellules CEM n'ayant pas été mises en contact avec la protéine ont servi de référence. Les cellules infectées ont été ensuite réparties dans 4 puits distincts à raison de  $4 \times 10^5$  cellules par puits dans un volume final de 1 mL. Les plateaux ont été incubés à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après 4 jours, 1 mL de milieu complet a été ajouté dans chaque puits. Les cultures cellulaires ont été observées quotidiennement à l'aide d'un microscope inversé Leitz-Diavert et les cpe ont été notés après sept jours selon la convention suivante :

- : aucun cpe
- + : agrégats
- ++ : fusions primaires
- +++ : syncytia et vacuoles
- ++++ : fusions secondaires
- ND : non déterminé (car les cpe sont déjà à leur maximum 3 à 4 jours post-infection)

**Tableau VI: Détermination des titres du VIH-1 LAI en présence ou non de la protéine Nef recombinante 7 jours post-infection.**

	RPMI	Nef 100 ng	Nef 500 ng
<b>Titre viral (DICT<sub>50</sub>/mL)</b>	10 <sup>5,85</sup>	10 <sup>7,6</sup>	10 <sup>7,85</sup>

Des cellules CEM préalablement mises en contact ou non avec la protéine Nef (100 ou 500 ng de la protéine Nef pendant 1 heure à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>, puis lavées avec du RPMI) ont été infectées avec le VIH-1 LAI dans les mêmes conditions (0,1 DICT<sub>50</sub>/cellule). Après sept jours, 100 µL de dilutions décimales (10<sup>-1</sup> à 10<sup>-6</sup>) de chacun des surnageants viraux récoltés ont été incubés avec 1,6 x 10<sup>6</sup> cellules CEM. Après un temps de contact d'une heure à 37°C, quatre mL de RPMI complet ont été ajoutés dans chaque tube, puis les cellules ont été mises en culture en quadruplicat dans des plateaux de 24 puits à raison de 4 x 10<sup>5</sup> cellules par puits dans un volume final de 1 mL. Les plateaux ont été incubés à 37°C sous atmosphère humide avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après 4 jours, 1 mL de milieu frais a été ajouté dans chaque puits. Les cpe ont été notés quotidiennement et les titres viraux ont été calculés selon la formule de Kärber, sept jours post-infection.

Les résultats, présentés au **tableau VI**, montrent une nette augmentation du nombre d'unités infectieuses produites sept jours post-infection en présence de Nef. Les titres viraux étaient de  $10^{5,85}$  DICT<sub>50</sub>/mL en absence de Nef, et de  $10^{7,6}$  et  $10^{7,85}$  DICT<sub>50</sub>/mL respectivement, en présence de 100 ng et 500 ng de la protéine Nef recombinante. Cette augmentation est significative puisqu'elle montre qu'il y a eu 100 fois plus de virus infectieux produits en présence de la protéine Nef.



## 5. DISCUSSION

Bien que l'agent étiologique du SIDA ait été identifié depuis près de vingt ans, les mécanismes par lesquels le VIH détruit le système immunitaire demeurent toujours mal compris. Le VIH infecte préférentiellement les lymphocytes T CD4+; toutefois, la diminution progressive, puis la disparition complète de cette sous-population cellulaire ne peuvent pas s'expliquer uniquement par la destruction directe de ces cellules par le virus. En effet, il a été démontré que seul un faible pourcentage de lymphocytes T étaient infectés par le VIH (1/100 à 1/1 000) (Harper *et al.*, 1986; Schnittman *et al.*, 1989; Embretson *et al.*, 1993). Il apparaît donc clair que d'autres mécanismes sont impliqués dans la pathogenèse associée à l'infection par le VIH.

Parmi les nombreuses hypothèses qui ont été proposées, il en est une qui a retenu notre attention : le rôle de la protéine Nef dans la pathogenèse. Si cette protéine a fait l'objet de nombreuses investigations, elle a également été la source de nombreuses controverses. Initialement considéré comme un facteur de régulation négative, les résultats de plusieurs études ont suggéré qu'elle était plutôt un facteur de virulence.

Si la protéine Nef est impliquée dans la pathogenèse, les questions qui se posent sont les suivantes : 1) la totalité de la protéine Nef est-elle requise pour induire des effets pathogènes ?; 2) existe-t-il une relation entre certains domaines de la protéine et un effet donné ?

L'approche la plus directe pour répondre à ces questions était de disposer de virus mutants dont chacun aurait le potentiel d'exprimer un segment différent et complémentaire de la protéine Nef. Comme de tels mutants n'existent pas dans la communauté scientifique (du moins pas à notre connaissance), trois virus mutants ont été construits par mutagenèse dirigée selon la stratégie suivante : un premier mutant (CDS2)

capable d'exprimer seulement les 19 premiers acides aminés de la portion N-terminale de Nef; un deuxième (CDS1) capable d'exprimer uniquement la longue portion C-terminale de la protéine et un troisième (CDS1.2) potentiellement négatif pour cette protéine.

La construction de ces mutants est le résultat de l'introduction de codons de terminaison prématurés, couplé à des modifications dans les codons d'initiation du gène *nef*. Cette stratégie de mutagenèse, qui évite des délétions dans le gène, constitue l'approche la plus rationnelle pour étudier d'une manière plus spécifique l'implication de la protéine Nef dans certains aspects de la pathogenèse associée à l'infection virale *in vitro*. En effet, le choix que nous avons fait de conserver au maximum l'intégrité du génome viral (le gène *nef* demeure entier mais est capable de ne transcrire que les domaines ciblés) a été fait dans le but de diminuer la probabilité d'introduire des artefacts dans nos résultats.

La présence des deux codons méthionine (ATG) dans le gène *nef* permet au virus de produire deux formes fonctionnelles de la protéine Nef, soit la protéine totale de 27 kDa, myristilée, ou celle de 25 kDa, non myristilée, selon que la transcription se fait à partir du premier ou du second codon d'initiation. Cette propriété, acquise au cours de l'évolution du virus, lui procure un avantage certain puisque, même si une mutation survient au niveau du premier ATG (c'est le cas de CDS1), le virus peut encore produire une protéine Nef fonctionnelle à partir du second codon d'initiation. Les deux autres codons méthionine, situés au centre et vers la fin de la région C-terminale du gène (**figure 5**), ne sont vraisemblablement pas traduits. Nous avons donc ciblé les deux premiers codons d'initiation dans notre mutagenèse dirigée.

L'analyse des patrons de restriction des produits d'amplification ayant confirmé la présence des mutations introduites, ceux-ci ont été clonés dans pNL4.3 pour produire les trois provirus mutants isogènes CDS1, CDS2 et CDS1.2. Toutefois, bien que ce type d'analyse soit suffisamment fiable pour être utilisé de routine dans certains travaux de biologie moléculaire, il était nécessaire de procéder au séquençage complet du gène *nef* avant de produire les banques virales, requises pour notre étude. Le séquençage du gène *nef*, effectué directement sur les trois provirus mutants, a confirmé que les mutations introduites dans le gène avaient été conservées et que, mise à part la région modifiée, le reste du gène était demeuré intact.

Nous avons donc produit une progéniture virale de chacun des mutants de Nef par transfection de cellules CEM avec les provirus isogènes CDS1, CDS2, CDS1.2 et le provirus pNL4.3 à titre de témoin non modifié dans le gène *nef*. L'observation quotidienne des cultures transfectées montraient déjà des différences dans le taux de mortalité cellulaire et dans les effets cytopathogènes aussi tôt que huit jours post-transfection. Toutefois, seul un cycle de réplication virale complet des différentes progénitures virales, depuis la reconnaissance du récepteur et du co-récepteur jusqu'à l'assemblage et la libération des virus par bourgeonnement, montrerait s'il existe des différences phénotypiques entre les virus mutants.

L'infection des cellules CEM avec un volume égal des progénitures virales issues de la transfection avec les différents mutants de Nef a montré qu'il y a en effet une importante différence de phénotype entre les trois virus mutants. Le virus mutant CDS1, se comporte comme une souche non-inductrice de syncytia (NSI); on ne note en effet que très peu de cpe sept jours post-infection (quelques agrégats cellulaires et de rares

fusions primaires), bien que le virus se soit répliqué à un titre très élevé (**figure 12**). Le virus mutant CDS2, au contraire, se comporte comme une souche inductrice de syncytia (SI); en effet, on a noté des cpe précoces qui ont rapidement évolués vers des cpe beaucoup plus sévères sept jours post-infection (syncytia, plusieurs fusions primaires associées à quelques vacuoles), bien que le virus se soit répliqué à un titre nettement inférieur à celui de CDS1 (**figure 13**). Ceci suggère que la portion N-terminale de Nef, qui est myristilée, serait responsable de la cytopathogénicité. Cependant, il est possible que d'autres protéines du VIH participent à la cytopathogénicité; toutefois, l'expression de cette région de Nef semble être une condition suffisante et nécessaire, puisque les mutants CDS1 et CDS 1.2, dépourvus de ce domaine, n'induisent pas de tels cpe. Le virus mutant CDS1.2 se comporte également comme une souche NSI; on note surtout des agrégats et de rares fusions primaires. Il est intéressant de noter que, tout comme le mutant CDS2, le virus CDS1.2 se réplique à des titres inférieurs à ceux de CDS1. Ceci suggère que l'isoforme de 25 kDa de la protéine Nef exprimé par le virus mutant CDS1, formé des résidus 20-206, serait nécessaire et suffisant pour assurer la réplication virale à des titres élevés. Ces résultats confirment l'importance de la région centrale de la protéine Nef et du motif riche en proline dans la réplication virale, tel que rapporté par Goldsmith *et al.* (1995) et Wiskerchen et Cheng-Meyer (1996). Le virus NL4.3, non modifié dans le gène *nef*, se comporte comme la souche sauvage VIH-1 LAI (**figure 15**).

Avant de poursuivre plus loin notre analyse phénotypique des trois virus mutants de Nef et afin de valider les résultats décrits plus haut, une deuxième caractérisation physique du gène *nef* a été effectuée par séquençage directement à partir de l'ARN génomique des banques virales. Après avoir extrait et purifié l'ARN génomique, les

amorces A<sub>5</sub> et A<sub>6</sub> (**tableau I**) situées, respectivement, en amont et en aval du gène *nef* ont été utilisées dans des réactions d'amplification par RT-PCR. Les résultats du séquençage partiel du gène *nef* des trois virus mutants ont confirmé que l'élimination du premier codon d'initiation dans CDS1, du deuxième dans CDS2 et des premier et second codons d'initiation dans CDS1.2 a été conservée dans les progénitures virales après trois passages cellulaires (**figures 18 à 20**). Ceci confirme que, contrairement à ce qui a été observé *in vivo*, des mutations introduites dans le gène *nef* sont conservées lorsque le virus se réplique *in vitro*, vraisemblablement parce qu'elles ne sont pas soumises à une pression immunologique. La séquence en acides aminés déduite de la séquence nucléotidique (**figure 21**) confirme que la protéine Nef exprimée par le virus mutant CDS1 serait une protéine tronquée, formée des résidus 20-206 en raison de l'élimination du premier codon d'initiation. Par ailleurs, la protéine Nef exprimée par le virus CDS2, traduite à partir du premier codon d'initiation, serait myristillée et formée uniquement des 19 premiers acides aminés, en raison de l'introduction d'un codon de terminaison prématuré en plus de l'élimination de second codon d'initiation. Enfin, le virus CDS1.2 ne serait capable d'exprimer aucun des deux isoformes de Nef puisque les deux premiers codons d'initiation ont été supprimés. Le virus NL4.3, qui a servi de témoin, a le potentiel d'exprimer la totalité de la protéine Nef. Les génotypes des banques virales ayant été jugés conformes aux modifications introduites, nous avons procédé à une analyse phénotypique.

A cette fin, nous avons choisi les deux critères qui nous ont semblé les plus susceptibles d'apporter un éclairage sur le rôle de la protéine Nef dans la pathogenèse : l'évaluation des cpe produits par chacun des virus mutants dans les cellules CEM et la

détermination de la cinétique de réplication virale, qui se traduit par la quantité de virus infectieux libérée dans le surnageant des cultures cellulaires sept jours post-infection. Dans le but d'éviter toute ambiguïté dans l'interprétation des résultats, nous nous sommes assurés que la même quantité de cellules soit infectée avec le même MOI. De plus, nous avons infecté des cellules avec des dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ) d'un volume identique des surnageants issus des cellules infectées au même MOI et, comme pour les titrages standardisés par la méthode de Kärber, les lectures finales ont été faites sept jours post-infection et notées. L'infection des cellules avec des dilutions décimales de virus est nécessaire pour identifier le phénotype de la population majoritaire de virus. En effet, il est bien connu que toutes les préparations virales contiennent des sous-populations moins nombreuses, qui sont éliminées au cours des dilutions. Nous avons observé que le virus mutant CDS1 se réplique beaucoup plus rapidement que les mutants CDS2 et CDS1.2 et induit des cpe jusqu'aux dilutions  $10^{-5}$ , alors que, à cette dilution, les deux derniers virus n'induisent que quelques agrégats cellulaires sept jours post-infection. L'absence de cpe dans les cultures cellulaires infectées avec le mutant CDS2 et CDS1.2 à la dilution  $10^{-5}$  vient sans doute de ce que la progéniture de ces deux mutants n'est pas compétente pour infecter les cellules adjacentes. En effet, à ces dilutions, seules quelques cellules sont initialement infectées; il faut donc attendre que ces quelques cellules infectées libèrent une progéniture virale qui, à son tour, infectera d'autres cellules. Les dilutions limites sont donc très utiles, puisqu'elles renseignent sur la compétence des virus majoritaires à infecter les cellules adjacentes. Par ailleurs, lorsque l'on infecte à un MOI très élevé, e.g. 1 DICT<sub>50</sub>/cellule, pratiquement toutes les cellules sont infectées au départ; chacune d'elles libère une progéniture virale d'une manière quasi synchrone qui induit des cpe;

dans cette situation, il n'est pas important que les virus produits soient peu ou pas compétents pour infecter les cellules adjacentes. C'est le cas pour les trois virus mutants et NL4.3 aux dilutions de  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ . L'hypothèse que la progéniture des virus mutants CDS2 et CDS1.2 (tous deux dépourvus de la portion C-terminale de Nef) est moins compétente pour infecter les cellules adjacentes que le mutant CDS1 est appuyée par les titres viraux observés dans les essais de cinétique de réplication virale, où un nombre identique d'unités infectieuses a été utilisé pour infecter les cellules. Comme le montre le **tableau VI**, le phénotype du virus mutant CDS1 est sensiblement le même que celui du virus sauvage VIH-1 NL4.3 pour ce qui a trait à l'efficacité de la réplication virale, qui se traduit ici par le nombre d'unités infectieuses, exprimé en  $DICT_{50}$ , produites sept jours p.i. En effet, le mutant CDS1 présente un titre de  $10^{6.35} DICT_{50}/mL$ , analogue à celui de virus sauvage NL4.3 qui est de  $10^{6.1} DICT_{50}/mL$ . Le virus mutant CDS2 (ayant le potentiel d'exprimer uniquement les 19 premiers acides aminés de la protéine Nef) et CDS1.2 (aucune expression de Nef) présentent des phénotypes semblables avec des titres identiques de  $10^{5.1} DICT_{50}/mL$ . Cette différence est appréciable puisqu'il s'agit d'un écart de dix à vingt fois inférieur à ceux de NL4.3 et de CDS1. Ces résultats vont dans le sens de ceux de Adachi et ses collaborateurs (1999), qui ont montré que les virions produits en l'absence de la protéine Nef auraient des difficultés à synthétiser complètement leur ADN et montreraient également une capacité réduite à entrer dans les cellules. Nos résultats vont un peu plus loin que ceux de ces derniers auteurs; ils suggèrent que c'est l'absence du domaine C-terminal de la protéine Nef qui est responsable de la perte de compétence du virus. En effet, le mutant CDS1 se réplique au même titre que le virus sauvage NL4.3 et les mutants CDS2 et CDS1.2, dépourvus de ce domaine, montrent une cinétique de



réplication plus lente. De plus, nos résultats contribuent à démentir une fois de plus les résultats initiaux voulant que le gène *nef* soit un facteur de régulation négatif dans la réplication du virus (Terwilliger *et al.*, 1986; Luciw *et al.*, 1987; Ahmad et Venkastesan, 1988). En effet, nos résultats appuient plutôt les résultats subséquents qui attribuaient un rôle positif de la protéine Nef dans la réplication virale (De Ronde *et al.*, 1992; Spina *et al.*, 1994). De plus, nos résultats appuient l'hypothèse du rôle de la protéine Nef dans la régulation de certaines étapes du cycle de la réplication virale, notamment dans l'augmentation de la production de virus, en agissant sur la compétence du virus à infecter les cellules adjacentes.

Par ailleurs, nous avons montré le potentiel fusogénique du domaine N-terminal de la protéine Nef par une étude comparative de l'incidence de syncytia associés à des vacuoles dans les cellules infectées, dans les mêmes conditions, avec la même quantité de virus mutants isogènes ainsi qu'avec la souche sauvage à titre de référence. Très peu de vacuoles ou aucune n'ont été observées dans les cultures cellulaires infectées avec les virus mutants CDS1 et CDS1.2, alors que les cellules infectées avec le virus mutant CDS2 présentaient de large syncytia associés à de grosses vacuoles, semblables à ceux observés avec les virus NL4.3 et LAI (**tableau VII**). L'activité fusogénique de la protéine Nef pourrait expliquer l'augmentation de l'infectivité en facilitant le processus de l'adsorption orchestré par la gp41, qui présente des propriétés fusogéniques (Freed *et al.*, 1990; Gordon *et al.*, 1992) analogues à la protéine Nef, tel que suggéré par certains auteurs (Aiken et Trono, 1995; Chowers *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1995). Toutefois, nous avons montré que la présence du domaine fusogénique n'est qu'accessoire et que la

portion C-terminale (l'isoforme de 25 kDa) est requise pour maintenir la réplication au niveau de la souche sauvage.

Une approche intéressante pour investiguer plus à fond le rôle de la protéine Nef dans la cytotoxicité et dans l'infectivité du VIH a été de développer un protocole dans lequel la protéine Nef purifiée est fournie en *trans*. Une même quantité de cellules CEM a été mise en contact avec 100 ou 500 ng de la protéine Nef purifiée ou avec le RPMI sans SFB durant une heure à 37°C. Les cellules ont été lavées avec le RPMI sans SFB et infectées avec 100 µL de chaque dilutions décimales ( $10^{-1}$  à  $10^{-6}$ ). Les cultures ont été observées quotidiennement et les cpe ont été notés sept jours post-infection. Nos résultats, présentés au **tableau VIII**, montrent que la présence de Nef recombinante se traduit par une augmentation considérable des cpe. La comparaison des cpe aux dilutions  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  montre clairement que la protéine Nef est impliquée dans la cytotoxicité. À la dilution de  $10^{-5}$ , nous n'avons observé que quelques agrégats dans les cultures témoins (RPMI), alors qu'au contraire, les cultures cellulaires qui avaient été pré-incubées avec 100 ng de protéine Nef montraient des cpe sévères et celles incubées avec 500 ng étaient à leur maximum. Nous croyons que les effets observés viennent vraiment de la protéine Nef, bien que celle-ci n'était pure qu'à 80 à 90%, car nous avons dilué la préparation Nef par un facteur de 1 000 et 200 pour obtenir les concentrations désirées de 100 et 500 µg dans les essais où nous avons fourni Nef en *trans*.

Nous avons pu établir une corrélation entre les cpe observés et le rendement en virus infectieux lorsque les cellules sont pré-incubées avec la protéine Nef purifiée, dans des cultures où un même nombre de cellules sont infectées à un même MOI. Les titres viraux étaient de  $10^{5.85}$  DICT<sub>50</sub>/mL en l'absence d'une pré-incubation avec la protéine

Nef et de  $10^{7.6}$  et  $10^{7.85}$  DICT<sub>50</sub>/mL en présence de 100 et 500 ng de la protéine Nef, respectivement (**tableau IX**). Cette différence est significative puisqu'il s'agit d'une augmentation par un facteur de cent. Ces résultats suggèrent, une fois de plus, que la protéine Nef est impliquée à la fois dans l'infectivité virale, en facilitant la réplication à un haut niveau, et dans la cytopathogénicité.

Nous n'avons pas observé de relation dose-effet entre 100 ng et 500 ng, tant sur les titres viraux que sur la cytopathogénicité sept jours p.i. Il est difficile d'émettre une quelconque hypothèse pour expliquer ceci, ne connaissant pas le mécanisme exact par lequel la protéine Nef facilite la réplication virale et est cytopathogène pour les cellules CEM. Cependant, puisque l'excédent de protéine a été éliminé par un lavage des cellules, après une heure d'incubation, la question qui vient à l'esprit est de savoir si la protéine Nef a pénétré dans la cellule ou si elle s'y est seulement adsorbée. L'investigation qui aurait permis de répondre à ces questions aurait représenté une somme de travail si importante, qu'elle dépasserait largement le cadre d'une maîtrise. Nous pouvons, toutefois, considérer l'une et l'autre éventualité, car elles sont toutes deux possibles. La protéine Nef est myristilée; cette chaîne hydrophobe pourrait interagir avec la membrane plasmique qui est constitué principalement de phospholipides, également hydrophobes, à l'exclusion des petites «têtes» hydrophiles. Ces interactions hydrophobes auraient pu faciliter l'internalisation. Alternativement, l'adsorption de la protéine Nef à la surface cellulaire est également possible. En effet, Otake et ses collaborateurs (2000) ont montré que la protéine Nef extracellulaire pouvait se lier à la population de cellules T CD4 mémoires. Certes, l'expression transitoire de la protéine directement à l'intérieur de la cellule par le biais d'un vecteur d'expression aurait fournie de précieuses informations

sur les conséquences de la présence de la protéine recombinante dans le compartiment intracellulaire (cette investigation sera conduite très bientôt au laboratoire). Cependant, il reste que le contact externe de la protéine avec les cellules que nous avons réalisé demeure très pertinent comme démarche expérimentale, car même si on sait que la protéine Nef est localisée principalement au niveau de la face interne de la membrane du virus (Niederman *et al.*, 1993; Yu et Felsted, 1992), elle est aussi retrouvée à la surface des cellules infectées et sous forme libre sécrétée dans le milieu extracellulaire (Fujii *et al.*, 1993). Cette distribution de la protéine Nef, autant dans le compartiment intracellulaire qu'extracellulaire, appuie l'hypothèse selon laquelle sa présence intracellulaire permettrait aux cellules infectées d'échapper aux différents mécanismes de la cytotoxicité cellulaire et d'apoptose, alors que la protéine Nef extracellulaire serait principalement associée à la déplétion des cellules au repos non infectées par un mécanisme apoptotique ainsi que par ses propriétés de promouvoir des perturbations au niveau de la membrane des cellules en provoquant des fusions membranaires et des lyses cellulaires (Azad, 2000).

Plusieurs points contribuent à appuyer l'hypothèse de l'implication de la protéine Nef dans la progression de la maladie par le biais de la déplétion des cellules non infectés (Nef extracellulaire) et en maintenant les cellules infectées en vie plus longtemps (Nef intracellulaire) : 1) la cytotoxicité observée dans les cellules infectées par les virus positifs pour la protéine Nef ou exprimant la région N-terminale de la protéine Nef (VIH-1 CDS2); 2) l'activation des cellules CEM non infectées et des lymphocytes du sang périphérique humain mis en présence de la protéine Nef recombinante, pouvant conduire à l'apoptose (Thibodeau, non publié); 3) la lyse rapide d'une variété de cellules

CD4<sup>+</sup> et non CD4<sup>-</sup> quand la portion N-terminale myristilée de la protéine Nef est présente dans le milieu extracellulaire (Azad 2000), et 4) l'augmentation de la production virale et des effets cytopathogènes sur les cellules CEM infectées avec de très faibles dilutions du virus VIH-1 LAI quand la protéine recombinante Nef est fournie en *trans*. Ce dernier point appuie l'hypothèse de Pugliese et de ses collaborateurs (1999) qui suggèrent que la protéine Nef fournie en *trans* inhibe la synthèse des protéines cellulaires en facilitant les voies métaboliques impliquées dans la réplication du virus en plus de moduler la susceptibilité à l'infection par le VIH-1 et sa capacité d'accentuer l'effet d'un stimulus apoptotique pouvant faciliter la libération des virions néoformés.

Ces diverses observations permettent donc de postuler d'autres mécanismes que qu'une action directe du virus pour rendre compte de la déplétion des lymphocytes CD4<sup>+</sup> chez les sidéens, car la réplication du VIH dans les lymphocytes des ganglions ne peut à elle seule justifier la diminution draconienne des lymphocytes puisque seul un lymphocyte sur 100 ou un lymphocyte sur 1 000 seraient véritablement infectés par le virus (Harper *et al.*, 1986; Schnittman *et al.*, 1989; Embretson *et al.*, 1993). D'autres protéines du VIH telles que la protéine Tat (Li *et al.*, 1995) et le complexe gp120-gp41 (Laurent-Crawford *et al.*, 1993; Lu *et al.*, 1994) ont été impliqués dans l'induction de l'apoptose des lymphocytes non-infectés et pourraient également jouer un rôle dans la disparition des lymphocytes CD4<sup>+</sup>. Toutefois, si ces protéines virales sont impliquées dans certains aspects de la pathogenèse, il demeure que la littérature, aussi bien que la contribution que nous avons faite au cours de notre étude, montrent que la protéine Nef joue un rôle très important dans la pathogenèse associée à l'infection par le VIH.

## **6. CONCLUSIONS**

En dernière analyse, la réalisation de ce projet nous aura permis d'apporter une contribution à l'étude de certaines propriétés de la protéine Nef du VIH-1. Les trois constructions que nous avons réalisées au cours de cette étude nous auront permis de générer des virus qui présentent un phénotype différent quant à la protéine Nef, avec : a) un premier virus (CDS1) qui exprimerait uniquement les résidus 20-206 de la protéine, b) un second virus (CDS2) qui exprimerait uniquement les résidus 1-19 de la protéine Nef, et enfin, c) un dernier virus (CDS1.2) qui serait potentiellement négatif pour la protéine Nef. Ainsi, ces différentes constructions de virus mutants mettant en relief l'absence de la région N-terminale myristilée (résidus 1-19) et/ou la région C-terminale (résidus 20-206) de la protéine Nef, ainsi que les banques virales correspondantes, seront d'une grande utilité dans d'autres approches expérimentales visant à poursuivre l'étude en profondeur du rôle de la protéine Nef dans la pathogenèse associée à l'infection virale.

Après cette première étape de construction moléculaire, l'étude phénotypique de ces virus mutants que nous avons réalisée a été avant tout soutenue après la confirmation du génotype de ces derniers en effectuant une caractérisation physique avec le séquençage partiel du gène *nef* dans les régions portant les modifications. Ainsi, nous avons pu montrer, suite à cette caractérisation physique de ces virus par séquençage, que les mutations introduites étaient conservées dans les progénitures virales respectives après l'ensemble des études phénotypiques réalisées, soit après plus de quatre cycles d'infection et de récolte des progénitures virales. Par conséquent, ceci nous permettait de valider nos résultats, d'une part, et d'établir un lien entre le génotype de ces derniers et les résultats de notre étude phénotypique, d'autre part.

La réalisation du troisième volet de ce projet, l'étude phénotypique de ces virus, nous aura permis de confirmer l'implication de la protéine Nef dans l'infectivité virale et dans la cytopathogénicité, particulièrement sur la productivité virale et sur l'aspect quantitatif et qualitatif des cpe produits après l'infection des cellules CEM *in vitro*. Nous avons pu dégager une corrélation entre la présence des résidus 20-206 (Nef 25 kDa potentiellement exprimée par le mutant CDS1) et le maintien des titres viraux à des niveaux élevés *in vitro*. En effet, les virus mutants CDS2 et CDS1.2, dépourvus de cette région, montraient une diminution des titres de virus infectieux. Ces résultats appuient l'hypothèse du rôle de la protéine Nef dans la régulation de différentes étapes du cycle de la réplication virale, dans l'augmentation de la production de virus dans un cycle de réplication ainsi que l'importance de la région centrale de la protéine Nef et du motif riche en proline dans l'infectivité et la croissance virale. De plus, cette région formée par les résidus 20-206 serait également impliquée dans la vitesse à laquelle les cpe apparaissent. En effet, le mutant CDS1, le seul parmi les mutants à pouvoir exprimer cette région de la protéine, produit des cpe qui apparaissent à une vitesse sensiblement identique à celle du virus sauvage NL4.3 dans les cellules CEM *in vitro*. Par contre, les modifications abolissant l'expression de cette région dans les constructions CDS2 et CDS1.2 se manifestent par une apparition plus tardive des cpe.

Cependant, la courte portion N-terminale formée par les résidus 1-19 serait plutôt impliquée dans l'aspect qualitatif et quantitatif des cpe produits dans les cellules CEM *in vitro*, en modulant le degré de formation de syncytia et de vacuoles. Les mutations qui engendrent la perte des résidus 1-19 de la protéine Nef et subséquemment du site de myristilation observées chez le virus mutant CDS1, ne semblent pas affecter la



production virale, mais réduisent certains aspects de l'activité virale en relation avec la cytotoxicité *in vitro* comme la formation des syncytia et de vacuoles. Ainsi, les virus mutants CDS1 et CDS1.2 se comportent comme des souches NSI, contrairement au virus mutant CDS2 (qui exprimerait uniquement les 19 premiers acides aminés) qui induit des cpe maximaux ressemblant aux cpe des virus NL4.3 et LAI tous deux positifs pour la protéine Nef. Ces cpe maximaux se traduisaient particulièrement par de nombreuses fusions et des vacuoles plus importantes. Ainsi, les propriétés fusogéniques de la protéine Nef gouvernées par les 18 premiers acides aminés de la portion N-terminale ont été confirmées ici dans le contexte d'infections virales de cellules CEM *in vitro* avec les trois mutants de Nef. Ce potentiel fusogénique semble être impliqué dans la formation des syncytia et des vacuoles résultant de la mise en commun des membranes des cellules fusionnées.

La production de la protéine Nef recombinante dans le système d'expression baculoviral et sa purification sur colonne héparine-sépharose réalisées dans le quatrième et dernier volet de ce projet ont été très concluantes. Avec ce procédé, nous avons pu obtenir une protéine Nef recombinante pure à plus de 80% avec un profil électrophorétique sur un gel de polyacrylamide 14% qui correspond à la masse moléculaire attendue de 25-27 kDa. L'augmentation des titres des progénitures virales produites ainsi que des cpe après 7 jours dans les cellules préalablement mises en présence de 100 ou 500 ng de la protéine avant leur infection avec le VIH-1 LAI, confirme à nouveau l'implication de la protéine Nef dans la cytopathogénicité et dans l'augmentation de l'infectivité virale. Ainsi, l'augmentation de la production virale (titres viraux plus élevés) associée à l'augmentation de la cytotoxicité (mortalité cellulaire et

cpe augmentés), quand la protéine Nef recombinante est fournie en *trans*, appuient l'hypothèse de l'implication de Nef dans la progression de la maladie. Ces résultats suggèrent qu'il y aurait un grand intérêt à considérer la protéine Nef comme une cible de premier rang dans le développement de nouvelles stratégies préventives et thérapeutiques contre l'infection par le VIH et l'évolution vers le SIDA.

## **7. REMERCIEMENTS**

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de recherche, le Dr Lise Thibodeau, pour son appui soutenu, sa patience tout au long de la réalisation de ce projet de recherche et tout particulièrement pour m'avoir inculqué la rigueur scientifique.

J'aimerais également adresser mes remerciements au Dr Claude Lavallée, attaché de recherche dans le laboratoire de recherche sur le SIDA du Dr Lise Thibodeau, pour avoir assuré une importante partie de ma formation, par son support scientifique et par ses conseils tout au long de la réalisation de ce projet.

Mes remerciements vont également à Céline Tremblay et à Robert Alain pour leur support technique qui fut grandement apprécié. Mes remerciements s'adressent également à Lise Forget et Louise Paris du service de séquençage de l'INRS-Institut Armand-Frappier pour leur contribution dans la réalisation de ce projet.

J'aimerais également remercier le Pr Luc Montagnier, directeur du "Bernard and Gloria Salick Center for Molecular and Cellular Biology" au "Queens College" à New-York, pour son accueil dans ce centre qui m'a permis de terminer mes travaux de recherche sous la direction du Dr Lise Thibodeau.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude au Dr Lise Thibodeau, à la Fondation Armand-Frappier, la compagnie Biocapital ainsi que le Ministère de l'éducation du Québec qui m'ont offert leur aide financière au cours de ma maîtrise.

Je voudrais enfin exprimer tous mes remerciements à mes parents Hamed Sene et Marème Diop, à mes frères et sœurs, à mes grands-parents, à mes tantes et oncles, à mon Cheikh, El Hadji Falilou Mbacké, ibn (fils de) Cheikh Ibrahima Mbacké, ibn Khadimou Rassoul, à tous mes amis et tous les membres et disciples de la grande famille de Cheikh Ahmadou Bamba (Khadimou Rassoul).

## **8. BIBLIOGRAPHIE**

ADACHI, A., GENDELMAN, H.E., KOENIG, S., FOLKS, T., RABSON, A et MARTIN, M.A. 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol.* **59**, 284-291.

ADACHI, A., KOENIG, S., GENDELMAN, H.E., DAUGHERTY, D., GATTONI-CELLI, S., FAUCI, A.S et MARTIN, M.A. 1987. Productive, persistent infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. *J Virol.* **61**, 209-213.

ADACHI, A., OSHIMA, Y. 1999. Cell-dependent functional roles of HIV-1 Nef for virus replication (review). *Int J Mol Med.* **3**, 427-30.

AHMAD, N et VENKATESAN, S. 1988. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* **241**, 1481-1485.

AIKEN, C., KONNER, J., LANDEAU, N. R., LENBURG, M. E., et TRONO, D. 1994. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* **76**, 853-864.

AIKEN, C., KRAUSE, L., CHEN, Y.L et TRONO, D. 1996. Mutational analysis of HIV-1 Nef: identification of two mutants that are temperature-sensitive for CD4 downregulation. *Virology* **217**, 293-300.

AIKEN, C et TRONO, D. 1995. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *J Virol.* **59**, 284-291.

AKARI, H., UCHIYAMA, T., FUKUMORI, T., LIDA, S., KOYAMA, A.H et ADACHI, A. 1999. Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 by vesicular stomatitis virus G protein does not reduce the cell-dependent requirement of vif for optimal infectivity: functional difference between Vif and Nef. *J Gen Virol.* **80**, 2945-49.

ALDOVINI, A et YOUNG, R.A. 1990. Mutations of RNA and protein sequences involved in HIV packaging in production of noninfectious virus. *J Virol.* **64**, 1920-1926.

ALEXANDER, L., DU, Z., HOWE, A.Y., CZAJAK, S et DESROSIERS, R.C. 1999. Induction of AIDS in rhesus monkeys by a recombinant simian immunodeficiency virus expressing of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **73**, 5814-25.

ALEXANDER, L., DU, Z., ROSENZWEIG, M., JUNG, J.U et DESROSIERS, R.C. 1997. A role for natural simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 1 *nef* alleles in lymphocyte activation. *J Virol.* **71**, 6094-6099.

ALKATIB, G., COMBADIÈRE, C., BRODER, C.C., FENG, Y., KENNEDY, P.E., MURPHY, P.M et BERGER, E.A. 1996. CC CKR5: A RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  receptor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-1958.

- ALONSO, A., CUJEC, T.P et PETERLIN, B.M. 1994. Effects of human chromosome 12 on interactions between Tat and TAR of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **68**, 6505-6513.
- AMBROSINI, E., SLEPKO, N., KOHLEISEN, E., SHUMAY, E., ERFLE, V., ALOISI, F et LEVI, G. 1999. HIV-1 Nef alters the expression of betaII and epsilon isoforms of protein kinase C and activation of the long terminal repeat promoter in human astrocyte cells. *GLIA.* **27**,143-51.
- ANDERSON, S., SHUGARS, D.C., SWANSTROM, R et GARCIA, J.V. 1993. Nef from primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 suppresses surface CD4 expression in human and mouse T cells. *J Virol.* **67**, 4923-4931.
- ANTONI, BA., STEIN, S.B et RABSON, A.B. 1994. Regulation of human immunodeficiency virus infection: implication for pathogenesis. *Adv Virus Res.* **43**, 53-145.
- AROLD, S., FRANKEN,P., STRUB, M.P., HOH, F., BENICHOU, S., BENAROUS, R et DUMAS, C. 1997. The CRYSTAL STRUCTURE OF Nef protein bound the Fyn kinase SH3 domain suggests a role for this complex in altered T cell receptor signalling. *Structure* **5**, 1361-1372.
- ARTHUR, L.O., BESS, J.W., SOWDER, R.C., BENVENISTE, R.E., MANN, D.L., CHERMANN, J et HENDERSON, L.E. 1992. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* **258**, 1935-1938.
- ARYA, S.K., GUO, C., JOSEPHS, S.F et WONG-STAAAL, F. 1985. Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-II). *Science* **229**, 69-73.
- AZAD, A.A. 2000. Could Nef and Vpr proteins contribute to disease progression by promoting depletion of bystander cell and prolonged survival of HIV-infected cells ? *Biochem Biophys Res Comm.* **267**, 677-685.
- BAHT, S., SPITALNIK, S.L., GONZALEZ-SCARANO, D.H et SIBERBERG, D.H. 1991. Galactosyl ceramide or a derivative is an essential component of the neural receptor for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120. *Proc Nat Acad Sci.USA* **88**, 7131-7134.
- BALTIMORE, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-1211.
- BANDRES, J.C., LURIA, S et RATNER, L. 1994. Regulation of human immunodeficiency virus nef protein by phosphorylation. *Virology* **201**, 157-161.
- BARIN, F. 1996. *Transcriptase* **44**, 9.

- BARRE-SINOUSI, F., CHERMANN, J.C., REY, F., NUGEYRE, M.T., CHAMARET, S., GRUEST, J., DAUGER, C., AXLER-BLIN, C., VEZINET-BRUN, F., ROUZIOUX, C., ROZENBAUM, W et MONTAGNIER, L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at a risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.
- BAUR, A.S., SASS, G., LAFFERT, B., WILLBOLD, D., CHENG-MAYER, C et PETERLIN, B.M. 1997. The N-terminus of Nef from HIV-1/SIV associates with a protein complex containing Lck and a serine kinase. *Immunity* **6**, 283-291.
- BELL, D., ASHMAN, C., MAUGHAN, J., HOOKER, E., COOK, F et REINHART, T.A. 1998. Association of simian immunodeficiency virus Nef with the T-cell receptor (TCR) zeta chain leads to TCR down-modulation. *J Gen Virol.* **79**, 2717-2727.
- BENSON, R.E., SANFRIDSON, A., OTTINGER, J. S., DOYLE, C. et CULLEN, B. R. 1993. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J Exp Med.* **177**, 1561-1566.
- BERGER, E.A., MURPHY, P.M et FARBER, J.M. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism and disease. *Annu Rev Immunol.* **17**, 656-700.
- BERSON, J.F et DOMS, R.W. 1998. Structure-function studies of the HIV-1 coreceptors. *Sem in Immunol.* **10**, 237-248.
- BERSON, J.F., LONG, D., DORANZ, B.J., RUCKER, J., JIRIK, F.R et DOMS, R.W. 1996. A seven transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell tropic human immunodeficiency virus type-1 strains. *J Virol.* **70**, 6288-6295.
- BIGGS, T.E., COOKE, S.J., BARTON, C.H., HARRIS, M.P., SAKSELA, K et MANN, D.A. 1999. Induction of activator protein 1 (AP-1) in macrophages by human immunodeficiency virus type-1 NEF is a cell-type-specific response that requires both hck and MAPK signalling events. *J Mol Biol.* **290**, 21-35.
- BINNINGER, D., ENNEN, J., BONN, D., NORLEY, S.G et KURTH, R. 1991. Mutational analysis of the simian immunodeficiency virus SIVmac *nef* gene. *J Virol.* **65**, 5237-5243.
- BRAMBILLA, A., TURCHETTO, L., GATTI, A., BOVELENTA, C., VEGLIA, F., SANTAGOSTINO, E., GRINGERI, A., CLEMENTI, M., POLI, G., BAGNARELLI, P et VICENZI, E. 1999. Defective *nef* alleles in cohort of haemophiliacs with progressing and nonprogressing HIV-1 infection. *Virology* **259**, 349-68.
- BRASSEUR, R., CORNET, B., BURNY, A., VANDENBRANDEN, M., RUYSSCHAERT, J.M. 1988. Mode of insertion into a lipid membrane of the N-terminal HIV gp41 peptide segment. *Aids Res Hum Retroviruses* **4** (2),83-90.



- BRESNAHAN, P.A., YONEMOTO, W., FERRELL, S., WILLIAMS-HERMAN, D., GELEZIUNAS, R et GREENE, W.C. 1998. A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. *Curr Biol.* **8**, 1235-1238.
- BRESNAHAN, P.A., YONEMOTO, W et GREENE, W.C. 1999. Cutting edge: SIV Nef protein utilizes both leucine and tyrosine based protein sorting pathways for down-regulation of CD4. *J Immunol.* **163**, 2977-81.
- BRICKELL, P.M. 1992. The p60c-src family of protein-tyrosine kinases: structure, regulation, and function. *Crit Rev oncog.* **3**, 401-446.
- BRIGGS, S.D., LERNER, E.C et SMITHGALL, T.E. 2000. Affinity of Src Family Kinase SH3 domains for HIV Nef in Vitro Does Not Predict Kinase Activation by Nef in Vivo. *Biochemistry* **39**, 489-495.
- BRIGGS, S.D., SHARKEY, M., STEVENSON, M et SMITHGALL, T.E. 1997. SH3-mediated hck tyrosine kinase activation and fibroblast transformation by the nef protein of HIV-1. *J Biol Chem.* **272**, 17899-17902.
- BRODER, S., MERIGAN, T.C et BOLOGNESI, D. 1994. Textbook of AIDS medicine. Baltimore: Williams and Wilkins.
- BROLIDEN, P.A., LJUNGEREN, K., HINKULA, J., NORRBY, E., AKERBLOM, L et al. 1990. A monoclonal antibody to HIV-1 mediating cellular cytotoxicity (ADCC) and neutralization. *J Virol.* **64**, 936-940.
- BRYANT, L.M., YAMAMOTI, J., LUCIW, P., MUNN, R., MARX, P., HIGGINS, J., PEDERSEN, N., LEVINE, A et GARDNER, M.B. 1985. Molecular comparison of retroviruses associated with human and simian AIDS. *Hematol oncol.* **3**, 187-197.
- BUKRINSKY, M.I., SHAROVA, N., McDONALD, T.L., PUSHKARSKAYA, T., TARPLEY, W.G et STEVENSON, M. 1993. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **90**, 6125-6129.
- BUKRINSKAYA, A.G., GHORPADE, A., HEINZINGER, N.K., SMITHGALL, T.E., LEWIS, R.E et STEVENSON, M. 1996. Phosphorylation-dependent human immunodeficiency virus type 1 infection and nuclear targeting of viral DNA. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **93**, 367-371.
- CASELLA, C.R., RAPOPORT, E.L et FINKEL, T.H. 1999. Vpu increases susceptibility of human immunodeficiency virus type 1-infected cells to fas killing. *J Virol.* **73**, 92-100.

CASTRO, K.G., LIEB, S., JAFFE, H.W., et al. 1988. Transmission of HIV in Belle Glade, Florida : lessons for other communities in the United States. *Science* **239**, 193-197.

CATUCCI, M., VENTURI, G., ROMANO, L., VALENSI, P.E et ZAZZI, M. 2000. Analysis of the HIV-1 *nef* gene in five intravenous drug users with long-term nonprogressive HIV-1 infection in Italy. *J Med Virol.* **60**, 294-299.

CARL, S., DANIELS, R., IAFRATE, A.J., EASTERBROOK, P., GREENNOUGH, T.C., SKOWRONSKI, J et KIRCHHOFF, F. 2000. Partial repair of Defective Nef Genes in a long-Term Nonprogressor with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Infect Dis.* **181**, 132-140.

CDC. 1993. Revised classification system for infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR* 41, (RR-17), 1.

CHANG, S.Y.P., BOWMAN, B.H., WEISS, J.B., GARCIA, R.E et WHITE, T.J. 1993. The origin of HIV-1 isolate HTLV-IIIB. *Nature* **363**, 466-469.

CHEN, Y.M., LIN, R.H., LEE, C.M., FU, C.Y., CHEN, S.C et SYU, W.J. 1999. Decreasing levels of anti-Nef antibody correlate with increasing HIV type 1 viral loads and AIDS disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **15**, 43-50.

CHEN, Y.L., TRONO, D et CAMAUR, D. 1998. The proteolytic cleavage of human immunodeficiency virus type 1 Nef does not correlate with its ability to stimulate virion infectivity. *J Virol.* **72**, 3178-3184.

CHENG-MAYER, C., IANNELLO, P., SHAW, K., LUCIW, P.A et LEVY, J.A. 1989. Differential effects of *nef* on HIV replication: implication for viral pathogenesis in the host. *Science* **246**, 1629-1632.

CHOE, H., FARZAN, M., KONKEL, M., MARTIN, K., SUN, Y., MARCON, L., GAYABYAD, M., BERMAN, M., DORF, M.E., GERARD, N., GERARD, C et SODROSKI, J. 1998. The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **72**, 6113-6118.

CHOE, H., FARZAN, M., SUN, Y., SULLIVAN, N., ROLLINS, B., PONATH, P.D., WU, L., MACKAY, C.R., LAROSA, G., NEWMAN, W., GERARD, N., GERARD, C et SODROSKI, J. 1996. The  $\beta$ -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-1148.

CHOWERS, M.Y., SPINA, C. A., KWOTH, T. J., FITCH, N. J. S., RICHMAN, D. D et GUATELLI, J. C. 1994. Optimal infectivity *in vitro* of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact *nef* gene. *J Virol.* **68**, 2906-2914.

CHOWERS, M.Y., PANDORI, M.W., SPINA, C.A., RICHMAN, D.D et GUATELLI, J.C. 1995. The growth advantage conferred by HIV-1 *nef* is determined at the level of viral DNA formation and is independent of CD4 downregulation. *Virology* **212**, 451-457.

CLARK, S.J., SAAG, M.S., DEKKER, W.D., CAMPBELL-HILL, S., ROBERSON, J.L., VELDKAMP, P.J., KAPPES, J.C., HAHN, B.H et SHAW, G.M. 1991. High titres of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med.* **234**, 954-960.

CLAVEL, F., GUÉTARD, D., BRUN-VEZINAET, F., CHAMARET, S., REY, M.A., SANTOS-FERREIA, M.O., LAURENT, A.G., DAUGET, C., KATLAMA, C et ROUZIOUX, C. 1986. Isolation of a new retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**, 5230-5234.

CLAVEL, F et ORENSTEIN, J.M. 1990. A mutant of human immunodeficiency virus with reduced RNA packaging and abnormal particle morphology. *J Virol.* **64**, 5230-5234.

COATES, K., COOKE, S., MANN, D.M et HARRIS, M.P.G. 1997. Protein kinase C-mediated phosphorylation of HIV-1 Nef in human cell lines. *J Biol Chem.* **272**, 12289-12294.

COCCHI, F., DEVICO, A.L., GARZINO-DEMO, A., ARYA, S.K., GALLO, R.C et LUSSO, P. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 $\alpha$  AND MIP-1 $\beta$  as a major HIV-suppressive factor by CD8+ T cells. *Science* **270**, 1811-1815.

COFFIN, J.M. 1991. Retroviridae and their replication, *Fundamental Virology*, Second edition, B.N. Fields, D.M. Kinipe *et al.*, Raven Press, Ltd., New York, 645.

COFFIN, J., HAASE, A., LEVY, J.A., MONTAGNIER, L., OROSZLAN, S., TEICH, N., TEMIN, H., TOYOSHIMA, K., VARMUS, H et VOGT, P. *et al.* 1986. Human immunodeficiency viruses [letter] *Science* **232**, 697.

COHEN, E.A., TERWILLIGER, E.F., JALINOS, Y., PROVIX, J., SODROSKI, J.G et HASELTINE, W.A. 1990. Identification of HIV-1 vpr product and function. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **3**, 11-18.

COHEN, E.A., TERWILLIGER, E.F., SODROSKI, J.G et HASELTINE, W.A. 1988. Identification of a protein encoded by the *vpu* gene of HIV-1. *Nature* **334**, 532-534.

COHEN, G.B., GANDHI, R.T., DAVIS, D.M., MANDELBOIM, O., CHEN, B.K., STROMINGER, J.L et BALTIMORE, D. 1999. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* **10**, 661-671.

- COHEN, G.B., RANGAN, V.S., CHEN, B.K., SMITH, S et BALTIMORE, D. 2000. The human thioesterase II protein binds to a site on HIV-1 Nef critical for CD4 down-regulation. *J Biol Chem* **275**, 23097-105
- COLLETTE, Y., DUTARTRE, H., BENZIANE, A., RAMOS-MORALES, F., BENAROUS, R., HARRIS, M et OLIVE, D. 1996a. Physical and functional interactions of Nef with Lck. *J Biol. Chem.* **271**, 6333-6341.
- COLLETTE, Y., CHANG, H.L., CERDAN, C., CHAMBOST, H., ALGARTE, M., MAWAS, C., IMBERT, J., BURNY, A et OLIVE, D. 1996b. Specific Th1 cytokine downregulation associated with primary clinically derived human immunodeficiency virus type 1 Nef gene-induced expression. *J Immunol.* **156**, 360-370.
- COLLETTE, Y et OLIVE, D. 1999. The lentivirus-encoded nef protein can regulate several steps of the viral replication cycle. *Virology* **265**, 173-7.
- COLLINS, K.L., CHEN, B.K., WALKER, B.D et BALTIMORE, D. 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **391**, 397-401.
- CRAIG, H.M., PANDORI, M.W et GUATELLI, J.C. 1998. Interaction of HIV-1 nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **95**, 11229-11234.
- CULLEN, B.R. 1991. Regulation of HIV-1 gene expression. *FASEB J.* **5**, 2361-2368.
- CULLEN, B.R. 1992. Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol Rev.* **56**, 375-394.
- CULLEN, B.R. 1994. The role of *nef* in the replication cycle of the human and simian immunodeficiency viruses. *Virology* **205**, 1-6.
- CURRAN, J.W., JAFFE, H.W., HARDY, A.M., MORGAN, W.M., SELIK, R.M et DONDERO, T.J. 1988. Epidemiology of HIV infection and AIDS in the United States. *Science* **239**, 610-616.
- CURTAIN, C.C., SEPAROVIC, F., RIVETT, D., KIRKPATRIK, A., WARING, J.A., GORDON, L.M et AZAD, A.A. 1994. Fusogenic activity of amino-terminal region of HIV type 1 Nef protein. *AIDS research and human retroviruses* **10**:1231-1240.
- DAAR, E.S et HO, D.D. 1992. Variable HIV sensitivity to neutralization by recombinant soluble CD4. In: Koff, W.C., Wong-Staal, F., Kennedy, R.C.eds. AIDS research reviews. New York: Marcel Dekker, 249-258.

DALGLEISH, A.G., BEVERLY, P.C.L., CLAPHAM, P.R., CRAWFORD, D.H., GREAVES, M.F et WEISS, R.A. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763-767.

DANIEL, M.D., KIRCHHOFF, F., CZAJAK, S.C., SEHGAL, P.K et DESROSIERS, R.C. 1992. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the *nef* gene. *Science* **258**, 1938-41.

DANIEL, M.D., LETVIN, N.L., KING, N.W. et al. 1985. Isolation of T-cell tropic HTLV-III like retrovirus from macaques. *Science* **228**, 1021-1204.

DAUDEL, R., MONTAGNIER, L et THIBODEAU, L. 1999. Perspectives vaccinales et immunothérapeutiques dans la lutte contre le SIDA. *Technical Report*, 27. UNESCO VENICE OFFICE. (ROSTE).

DEACON, N.J., TYSKIN, A., SOLOMON, A., SMITH, K., LUDFORD-MENTING, M., HOOKER, D.J., McPHEE, D.A., GREENWAY, A.L., ELLET, A., CHATFIELD, C et al. 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**, 988-991.

DE LEYS, R., VANDERBORGHT, B., VANDEN HAESEVELDE, M., HEYNDRIKX, L., VAN GELL, A., WAUTERS, C., BERNAERTS, R., SAMAN, E., NIJS, P., WILLEMS, B et al. 1990. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol.* **64**, 1207-1216.

DENG, H.K., LIU, R., ELLMEIER, W., CHOE, S., UNUTMAZ, D., BURKHAT, M., DI MARZIO, P., MARMON, S., SUTTON, R.E., HILL, C.M., DAVIS, C.B., PEIPER, S.C., SCHALL, T.J., LITTMAN, D.R et LANDAU, N.R. 1996. Identification of a major coreceptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-666.

DENG, H.K., UNUTMAZ, D., KEWALRAMANI, V.N et LITTMAN, D.R. 1997. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* **388**, 296-300.

DE RONDE, A., KLAVER, B., KEULEN, W., SMIT, L et GOUDSTMIT, J. 1992. Natural hiv-1 Nef accelerates virus replication in primary human lymphocytes. *Virology* **188**, 391-395.

DEWHURST, S., SAKAI, K., BRESSER, J., STEVENSON, M., EVINGER-HODGES, M.J et VOLSKY, D.J. 1987. Persistent productive infection of human glial cells by human immunodeficiency virus (HIV) and by infectious molecular clones of HIV. *J Virol.* **61**, 3774-3783.

DIMITROV, D.S., XIAO, X., CHABOT, D.J et BRODER, C.C. 1998. HIV Coreceptors. *J Membrane Biol.* **166**, 75-90.

DITTMER, U., NISSLEIN, T., BODEMER, W., PETRY, H., SAUERMAN, U., STAHL-HENNIG, C et HUNSMANN, G. 1995. Cellular immune response of rhesus monkeys infected with a partially attenuated nef deletion mutant of the simian immunodeficiency virus. *Virology* **212**, 392-397.

DORANZ, B.J., RUCKER, J., YI, Y., SMYTH, R.J., SAMSON, M., PEIPER, S.C., PARMENTIER, M., COLLMAN, R.G et DOMS, R.W. 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the  $\beta$  chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**, 1149-1158.

DRAGIC, T., LITWIN, V., ALLAWAY, G.P., MARTIN, S.R., HUANG, Y., NAGASHIMA, K.A., CAYANAN, C., MADDON, P.J., KOUP, R.A., MOORE, J.P et PAXTON, W.A. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673.

DU, Z., LANG, S.M., SASSEVILLE, V.G., LACKNER, A.A., ILYINSKII, P.O., DANIEL, M.D., JUNG, J.U et DESROSIERS, R.C. 1995. Identification of a *nef* allele that causes lymphocyte activation and acute disease in macaque monkeys. *Cell* **82**, 665-674.

DUTARTRE, H.H., HARRIS, M.M., OLIVE, D et COLLETTE, Y. 1998. The human immunodeficiency virus type 1 Nef protein binds the Src-related tyrosine kinase Lck SH2 domain through a novel phosphotyrosine independent mechanism. *Virology* **247**, 200-211.

EARL, P.L., DOMS, R.W et MOSS, B. 1990. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **87**, 648-652.

EDINGER, A.L., HOFFMAN, T.L., SHARRON, M., LEE, B., O'DOWD, B et DOMS, R.W. 1998a. Use of GPR1, GPR15, and STRL33 as coreceptors by diverse human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus envelope proteins. *Virology* **249**, 367-378.

EDINGER, A.L., HOFFMAN, T.L., SHARRON, M., LEE, B., YI, Y., CHOE, W., KOLSON, D.L., MITROVIC, B., ZHOU, Y., FAULDS, D., COLLMAN, R.G., HESSELGESSER, J., HORUK, R et DOMS, R.W. 1998b. An orphan seven-transmembrane domain functions as a receptor for human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol.* **72**, 7934-7940.

EMBRETSON, J., ZUPANCIC, M., RIBAS, J.L., BURKE, A., RACZ, P., TENNER-RACZ, K et HAASE, A.T. 1993. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV-1 during the incubation period of AIDS. *Nature* **362**, 359-362.

FACKLER, O.T., KIENZLE, N., KREMMER, E., BOESE, A., SCHRAMM, B., KLIMKAIT, T., KUCHERER, C et MUELLER-LANTZSCH, N. 1997. Association of

human immunodeficiency virus Nef protein with actin is myristoylation dependent and influences its subcellular localization. *Eur J Biochem.* **247**, 843-851.

FACKLER, O.T., LUO, W., GEYER, M., ALBERTS, A.S et PETERLIN, B.M. 1999. Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effectors functions. *Mol Cell.* **3**, 729-739.

FANTINI, J., COOK, D.G., NATHANSON, N., SPITALNIK, S.L et GONZALEZ-SCARANO, F. 1993. Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* **90**, 2700-2704.

FARNET, C.M et HASELTINE, W.A. 1991. Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J Virol.* **65**, 1910-1915.

FARZAN, M., CHOE, H., MARTIN, K., MARCON, L., HOFMANN, W., KARLSSON, G., SUN, Y., BARRET, P., MARCHAND, N., SULLIVAN, N., GERARD, N., GERARD, C et SODROSKI, J. 1997. Two orphan seven-transmembrane segment receptors with are expressed in CD4-positive cells support simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med.* **186**, 406-411.

FARZAN, M., MIRZABEKOV, T., KOLCHINSKY, P., WYATT, R., CAYABYAB, M., GERARD, N.P., GERARD, C., SODROSKI, J et CHOE, H. 1999. Tyrosine sulfation of the amino terminus facilitates HIV-1 entry. *Cell* **96**, 667-676.

FENG, Y., BRODER, C.C., KENNEDY, P.E et BERGER E.A. 1996. HIV-1 entry co-factor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877.

FIELDS, B.N., KNIPE, D.M et HOWLEY, P.M. 1996. *Virology*, vol 2. 3<sup>rd</sup> ed Lippincott-Raven Publishers, New-York.

FISHER, A.G., ENSOLI, B., IVANOFF, I., CHAMBERLIN, M., PETTEWAY, S., RATNER, L., GALLO, R.C et WONG-STALL, F. 1987. The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science* **237**, 888-893.

FOTI, M., CARTIER, L., PIGUET, V., LEW, D.P., CARPENTIER, J.L., TRONO, D et KRAUSE, K.H. 1999. The HIV nef protein alters Ca(2+) signalling in myelomonocytic cells through SH3-mediated protein-protein interactions. *J Biol Chem.* **274**, 34765-34772.

FOTI, M., MANGASARIAN, A., PIGUET, V., LEW, D.P., KRAUSE, K.H., TRONO, D et CARPENTIER, J.L. 1997. Nef-mediated Clathrin-coated Pit Formation. *J Cell Biol.* **139**, 37-47.

- FREED, E.O., MYERS, D.J et RISSER, R. 1990. Characterization of the fusion domain of the immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 41. *Proc Natl Acad Sci. USA* **87**, 4650-4654.
- FRIEDLAND, G.H., SALTZMAN, B.R., ROGERS, M.F. et al. 1986. Lack of transmission of HTLV-II/LAAV infection to household contacts of patients with AIDS or AIDS-related complex with oral candidiasis. *N Engl J Med.* **314**, 344-349.
- FUJII, Y., NISHINO, Y., NAKAJA, T., TOKUNAGA, K et IKUTA, K. 1993. Expression of human immunodeficiency virus type 1 nef antigen on the surface of acutely and persistently infected human T cells. *Vaccine* **11**, 1240-46.
- GALLAHER, W.R. 1987. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* **50**, 327-328.
- GALLO, R.C., SALAHUDDIN, S.Z., POPOVIC, M. et al. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503.
- GAO, F., YUE, L., ROBERTSON, D.L., HILL, S.C., HUI, H., BIGGAR, R.J., NEEQUAYE, A.E., WHELAN, T.M., HO, D.D., SHAW, G.M., SHARP, P.M et HAHN, B.H. 1994. Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J Virol.* **68**, 7433-7447.
- GARCIA, J.V et MILLER, A.D. 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* **350**, 508-511.
- GARTNER, S., MARKOVITS, P., MARKOVITZ, D.M., KAPLAN, M.H., GALLO, R.C et POPOVIC, M. 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* **233**, 215-219.
- GARRET, E.D., TILEY, L.S et CULLEN, B.R. 1991. Rev activates expression of the human immunodeficiency virus type 1 *vif* and *vpr* gene products. *J Virol.* **65**, 1653-1657.
- GELDERBLUM, H.R. 1991. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* **5**, 617-638.
- GIBBS, J.S., REGIER, D.A et DESROSIERS, R.C. 1994. Construction and in vitro properties of HIV-1 mutants with deletions in **non essential** genes. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**, 343-350.
- GLUSHAKOVA, S., GRIVEL, J.C., SURYANARAYAMA, K., MEYLAN, P., LIFSON, J.D., DESROSIERS, R et MARGOLIS, L. 1999. Nef enhances human immunodeficiency virus replication and responsiveness to interleukin-2 in human lymphoid tissue ex vivo. *J virol.* **73**, 3968-74.



GOLDSMITH, M.A., WARMERDAM, R.E., ATCHISON, R.E., MILLER, M.D et GREENE, W.C. 1995. Dissociation of the downregulation and viral infectivity enhancement function of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J Virol.* **69**, 4112-4121.

GONCALVES, J., JALLEPALLI, P et GABUZDA, D.H. 1994. Subcellular localization of the vif protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **68**, 704-712.

GONDA, M.A, WONG-STALL, F., GALLO, R.C., CLEMENTS, J.E., NARAYANAN, O et GILDEN, R.V. 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* **227**, 173-177.

GONZALEZ-SCRANO, F., WAXHAM, M.N., ROSS, A.M et HOXIE, J.A. 1987. Sequence similarities between human immunodeficiency virus gp41 and paramyxovirus fusion proteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* **3**, 245-242.

GORDON, L.M., CURTAIN, C.C., ZHONG, Y.C., KIRKPATRICK, A., MOBLEY, P.W. et WARING, A.J. 1992. The amino-terminal peptide of HIV-1 glycoprotein41 interacts with human erythrocyte membranes: Peptide conformation, orientation and aggregation. *Biochim Biophys Acta* **1139**, 257-274.

GORMY, M.K., XU, J.Y., GIANAKAKOS, S., *et al.* 1991. Production of site-selected neutralizing human monoclonal antibodies against the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci. USA* **88**, 3238-3242.

GOTTLIEB, M.S., SCHROFF, R., SCHANKER, H.M., WEISMAN, J.D., FAN, P.T., WOLF, R.A et 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**, 1425-1431.

GRATTON, S., YAO, X.J., VENKATESAN, S., COHEN, E.A et SEKALY, R.P. 1996. Molecular analysis of the cytoplasmic domain of CD4 overlapping but noncompetitive requirement for lck association and down-regulation by Nef. *J Immunol.* **157**, 3305-3311.

GRAZIANI, A., GALIMI, F., MEDICO, E., COTTONE, E., GRAMIAGLIA, D., BOCCACCIO, C et COMOGLIO, P.M. 1996. The HIV-1 nef protein interferes with phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Biol Chem.* **271**, 6590-6593.

GREENBERG, M.E., BRONSON, S., LOCK, M., NEUMANN, M., PAVLAKIS, G.N et SKOWRONSKI, J. 1997. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J.* **16**, 6964-6976.

GREENBERG, M.E., DETULLEO, L., RAPOPORT, I., SKOWRONSKI, J et KIRCHHAUSEN, T. 1998. A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr Biol.* **8**, 1239-1242.

GREENBERG, M.E., IAFRATE, A.J et SKOWRONSKI, J. 1998. The SH3 domain-binding surface and an acidic motif in HIV-1 Nef regulate trafficking of class I MHC complexes. *EMBO J.* **17**, 2777-2789.

GREENE, W.C. 1991. The molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Eng J Med.* **324**, 308-317.

GREENWAY, A., AZAD, A et MCPHEE, D. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds directly to I $\kappa$ k and mitogen-activated protein kinase, inhibiting kinase activity. *J Virol.* **70**, 6701-6708.

GREENWAY, A., AZAD, A et MCPHEE, D. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein inhibits activation pathways in peripheral blood mononuclear cells and T-cell lines. *J Virol.* **69**, 1842-1850.

GREEWAY, A.L., HOLLOWAY, G et MCPHEE, DA. 2000. HIV-1 Nef: a critical factor in viral-induced pathogenesis. *Adv Pharmacol* **48**, 299-343.

GRZESIEK, S., STAHL, S.J., WINGFIELD, P.T et BAX, A. 1996. The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* **35**, 10256-10261.

GUYADER, M., EMERMAN, M., MONTAGNIER, L et PEDEN, K. 1989. Vpx mutants of HIV-2 are infectious in established cells line but display a severe defect in peripheral blood lymphocytes. *EMBO J.* **8**, 1169-1175.

GUY, B., KIENY, M.P., RIVIERE, Y., LE PEUCH, C., DOTT, K., GIRARD, M., MONTAGNIER, L et LECOQ, J.P. 1987. HIV F/3' *orf* encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature* **330**, 266-269.

GUY, B., RIVIERE, Y., DOTT, K., REGNAULT, A et KIENY, M.P. 1990. Mutational analysis of the HIV nef protein. *Virology* **176**, 413.

HAMMES, S.R., DIXON, E.P., MALIM, M.H., CULLEN, B.R et GREENE, W.C. 1989. Nef protein of human immunodeficiency virus type 1: Evidence against its role as a transcriptional inhibitor. *Proc Natl Acad Sci. USA* **86**, 9549-9553.

HARROUSE, J.M., BAHT, S., SPITALNIK, S.L., LAUGHLIN, M., STEFANO, K., SILBERBERG, D.H et GONZALEZ-SCARANO, F. 1991. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* **253**, 320-323.

HENDERSON, L.E., BOWERS, M.A., SOWDER, R.C., SERABYN, S.A., JOHSON, D.G., BESS, J.W., ARTHUR, L.O., BRYANT, D.K et FENSELAU, C. 1992. Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: post-translational modifications, proteolytic processing, and complete amino acid sequences. *J Virol.* **66**, 1856-1865.

HENDERSON, L.E, SOWDER, R.C., COPELAND, T.D., BENVENISTE, R.E et OROSZLAN, S. 1988. Isolation and characterization of a novel protein (X-ORF product) from SIV and HIV-2. *Science* **241**, 199-201.

HO, D.D., BYINGTON, R.E., SCHOOLEY, R.T., FLYNN, K., ROTA, T.R et HIRSCH, M.S. 1985a. Infrequency of isolation of HTLV-III virus from saliva in AIDS. *N Engl J Med.* **313**, 1606.

HO, D.D., ROTA, T.R et HIRSCH, M.S. 1986. Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III. *J Clin Invest.* **77**, 1712-1715.

HO, D.D., SARNGADDHARAN, M.G., RESNICK, L., DIMARZO-VERONESE, F., ROTA, T.R et HIRSCH, M.S. 1985b. Primary human T-lymphotropic virus type III infection. *Ann Intern Med.* **130**, 880-883.

HODGE, D.R., DUNN, K.J., PEI, G.K., CHAKRABARTY, M.K., HEIDECKER, G., LAUTENBERGER, J.A et SAMUEL, K.P. 1998. Binding of c-Raf1 kinase to a conserved acidic sequence within the carboxyl-terminal region of the HIV-1 Nef protein. *J Biol Chem.* **273**, 15727-15733.

HODGE, S., NOVEMBRE, F.J., WHETTER, L., GELBARD, H.A et DEWHURST, S. 1998. Induction of fas ligand expression by an acutely lethal simian immunodeficiency virus, SIVsmmPBj14. *Virology* **252**, 354-363.

HOPE, T.J., HUANG, X.J., McDONALD, D et PARSLow, T.G. 1990. Steroid-receptor fusion of the human immunodeficiency virus type 1 rev transactivator: essential residues near the amino terminus. *J Virol.* **64**, 5360-5366.

HORUK, R., HESSELGESSER, J., ZHOU, Y., FAULDS, D., HALKS-MILLERT, M., HARVEY, S., TAUB, D., SAMSON, M., PARMENTIER, M., RUCKER, J., DORANZ, B.J et DOMS, R.W. 1998. The CC chemokine I-309 inhibits CCR8-dependent infection by diverse HIV-strains. *J Biol Chem.* **273**, 386-391.

HOWE, A.Y.M., JUNG, J.U et DESROSIERS, R.C. 1998. Zeta chain of the T-cell receptor interacts with nef of simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 2. *J Virol.* **72**, 9827-9834.

HOXIE, J.A., FLAHERTY, L.E., HAGGARTY, B.S et RACKOWSKI, J.L. 1986. Infection of t4 lymphocytes by HTLV-III does not require expression of the OKT4 epitope. *J Immunol.* **136**, 361-363.

HUA, J et CULLEN, B.R. 1997. Human immunodeficiency virus types 1 and 2 and simian immunodeficiency virus Nef use distinct but overlapping target sites for downregulation of cell surface CD4. *J Virol.* **71**, 6742-6748.

- HUNTER, E. 1994. Macromolecular interactions in the assembly of HIV and other retroviruses. *Sem Virol.* **5**,71-83.
- IAFRATE, A.J., BRONSON, S et SKOWRONSKI, J. 1997. Separable functions of Nef disrupt two aspects of T cell receptor machinery: CD4 expression and CD3 signaling. *EMBO J.* **16**, 673-684.
- JACKS, T., POWER, M.D., MASIARZ, F.R., LUCIW, P., BARR, P.J et VARMUS, H.E. 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**, 280-283.
- JAFFE, H.W et SCHOCHETMAN, G. 1998. Group O human immunodeficiency virus-1 infections. *Infect Dis Clin North Am.* **12**, 39-46.
- JINNO, A., SHIMIZU, N., SODA, Y., HARAGUCHI, Y., KITAMURA, T et HOSHINO, H. 1998. Identification of the chemokine receptor TER1/CCR8 expressed in brain-derived cells and T cells as a new coreceptor for HIV-1 infection. *Biochem Biophys Research Commun.* **243**, 497-502.
- JONES, K.A et PETERLIN, B.M. 1994. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem.* **63**, 717-743.
- JONES, W.K et CURRAN, J.W. 1994. Epidemiology of AIDS and HIV infection in industrialized countries. In: BORDER, S., MERIGAN, T.C., BOLOGNESI, D. Eds. Textbook of AIDS medicine. Baltimore: Williams et Wilkins; 91-108.
- KAGI, D., LEDERMAN, D., BURKI, K., ZINKERNAGEL, R.M et HENGARTNER, H. 1996. Molecular mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol.* **14**, 207-232.
- KAN, N.C., FRANCHINI, G., WONG-STAAAL, F., DUBOIS, G.C., ROBEY, W.G., LAUTENBERGER, J.A et PAPAS, T.S. 1986. Identification of HTLV-III/LAV sor gene product and deletion of antibodies in human sera. *Science* **231**, 1553-1555.
- KAPPES, J.C., CONWAY, J.A., LEE, S.W., SHAW, G.M et HAHN, B.H. 1991. Human immunodeficiency virus type 2 vpx protein augments viral infectivity. *Virology* **184**, 197-209.
- KAPPES, J.C., MORROW, C.D., LEE, S-W., JAMESON, B.A., KENT, S.B., HOOD, L.E., SHAW, G.M et HAHN, B.H. 1988. Identification of a novel retroviral gene unique to human immunodeficiency type 2 and simian immunodeficiency virus SIVmac. *J Virol.* **62**, 3501-3505.
- KASIBHATLA, S.S., GENESTIER, L et GREEN, D.R. 1999. Regulation of fas-ligand expression during activation-induced cell death in T lymphocytes via nuclear factor kappaB. *J Biol Chem.* **274**, 987-992.

KESTLER, H.W., RINGLER, D.J., MORI, K., PANICALI, D.L., SEHGAL, P.K., DANIEL, M.D et DESROSIERS, R.C. 1991. Importance of the *nef* gene for maintenance of a high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**, 651-662.

KIM, S., CHANG, Y.H., KWON, J.H et RHEE, S.S. 1999. HIV-1 Nef Plays an Essential Role in Two Independent Processes in CD4 Down-regulation: Dissociation of the CD4-p56lck Complex and Targeting of CD4 to Lysosomes. *Virology* **257**, 208-219.

KIM, S., IKEUCHI, K., BYRN, R., GROOPMAN, J et BALTIMORE, D. 1989. Lack of a negative influence on viral growth by the *nef* gene of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci. USA* **86**, 9544-9548.

KIRCHOFF, F., GREENOUGH, R.C., BRETTLER, D.B., SULLIVAN, J.L et DESROSIERS, R.C. 1995. Absence of intact *nef* sequences in a long-term survivor with non progressive HIV-1 infection. *New Engl J Med.* **332**, 228-232.

KLIMKAIT, T., STREBEL, K., HOGGAN, M.D., MARTIN, M.A et ORENSTEIN, J.M. 1990. The human immunodeficiency virus type 1 specific protein vpu is required human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol.* **64**, 621-629.

KOEDER, U., KOHLEISEN, B., SPORER, B., LAHRTZ, F., OVOD, V., FONTANA, A., ERFLE, V et PFISTER, H.W. 1999. HIV type 1 Nef protein is a viral factor for leukocyte recruitment into the central nervous system. *J Immunol.* **163**, 1237-45.

KOHL, N.E., EMINI, E.A., SCHELIEF, W.A., DAVIS, L.J., HEIMBACH, J.C., DIXON, R.A., SCOLNICK, E.M et SIGAL, I.S. 1988. Active human immunodeficiency virus protease required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci. USA* **85**, 4686-4690.

KOHLEINSEN, B., SHUMAY, E., SUTTER, G., FOERSTER, R., BRACK-WERNER, R., NUESSE, M et ERFLE, V. 1999. Stable expression of HIV-1 Nef induces changes in growth properties and activation state of human astrocytes. *AIDS* **13**, 2331-41.

KOTOV, A., ZHOU, J., FLICKER, P et AIKEN, C. 1999. Association of Nef with the human immunodeficiency virus type 1 core. *J Virol.* **73**, 8824-8830.

KAWALSKI, A., BERGERON, L., DORFMAN T., HASELTINE, W et SODROSKI, J. 1991. Attenuation of human immunodeficiency virus type 1 cytopathic effect by a mutation affecting the transmembrane envelope glycoprotein. *J Virol.* **65**, 281-291

KOWALSKI, M., POTZ, J., BASIRIPOUR, L., DORFMAN T., GOH, W.C, TERWILLIGER, E., DAYTON, A., ROSEN, C., HASELTINE, W et SODROSKI, J. 1987. Functional region of the envelope protein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* **237**, 1351-1355.

- LAMA, J., MANGASARIAN, A et TRONO, D. 1999. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking env incorporation in a nef- and vpu inhibitable manner. *Curr Biol.* **9**, 622-631.
- LASKY, L.A., NAKAMURA, G., SMITH, D.H., FENNY, C., SHIMASAKI, C., PATZER, E., BERMAN, P., GREGORY, T et CAPON, D.J. 1987. Delineation of the region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with CD4 receptor. *Cell* **50**, 975-985.
- LAURENT-CRAWFORD, A.G., KRUST, B., RIVIERE, Y., DESGRANGES, C., MULLER, S., KIENY, M., DAUGUET, C et HOVANESSIAN, A.G. 1993. Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 761-773.
- LEARMONT, J.C., GECZY, A.F., MILLS, J., ASHTON, L.J., RAYNES-GREENOW, C.H., GARSIA, R.J., DYER, W.B., MCINTYRE, L., OELRICHS, R.B., RHODES, D.I., DEACON, N.J et SULLIVAN, J.S. 1999. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med.* **340**, 1715-22.
- LEARMONT, J.C., TINDALL, B., EVANS, L., CUNNINGHAM, A., CUNNINGHAM, P., WELLS, J., PENNY, R., KALDOR, J et COOPER, D.A. 1992. Long-term symptom less HIV-1 infection in recipients of blood products from a single donor. *Lancet* **340**, 863-867.
- LEE, C.H., LEUNG, B., LEMMON, M.A., ZHENG, J., COWBURN, D., KURIYAN, J et SAKSELA, K. 1995. A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *EMBO J.* **14**, 5006-5015.
- LETVIN, N.L., DANIEL, M.D., SEHGAL, P.K., DESROSIERS, R.C., HUNT, R.D., WALDRON, L.M., MACKEY, J.J., SCHMIDT, D.K., CHALIFOUX, L.V et KING, N.W. 1985. Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science* **230**, 71-73.
- LEVY, J. 1993. HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS* **7**, 1401-1410.
- LEVY, J.A. 1994. HIV and AIDS pathogenesis. Washington, DC: ASM Press. 359.
- LEVY, J.A. 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev.* **57**, 183-289.
- LEVY, J.A., HOFFMAN, A.D., KRAMER, S.M., LANDIS, J.A., SHIMABUKURO, J.M et OSHIRO, L.S. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**, 840-842.

- LI, C.J., FRIEDMAN, D.J., WANG, C., METELEV, V et PARDEE, A.B. 1995. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 tat protein. *Science* **268**, 429-431.
- LI, X.L., MOUDGIL, T., VINTERS, H.V et HO, D.D. 1990. CD4-independent, productive infection of neuronal cell line by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **64**, 1383-1387
- LIAO, F., ALKHATIB, G., PEDEN, K.W.C., SHARMA, G., BERGER, E.A et FARBER, J.M. 1997. STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J Exp Med.* **185**, 2015-2023.
- LILLEHOJ, E.P., SALAZAR, F.H., MERVIS, R.J., RAUM, M.G., CHAN, H.W., AHMAD, N et VENKATESAN, S. 1988. Purification and structural characterization of the putative gag-pol protease of human immunodeficiency virus. *J Virol.* **62**, 3053-3058.
- LINIAL, M.L et MILLER, A.D. 1990. Retroviral RNA packaging: sequence requirements and implications. *Curr Top Microbiol Immunol.* **157**, 125-152.
- LIU, X.L., MARGOTTIN, F., LE GALL, S., SCHWARTZ, O., SELIG, L., BENAROUS, R et BENICHOUS, S. 1997. Building of HIV-1 Nef to a novel thioesterase enzyme correlates with Nef-mediated CD4 downregulation. *J Biol Chem.* **272**, 13779-13785.
- LIU, Z.Q., WOOD, C., LEVY, J.A et CHENG-MAYER, C. 1990. The viral envelope gene is involved in macrophage tropism of a human immunodeficiency virus type 1 strain isolated from brain tissue. *J Virol.* **64**, 6148-6153
- LITTMAN, D.R. 1996. The CD4 molecule. Roles in T lymphocytes and HIV disease. Introduction. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **205**, 5-10.
- LONG, D., BERSON, J.F., COOK, D.G et DOMS, R.W. 1994. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 gp120 binding to liposomes containing galactosyl ceramide. *J Virol.* **68**, 5890-5898.
- LU, X., YU, H., LIU, S.H., BRODSKY, F.M et PETERLIN, B.M. 1998. Interactions between HIV1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4. *Immunity* **8**, 647-656.
- LU, X., WU, X., PLEMENITAS, A., YU, H., SAWAI, E.T., ABO, A et PETERLIN, B.M. 1996. CDC42 and Rac1 are implicated in the activation of the Nef-associated kinase and replication of HIV-1. *Curr Biol.* **6**, 1677-1684.

- LU, Y.Y., KOGA, Y., TANAKA, K., SASAKI, M., KIMURA, G et NOMOTO, K. 1994. Apoptosis induced in CD4+ cells expressing gp160 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **68**, 390-399.
- LUBAN, J et GOFF, S.P. 1994. Mutational analysis of cis-acting packaging signals in human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Virol.* **68**, 3784-3793.
- LUCIW, P.A., CHENG-MAYER, C et LEVY, J.A. 1987. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus. The orf-b region down-regulates virus replication. *Proc Natl Acad Sci. USA* **84**, 1434-1438.
- LIU, Z-Q., WOOD, C., LEVY, J.A et CHENG-MAYER, C. 1990. The envelope gene is involved in macrophage tropism of a human immunodeficiency virus type 1 strain isolated from brain tissue. *J Virol.* **64**, 6148-6153.
- MANGASARIAN, A., FOTI, M., AIKEN, C., CHIN, D., CARPENTIER, J.L et TRONO, D. 1997. The HIV-1 Nef protein acts as a connector with sorting pathways in the Golgi and at the plasma membrane. *Immunity* **6**, 67-77.
- MANGASARIAN, A., PIGUET, V., WANG, J.K., CHEN, Y.L et TRONO, D. 1999. Nef-induced CD4 and major histocompatibility complex class I (MHC-I) down-regulation are governed by distinct determinants: N-terminal alpha helix and proline repeat of Nef selectively regulate MHC-I trafficking. *J Virol.* **73**, 1964-1973.
- MARIANI, R et SKOWRONSKI, J. 1993. CD4 down-regulation by *nef* alleles isolated from human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **90**, 5549-5553.
- McCUNE, J.M. 1991. HIV-1 : the infective process *in vivo* . *Cell* **64**, 351-363.
- McDOUGAL, J.J., KENNEDY, M.A., SLIGH, J.M., CORT, S.P., NAWLE, A et NICHOLSON, J.K.A. 1986. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* **231**, 382-385.
- MERVIS, R.J., AHMAD, N., LILLEHOJ, E.P., RAUM, M.G., SALAZAR, F.H., CHAN, H.W et VENKATESAR, S. 1988. The gag gene products of human immunodeficiency virus type 1: alignment within the gag reading frame, identification of post-translational modifications, and evidence of alternative gag precursors. *J Virol.* **62**, 3993-4002.
- MILLER, M.D., WARMERDAM, M.T., FERRELL, S.S., BENITEZ, R et GREENE, W.C. 1997. Intravirion generation of the C-terminal core domain of HIV-1 Nef by the HIV-1 protease is insufficient to enhance viral infectivity. *Virology* **234**, 215-225.
- MILLER, M.D., WARMERDAM, M.T., GASTON, I., GREENE, W.C et FEINBERG, M.B. 1994. The human immunodeficiency virus-1 *nef* gene product: a positive factor for



viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med.* **179**, 101-113.

MILLER, M.D., WARMERDAM, M.T., PAGE, K.A., FEINBERG, M.B et GREENE, W.C. 1995. Expression of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) *nef* gene during HIV-1 production increases progeny particle infectivity independently of gp160 or viral entry. *J Virol.* **69**, 579-584.

MOAREFI, I., LAFEVRE-BERNT, M., SICHERI, F., HUSE, M., LEE, C.H., KURIYAN, J et MILLER, W.T. 1997. Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* **385**, 650-653.

MOBLEY, P.W., CURTAIN, C.C., KIRKPATRICK, A., ROSTAMKHANI, M., WARING, A.J et GORDON, L.M. 1992. The amino-terminal peptide of HIV-1 glycoprotein 41 lyses human erythrocytes and CD4+ lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* **1130**, 251-256

MONDOR, I., UGOLINI, S et SATTENTAU, Q.J. 1998. HIV-1 attachment to HeLa CD4 cells is CD4-independent, gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J Virol.* **72**, 3623-3634.

MONTAGNIER, L., CHERMANN, J.C., BARRE-SINOUSI, F., CHAMARET, S., GRUEST, J., NUGEYRE, M.T., REY, F., DAUGET, C., AXLER-BLIN, C., VEZINET-BRUN, F., ROUZIOUX, C., SAIMOT, A.G., ROZENBAUM, W., GLUCKAN, J.C., KLATZMANN, D., VILMER, E., GRISELLI, C., GAZENGEL, C et BRUNET, J.B. 1984a. A new human T-lymphotropic retrovirus: characterization and possible role in lymphadenopathy and acquired immune deficiency syndromes. 363-379. Dans : Gallo, R.C., Essex, M.E., Gross, L. Eds. Human T-cell leukemia/lymphoma virus, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

MONTAGNIER, L, GRUEST, J., CHAMARET, S et al. 1984b. Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines. *Science* **225**, 63-66.

MOURICH, D.V., LEE, S., REYES-TERAN, G., MACKEEWICZ, C.E et LEVY, J.A. 1999. Lack of differences in *nef* alleles among HIV-infected asymptomatic long term survivors and those who progressed to disease. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**, 1573-5.

MURPHY, F.A., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L., GHABRIAL, S.A., JARVIS, A.W., MARTELLI, G.P., MAYO, M.A et SUMMERS, M.D. 1995. Eds. Virus Taxonomy. Sixth report of the international Committee on taxonomy of viruses. Springer-Verlag, Wien, New-York.

MYERS, G. 1994. HIV : between past and future. *Aids Res Hum Retroviruses* **10**, 1317-1324.

- MYERS, G et PAVLAKIS, G.N. 1992. Evolutionary potential of complex retroviruses. Dans: LEVY, J.A. *ed.* 1992. The retroviridae. New York : Plenum Press: 51-105.
- NELSON, J.A., REYNOLDS-KOHLER, C., MAARGARETTEN, W., WILEY, C.A., REESE, C.E et LEVY, J.A. 1988. Human immunodeficiency virus detected in bowel epithelium from patients with gastrointestinal symptoms. *Lancet* **1**, 259-262.
- NIEDERMAN, T.M.J., YHIELAN, B.J et RATNER., L. 1989. Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer. *Proc Natl Acad Sci. USA* **86**, 1128-1132.
- NIEDERMAN, T.M.J., RANDALL-HAASTINGS, W et RATNER, L. 1993. Myristoylation-enhanced-binding of the HIV-1 nef protein to T cell skeletal matrix. *Virology* **197**, 420-425.
- NIU, M.T., STEIN, D.S et SCHNITTMAN, S.M. 1993. Primary human immunodeficiency virus type 1 infection: review of pathogenesis and early treatment intervention in human and animal retrovirus models. *J Infect Dis.* **168**, 1490-1501.
- NUNN, M.F et MARSH, J.W. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a member of the p21-activated kinase family. *J Virol.* **70**, 6157-6161.
- O'BRIEN, W.A., KOYANGI, Y., NAMAZIE, A. et al. 1990. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions outside the CD4-binding domain. *Nature* **348**, 69-73.
- OLDRIDGE, J et MARSH, M. 1998. Nef an adaptor? Trends. *Cell Biol.* **8**, 302-305.
- ONUSIDA. 2000. Communiqué de presse: Le point sur l'épidémie du SIDA. ONUSIDA/OMS (décembre 2000)
- OTAKE, K., OHTA, M., MINOWADA, J., HATAMA, S., TAKAHASHI, E., IKEMOTO, A., OKUYAMA, H et FUJII, Y. 2000. Extracellular Nef of HIV-1 can target CD4 memory T population. *AIDS* **14**, 1662-1664.
- OZEL, M., PAULI, G et GELDERBLOM, H.R. 1988. The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch Virol.* **100**, 255-266.
- PANDORI, M., CRAIG, H., MOUTOUH, L., CORBEIL, J et GUATELLI, J. 1998. Virological importance of the protease cleavage site in human immunodeficiency virus type 1 nef is independent of both intravirion processing and CD4 down-regulation. *Virology* **251**, 302-316.
- PANDORI, M.W., FITCH, N.J., CRAIG, H.M., RICHMAN, D.D., SPINA, C.A et GUATELLI, J.C. 1996. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J Virol.* **70**, 4283-4290.

PANTALEO, G., GRAZIOSI, C., DEMAREST, J.F., COHEN, O.J., VACCAREZZA, M., GANTT, K., MURO-CACHO, C et FAUCI, A.S. 1994. Role of lymphoid organs in pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunological Reviews* **140**, 105-130.

PARSLOW, T.G. 1993. post-transcriptionnel regulation of human retroviral gene expression. Dans: Cullen B.R., ed. Human retroviruses. Oxford : IRL, Press, 101-136.

PETER, F. 1998. HIV Nef: The Mother of All Evil ? . Minireview. *Immunity* **9**, 433-437.

PETERLIN, B.M., ADAMS, M., ALONSO, A., BAUR, A., GHOSH, S., LU, X et LUO, L. 1993. Tat trans-activator. In : Cullen BR, ed. Human Retroviruses. Oxford: IRL Press, 75-100.

PIGET, V., CHEN, Y.L., MANGASARIAN, A., FOTI, M., CARPENTIER, J.L et TRONO, D. 1998. Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. *EMBO J.* **17**, 2472-2481.

PUGLIESE, A., CANTAMESSA, C., SAINI, A., PIRAGINO, A., GENNERO, L., MARTINI, C et TORRE, D. 1999. Effects of the exogenous Nef protein on HIV-1 target cells. *Cell Biochem Funct.* **17**, 183-92.

QUARANTA, M.G., CAMPONESCHI, B., STRAFACE, E., MALORNI, W et VIORA, M. 1999. Induction of interleukin-15 production by HIV-1 nef protein : a role in the proliferation of uninfected cells. *Exp Cell Res.* **250**, 112-21.

QUINN, T.C. 1994. Population migration and the spread of types 1 and 2 human immunodeficiency viruses. *Proc Natl Acad Sci. USA* **91**, 2407-2414.

RABSON, A.B et MARTIN, M.A. 1985. Molecular organization of the AIDS retrovirus. *Cell* **40**, 477-480.

RAGNI, M.V et KINGSLEY, L.A. 1990. Cumulative risk for AIDS and other HIV outcomes in a cohort of hemophiliacs in western Pennsylvania. *J Acquir Immune Defc Syndr.* **3**, 708-713.

REEVES, J.D., MCKNIGHT, A., POTEPA, S., SIMMONS, G., GRAY, P.W., POWER, C.A., WELLS, T., WEISS, R.A et TALBOT, S.J. 1997. CD4-independent infection by HIV-2 (ROD/B): Use of the 7-transmembrane receptors CXCR-4, CCR-3, and V28 for entry. *Virology* **231**, 130-134.

REN, R., MAYER, B.J., CICCHETTI, P et BALTIMORE, D. 1993. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* **259**, 1157-1161.

RENKEMA, G.H., MANNINEN, A., MANN, D.A., HARRIS, M et SAKSELA, K. 1999. Identification of the Nef-associated kinase as p21-activated kinase 2. *Curr Biol.* **9**, 1407-1410.

RENKEMA, H.G et SAKSELA, K. 2000. Interactions of HIV-1 NEF with cellular signal transducing proteins. *FrontBiosci* **5**, D268-D283.

RHEE, S.S et MARSH, J.W. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down-modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4. *J Virol.* **68**, 5156-5163.

RODERIQUEZ, G., ORAVECZ, T., YANAGISHITA, M., BOU-HABIB, D.C, MOSTOWSKI, H et NORCROSS, M.A. 1995. Mediation of human immunodeficiency virus type 1 binding by interaction of the cell surface heparin sulfate proteoglycans with the V3 region of envelope gp120-gp41. *J Virol* **69**, 2233-2239.

ROSS, T.M., ORAN, A.E et CULLEN, B.R. 1999. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral nef protein. *Curr Biol.* **9**, 613-621.

ROSSI, F., GALLINA, A et MILANESI, G. 1996. Nef-CD4 physical interaction sensed with the yeast two-hybrid system. *Virology* **217**, 397-403.

RUCKER, J., EDINGER, A.L., SHARRON, M., SAMSON, M., LEE, B., BERSON, J.F., YI, Y., MARGULIES, B., COLLMAN, R.G., DORANZ, B.J., PARMENTIER, M et DOMS, R.W. 1997. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus -encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol.* **71**, 8999-2007.

RUTHERFORD, G.W., LIFSON, A.R., HESSOL, N.A et al. 1990. Course of HIV infection in a cohort of homosexual and bisexual men : an 11 year follow-up study. *BMJ.* **301**, 1183-1188.

SAKSELA, K., CHENG, G et BALTIMORE, D. 1995. Proline-rich PxxP motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for downregulation of CD4. *EMBO J.* **14**, 484-491.

SALAHUDDIN, S.Z., ROSE, R.M., GROOPMAN, J.E., MARKHAM, P.D et GALLO, R.C. 1986. Human T-lymphotropic virus type III infection of human alveolar macrophages. *Blood* **68**, 281-284.

SALGHETTI, S., MARIANI, R et SKOWRONSKI, J. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef and p56lck protein-tyrosine kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **92**, 349-353.

SAMSON, M., EDINGER, A.L., STORDEUR, P., RUCKER, J., VERHASSELT, V., SHARRON, M., GOVAERTS, C., MOLLEREAU, C., VASSART, G., DOMS, R.W et PARMETIER, M. 1998. ChemR23, a putative chemoattractant receptor, is expressed in

monocyte-derived dendritic cells and macrophages and is a receptor for SIV and primary HIV-1 strains. *Euro J Immunol.* **28**, 1689-1700.

SANCHEZ-PESCADOR, R., POWER, M.D., BARR, P.J., STEIMER, K.S., STEMPIEN, M.M., BROWN-SHIMER, S.L., GEE, W.W., RENARD, A., RANDOLPH, A., LEVY, J.A et LUCIW, P.A. 1985. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). *Science* **227**, 484-492.

SANFRIDSON, A., CULLEN, B.R et DOYLE, C. 1994. The simian immunodeficiency virus Nef protein promotes degradation of CD4 in human T cells. *J Biol Chem.* **269**, 3917-3920.

SAWAI, E.T., BAUR, A., STRUBLE, H., PETERLIN, B.M., LEVY, J.A et CHENG-MAYER, C. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a cellular serine kinase in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci. USA* **91**, 1539-1543.

SAWAI, E.T., CHENG-MAYER, C et LUCIW, P.A. 1997. Nef and the Nef-associated kinase. *Res. Virol.* **148**, 47-52.

SAWAI, E.T., KHAN, I.H., MONTBRIAND, P.M., PETERLIN, B.M., CHENG-MAYER, C et LUCIW, P.A. 1996. Activation of PAK by HIV and SIV Nef: importance for AIDS in rhesus macaques. *Curr Biol.* **6**, 1519-1527.

SCHNITTMAN, S.M., PSALLIDOPOULOS, M.C., LANE, H.C., THOMPSON, L., BASELER, M., MASSARI, F., FOX, C.H., SALZMAN, N.P et FAUCI, A.S. 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is the T cell that maintains expression of CD4. *Science* **245**, 305-308.

SCHUITEMAKER, H., KOOTSTRA, N.A., DE GOEDE, R.E., DE WOLF, F., MIEDEMA, F et TERSMETTE, M. 1991. Monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture. *J Virol.* **65**, 356-363.

SCHWARTZ, S., FELBER, B.K et PAVLAKIS, G.N. 1991. Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is rev-dependent and regulated by splicing. *Virology* **183**, 677-686.

SCHWARTZ, O., MARECHAL, V., DANOS, O et HEARD, J.M. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J Virol.* **69**, 4053-4059.

SCHWARTZ, O., MARECHAL, V., LE GALL, S., LEMONNIER, F et HEARD J.M. 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med.* **2**, 338-342.

SHIH, C.C., STOYE, J.P et COFFIN, J.M. 1988. Highly preferred targets for retrovirus integration. *Cell* **53**, 531-537.

SHIMIZU, N., SODA, Y., KANBE, K., LIU, H-Y., JINNO, A., KITAMURA, T et HOSHINO, H. 1999. An orphan G protein-coupled receptor, GPR1, acts as a coreceptor to allow replication of human immunodeficiency virus Types 1 and 2 in brain-derived cells. *J Virol.* **73**, 5321-5339.

SHUGARS, D.C., SMITH, M.S., GLUECK, D.H., NANTERMET, P.V., SEILLIER-MOISEIWITSCH, F et SWANSTROM, R. 1993. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 *nef* gene sequences present in vivo. *J Virol.* **67**, 4639-4650.

SKOLNIK, P.R., KOSLOFF, B.R., BECHTEL, L.J. et al. 1989. Absence of infectious HIV-1 in the urine of seropositive viremic subjects. *J Infect Dis.* **160**, 1056-1060.

SKOWRONSKI, J., PARKS, D et MARIANI, R. 1993. Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 *nef* gene. *EMBO J.* **12**, 703-713.

SLECKMAN, B.P., SHIN, J., IGRAS, V.E., COLLINS, T.L., STROMINGER, J.L et BURAKOFF, S.J. 1992. Disruption of the CD4-p56lck complex is required for rapid internalization of CD4. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**, 7566-7570.

SMITH, B.L., KRUSHELNYCKY, B.W., MOCHLY-ROSEN, D et BERG, P. 1996. The HIV *nef* protein associates with protein kinase C theta. *J Biol Chem.* **271**, 16753-16757.

SODROSKI, J.G., PATARCA, R., ROSEN, C.A et HASELTINE, W.A. 1985. Location of the trans-acting region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* **229**, 74-77.

SPINA, C.A., KWOH, T.J., CHOWERS, M.Y., GUATELLI, J.C et RICHMAN, D.D. 1994. The importance of *nef* in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes. *J Exp Med.* **179**, 115-123.

STEVENS, S.W et GRIFFITH, J.D. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 may preferentially integrate into chromatin occupied by L1Hs repetitive elements. *Proc Nat Acad Sci. USA* **91**, 5557-5561.

STREEL, K., DAUGHERTY, D., COHEN, D., FOLKS, T et MARTIN, M. 1987. The HIV „A,, (sor) gene product is essential for virus infectivity. *Nature* **328**, 728-730.

SUDOL, M. 1993. Nonreceptor protein tyrosine kinases. In: *The Molecular Basis of Human Cancer.* Eds: B. Neel, R. Kumar. Futura Publishing Co, Inc. Mount Kisco, NY. 203-224.

SHUGARS, D.C., SMITH, M.S., GLUECK, D.H., NANTERMET, P.V., SEILLER-MOISEIWITSHCH, F et SWANSTROM, R. 1993. Analysis of human

immunodeficiency virus type 1 *nef* gene sequences present in vivo. *J Virol.* **67**, 4639-4650

SWINGLER, S., GALLAY, P., CAMAUR, D., SONG, J., ABO, A et TRONO, D. 1997. The Nef protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances serine phosphorylation of the viral matrix. *J Virol.* **71**, 4372-4377.

SWINGLER, S., MANN, A., JACQUE, J., BRICHACEK, B., SASSEVILLE, V.G., WILLIAMS, K., LACKNER, A.A., JANOFF, E.N., WANG, R., FISHER, D et STEVENSON, M. 1999. HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat Med.* **5**, 997-103.

TERWILLIGER, E., COHEN, E.A., LU, Y.C., SODROSKI, J.G et HASELTINE, W.A. 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 *vpu*. *Proc Natl Acad Sci. USA* **86**, 5163-5167.

TERWILLIGER, E.F., LANGHOFF, E., GABUZDA, D., ZAZOPOULOS, E et HASELTINE, W.A. 1991. Allelic variation in the effects of the *nef* gene on replication of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci. USA* **88**, 10971-10975.

TERWILLIGER, E., SODROSKI, J.G., ROSEN, C.A et HASELTINE, W.A. 1986. Effects of mutations within the 3' *orf* open reading frame region of human T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) on replication and cytopathogenicity. *J Virol.* **60**, 754-760.

TINDALL, B et COOPER, D.A. 1991. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS*, **5** (8), 1034.

TRISTEM, M., MARSHALL, C., KARPAS, A., PETRIK, J et HILL, F. 1990. Origin of vpx in lentiviruses. *Nature* **347**, 341-342.

TSCHACHLER, E., GROH, V., POPOVIC, M et al. 1987. Epidermal Langerhans cells a target for HTLV-III/LAV infection. *J Invest Dermatol.* **88**, 233-237.

UI, M., KUWATA, T., IGARASHI, T., MIYAZAKI, Y., TAMARU, K., SHIMADA, T., NAKAMURA, M., UESAKA, H., YAMAMOTO, H et HAYAMI, M. 1999. Protective immunity of gene-deleted SHIVs having an HIV-1 Env against challenge infection with a gene-intact SHIV. *J Med Primatol.* **28**, 242-8.

UNGER, R.E., MARTHAS, M.L., PRATT-LOWE, E., PADRID, P.A et LUCIW, P.A. 1992. The *nef* gene of simian immunodeficiency virus SIVmac1A11. *J Virol.* **66**, 5432-5442.

VERONESE, F.D., COPELAND, T.D., DeVICO, A.L., RAHMAN, R., OROSZLAN, S., GALLO, R.C et SARNGAHARAN, M.G. 1986. Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science* **231**, 1289-1291.

VERONESE, F.D., DE VICO, A.L., COPELAND, T.D., OROSZLAN, S., GALLO, R.C et SAMGADHARAN, M.G. 1985. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* **229**, 1402-1405.

WAIN-HOBSON, S., VARTANIAN, J.P., HENRY, M., CHENCINER, N., CHEYNIER, R., DELASSUS, S., MARTINS, L.P., SALA, M., NUGEYRE, M.T et GUETARD, D. 1991. LAV revisited: origins of the early HIV-1 isolates from Institute Pasteur. *Science* **252**, 961-965.

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., SAAG, M.S et SHAW, G.M. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**, 117-122.

WEISS, R.A. 1993. Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retrovirus entry. In: LEVY, J.A. Ed. *The retroviridae*. New York: Plenum Press, 1-108.

WELKER, R., HARRIS, M., CARDEL, B et KRAUSSLICH, H.G. 1998. Virion incorporation of human immunodeficiency virus type 1 nef is mediated by a bipartite membrane-targeting signal: analysis of its role in enhancement of viral infectivity. *J Virol.* **72**, 8833-8840.

WILLEY, R.L., RUTHLEDGE, R.A., DIAS, S., FOLKE, T., THEODORE, T.S., BUCKLER, C.E et MARTIN, M.A. 1986. Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of acquired immunodeficiency syndrome virus. *Proc Natl Acad Sci. USA* **83**, 5038-5042.

WILSON, W., BRADDOCK, M., ADAMS, S., RARHJEN, P., KINGSMAN, S et KINGSMAN, A. 1988. HIV expression strategies: ribosomal frameshifting is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell* **55**, 1159-1169.

WISKERCHEN, M et CHENG-MAYER, C. 1996. HIV-1 Nef association with cellular serine kinase correlates with enhanced virion infectivity and efficient proviral DNA synthesis. *Virology* **224**, 292-301.

WONG-STALL, F et GALLO, R.C. 1985. Human T-lymphotropic. *Retroviruses* **317**, 395-403.

WYAND, M.S., MANSON, K.H., GARCIA-MOLL, M., MONFLORI, D et DESROSIERS, R.C. 1996. Vaccine protection by a triple deletion mutant of simian immunodeficiency virus. *J Virol.* **70**, 3724-33.

XU, X.N., LAFFERT, B., SCREATON, G.R., KRAFT, M., WOLF, D., KOLANUS, W., MONGKOLSAPAY, J., MCMICHAEL, A.J et BAUR, A.S. 1999. Induction of Fas



ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J Exp Med.* **189**, 1489-1496.

XU, X.N., SCREATON, G.R., GOTCH, F.M., DONG, T., TAN, R., ALMOND, N., WALKER, B., STEBBINGS, R., KENT, K., NAGATA, S., STOTT, J.E et MCMICHAEL, A.J. 1997. Evasion of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses by nef-dependent induction of fas ligand (CD95L) expression on simian immunodeficiency virus-infected cells. *J Exp Med.* **186**, 7-16.

YAHY, N., BAGHDIGUIAM, S., MOREAU, H et FANTINI, J. 1992. Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells. *J Virol.* **66**, 4848-4854.

YU, G et FELSTED, R.L. 1992. Effect of myristoylation on p27 nef subcellular distribution and suppression of HIV-LTR transcription. *Virology* **187**, 46-55.

YU, X.F., MATSUDA, M., ESSEX, M et LEE, T.H. 1990. Open reading frame vpr of simian immunodeficiency virus encodes a virion-associated protein. *J Virol.* **64**, 5688-5693.

YU, X.F., YU, Q.C., ESSEX, M et LEE, T.H. 1991. The vpx gene of simian immunodeficiency virus facilitates efficiency viral replication in fresh lymphocytes and macrophages. *J Virol.* **65**, 5088-5091.

ZAULI, G., GIBELLINI, D., SECCHIERO, P., DUTARTRE, H., OLIVE, D., CAPITANI, S et COLLETTE, Y. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein sensitizes CD4(+) T lymphoid cells to apoptosis via functional upregulation of the CD95/CD95 ligand pathway. *Blood* **93**, 1000-1010.

ZAZOPOULOS, E et HASELTINE, W.A. 1993. Effect of nef alleles on replication of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **194**, 20-27.

ZAZOPOULOS, E et HALSENTINE, W.A. 1992. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 Nef function. *Proc Natl Acad Sci. USA* **89**, 6634-6638.

ZHU, T., MO, H., WANG, N., NAM, D.S., CAO, Y., KOUP, A et HO, D.D. 1993. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* **261**, 1179-1181.

## **9. ANNEXES**

## 9.1 Solutions pour les gels de protéines

### - Gel de séparation 14% (30 mL)

H <sub>2</sub> O.....	7,9 mL
Solution A.....	14 mL
Solution B.....	7,5 mL
10% Sodium dodecyl sulfate.....	0,3 mL
10% Amonium persulfate.....	0,3 mL
TEMED.....	12 µL

### - Gel de regroupement (5 mL)

H <sub>2</sub> O.....	3,4 mL
Solution A.....	0,83 mL
Solution B.....	0,63 mL
10% Sodium dodecyl sulfate.....	0,05 mL
10% Amonium persulfate.....	0,05 mL
TEMED.....	5 µL

### - Solution A: 30% Acrylamide mix

Acrylamide.....	29,2 g
Bis acrylamide.....	0,8 g

Compléter à 100 mL avec H<sub>2</sub>O distillée et déionisée

Filtrer sur papier Wattman

### - Solution B : Tris-Base 1,5 M (pH 8,8)

Tris-Base.....	18,15 g
----------------	---------

Ajouter 50 mL de H<sub>2</sub>O distillée et déionisée

Ajuster le pH à 8,8

Compléter à 100 mL avec de H<sub>2</sub>O distillée et déionisée

**- Solution C : Tris-Base 1,0 M (pH 6,8)**

Tris-Base..... 12,1 g

Ajouter 50 mL de H<sub>2</sub>O distillée et déionisée

Ajuster le pH à 6,8

Compléter à 100 mL avec de H<sub>2</sub>O distillée et déionisée

**9.2 Composition des tampons**

**- Tampon d'électrophorèse de Laemmli 10X**

250 mM Tris-Base

2,5 M Glycine

1% SDS

**- Tampon dissociant de Laemmli 4X**

1 M Tris-HCl (pH 6,8)..... 12,5 mL

glycérol..... 20 mL

10% SDS..... 40 mL

Bleu de bromophénol..... 20 mg

$\beta$ -mercaptoéthanol..... 10 mL  
H<sub>2</sub>O..... 17,5 mL

**-Tampon Tris-acétate/EDTA (TAE)**

40 mM Tris-acétate

1 mM EDTA

**- Tampon Tris-EDTA (TE) (pH 7,4)**

10 mM Tris.Cl (pH 7,4)

1 mM EDTA (pH 8,0)

**- Tampon de chargement de chargement 6X**

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)

1 mM EDTA

0,25% de xylène cyanol FF

30% glycérol

**9.3 Solutions pour la lyse alcaline**

**- Solution I**

50 mM glucose

25 mM Tris.Cl (pH 8,0)

10 mM EDTA (pH 8,0))

**- Solution II**

0,2 N NaOH

1% SDS

**-Solution III**

600 mL d'acétate de potassium 5M

115 mL d'acide acétique gacial

285 mL d'eau distillée

**9.4 Milieux des cultures cellulaires**

**- Milieu de croissance pour les cellules CEM**

Milieu RPMI-1640.....	90%
Sérum foetal bovin.....	10%
Glutamine.....	2 mM
Gentamicine.....	50 µg/mL

2-mercapto-éthanol.....  $10^{-5}$  M

**- Milieu de croissance pour cellules d'insectes High-Five**

Milieu Excell-400..... 1 L

Glutamine..... 2 mM

Gentamicine..... 10  $\mu$ g/mL

**- Milieu de croissance L-Broth (LB) pour les bactéries**

Dissoudre dans 1L d'eau distillée

Bacto-tryptone..... 10 g

Extrait de levure ..... 5 g

NaCl ..... 10 g

Ampicilline..... 100  $\mu$ g/mL