Université du Québec

Thèse
présentée à
l'Institut Armand-Frappier
comme exigence partielle
du doctorat en virologie et immunologie

par

Abderrazzak MERZOUKI

Relation entre l'activité de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) et la diversité génétique virale: cohorte croisée de patients à différents stades de l'infection au VIH-1

Juillet 1996

À mon très cher papa,
à ma très chère maman,
à ma famille

TABLE DES MATIÈRES

		page
TABLE DES MATIÈRES		ii
LISTE DES FIGURES		vi
LISTE DES TABLEAUX		ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS		x
SOMMAIRE		xi
INTRODUCTION		*1*
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE		*5*
1-	**VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE (VIH)**	**6**
1-1	Données taxonomiques	6
1-2	Structure et organisation génomique	7
2-	**BIOLOGIE DU VIH-1**	**12**
2-1	ÉTABLISSEMENT DE L'INFECTION	12
2-1.1	Récepteur cellulaire CD4	12
2-1.2	Glycoprotéines de l'enveloppe	13
2-1.2.1	Biosynthèse des glycoprotéines de l'enveloppe	13
2-1.2.2	Fixation au récepteur CD4	14
2-1.3	Fusion virus-cellule	17
2-1.4	Entrée de la nucléocapside virale	20
2-1.5	Conversion de l'ARN virale en ADN complémentaire (ADNc)	20
2-1.6	Intégration de l'ADN viral	21
2-2	EXPRESSION DU VIRUS AU COURS DE L'INFECTION	22
2-2.1	Avant-propos	22
2-2.2	Stade précoce de l'expression virale	22
2-2.2.1	Synthèse de l'ARN viral	23
2-2.2.2	Contrôle cellulaire de l'expression virale	26
2-2.2.3	La protéine Tat	28
2-2.2.4	La protéine Rev	28
2-2.2.5	La protéine Nef	29
2-2.3	Stade tardif de l'expression du virus	30
2-2.3.1	Assemblage du précurseur de la capside	30
2-2.3.2	Gènes régulateurs tardifs	32
2-2.3.2.1	La protéine Vif	33
2-2.3.2.2	La protéine Vpr	33
2-2.3.2.3	La protéine Vpu	33
2-3	CYTOPATHICITÉ ET EFFETS CYTOPATHIQUES DU VIH-1	34
2-4	TROPISME DU VIH-1	36
3-	**VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE ET DIVERSITÉ**	**40**

4-	**QUANTIFICATION DE L'INFECTION *IN VIVO***	**43**
5-	**RÉPONSE IMMUNITAIRE À L'INFECTION AU VIH-1**	**46**
5-1	Avant-propos	46
5-2	Réponse humorale	46
5-2.1	Anticorps neutralisants anti-VIH-1	47
5-2.2	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)	48
5-3	Réponse cellulaire	51
5-3.1	Réponses des lymphocytes-T et la fonction des cellules CD4+	51
5-3.2	Cytotoxité des lymphocytes-T $CD8^+$ restreinte au CMH	52
5-3.3	Réponse cellulaire anti-VIH dirigée par des cellules non-T	54
MATÉRIEL ET MÉTHODES		***55***
1-	**ÉTABLISSEMENT ET CARACTÉRISATION DES CLONES CELLULAIRE EXPRIMANT LES GLYCOPROTÉINES DE L'ENVELOPPE DU VIH-1 NL4.3**	**56**
1-1	Description des lignées cellulaires et conditions de culture	56
1-2	Vecteurs d'expression rétroviraux pDOLHIV*env* et pDOLHIV*env*R	57
1-3	Production et purification des vecteurs d'expression	60
1-4	Transfection par électroporation des cellules CEM-T4 et CEM.NKR	60
1-5	Sélection des clones cellulaires transfectés	61
1-6	Caractérisation des populations cellulaires clonées	62
1-6.1	Anticorps anti-VIH-1	62
1-6.2	Quantification par cytométrie de flux du niveau d'expression des antigènes viraux	62
1-6.3	Immunofluorescence indirecte	63
1-6.4	Radioimmunoprécipitation (RIA)	64
1-6.4.1	Marquage métabolique	64
1-6.4.2	Radioiodination des protéines membranaires	65
1-6.4.3	Immunoprécipitation et analyse par SDS-PAGE	65
2-	**UTILISATION DES CLONES CELLULAIRES CEMC2 ET CEMG6, COMMES CELLULES CIBLES, DANS LES TEST ADCC**	**67**
2-1	Résistance à la lyse spontanée par les PBMC de donneurs séronégatifs	67
2-2	Lyse spécifique par le mécanisme ADCC	68
2-3	Analyses statistiques: test t de Student	68
3-	**MESURE DE LA RÉPONSE ADCC ANTI-VIH-1: ÉTUDE CROISÉE D'UNE COHORTE DE PATIENTS À DIFFÉRENTS STADES DE L'INFECTION**	**69**
3-1	Données cliniques	69
3-2	Préparation des échantillons cliniques	74
3-3	Test ADCC anti-VIH-1 (ADCC indirecte)	74
3-4	Analyse des données	76

4-	**ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE DES QUASI-ESPÈCES PROVIRALES PRÉSENTES CHEZ LES PATIENTS DE LA COHORTE CROISÉE**	**77**
4-1	Amplification des domaines du gène *env*, renfermant les séquences des épitopes ADCC	77
4-1.1	Choix des amorces oligonucléotidiques	77
4-1.2	Synthèse des amorces oligonucléotidiques	78
4-1.3	Réaction de polymérisation en chaîne	81
4-1.4	Polymorphisme de taille parmi les fragments PCR	82
4-2	Clonage des fragments d'ADN amplifiés par PCR	83
4-2.1	Réaction de ligation	83
4-2.2	Transformation des cellules bactériennes	83
4-2.3	Sélection des colonies recombinantes	84
4-2.4	Purification de l'ADN plasmidique "Mini-préparation"	84
4-2.5	Séquençage des plasmides recombinants	85
4-2.5.1	Séquençage manuel	85
4-2.5.2	Séquençage automatique	87
4-2.5.3	Analyse des séquences du VIH-1	88
4-2.5.3.1	Le programme SeqEd	88
4-2.5.3.2	Le programme Gene Works	89
4-2.5.3.3	PHYLIP (Phylogeny Inference Package), analyses phylogénétiques	89
5-	**ÉTUDE DES NIVEAUX DE TRANSCRIPTION DES ARNm VIRAUX**	**91**
5-1	Construction du standard interne	91
5-2	Détermination des niveaux d'ARNm du VIH-1	94
RÉSULTATS		***97***
1-	**ÉTABLISSEMENT DES CELLULES EXPRIMANT LES ANTIGÈNES DE SURFACE DU VIH-1 NL4-3**	**98**
1-2	Transfection par électroporation	98
1-3	Quantification du niveau d'expression des antigènes de surface du VIH-1	99
1-3.1	Analyse par cytométrie de flux (FACS)	99
1-3.2	Immunofluorescence en microscopie	102
1-3.3	Radioimmunoprécipitation (RIA)	105
1-3.4	Culture cellulaire, formation de syncitia	108
2-	**CARACTÉRISATION IMMUNOBIOLOGIQUE DES CELLULES EXPRIMANT LES ANTIGÈNES DE SURFACE DU VIH-1**	**111**
2-1	Susceptibilité à la lyse spontanée par les cellules effectrices (PBMC) en absence d'anticorps anti-VIH-1	111
2-2	Susceptibilité à la lyse spécifique par les cellules effectrices en présence d'anticorps anti-VIH-1 (ADCC indirecte)	112

3- ÉVALUATION DES TITRES DES ANTICORPS ADCC DANS LES SÉRUMS DE PATIENTS À DIFFÉRENTS STADES DE L'INFECTION AU VIH-1 **115**

3-1 Titre d'anticorps ADCC présents dans les sérums de patients au stade II de l'infection (séropositifs asymptomatiques) 115

3-2 Titre d'anticorps ADCC présents dans les sérums de patients au stade III de l'infection 119

3-3 Titre d'anticorps ADCC présents dans les sérums de patients au stade IV de l'infection 122

3-4 Niveaux d'activité ADCC à différents stades de l'infection en rapport avec le compte de cellules CD4 127

4- ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE VIRALE À DIFFÉRENTS STADES DE L'INFECTION **130**

4-1 Amplification enzymatique des régions du gène de l'enveloppe renfermant les sèquences des épitopes ADCC 130

4-2 Vérification de la diversité génétique interpatient: séquençage direct des produits PCR 134

4-3 Diversité génétique intrapatient: séquençage des "quasi-espèces" isolées chez les individus à différents stades de l'infection 142

4-4 Relation entre le taux de variabilité des "quasi-espèces" et la réponse ADCC 163

4-5 Relations évolutionnaires parmi les séquences du VIH-1 167

4-6 Localisation et conséquences des changements des séquences au niveau de la région V3 175

5- QUANTIFICATION DIFFÉRENTIELLE DES ARNm VIRAUX PAR RT-qc-PCR **187**

DISCUSSION ***195***

1- ÉTABLISSEMENT ET CARACTÉRISATION DES CELLULES CIBLES POUR LES TESTS ADCC **196**

2- RÉPONSE ADCC À DIFFÉRENTS STADES DE L'INFECTION AU VIH-1 **199**

3- DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE VIRALE ET LA RÉPONSE ADCC **202**

4- NIVEAUX DE TRANSCRIPTION DES ARNm VIRAUX **212**

CONCLUSIONS ***216***

REMERCIEMENTS ***222***

RÉFÉRENCES ***224***

ANNEXES ***257***

A : Liste des publications et des communications. Copies des articles publiés. **257**

B: Séquences nucléotidiques des quasi-espèces (régions V3, C4 et C5) isolées à partir des cellules infectées des patients de la cohorte croisée **261**

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Coupe transversale "schématique" du VIH mature	**10**
Figure 2:	Structure secondaire "schématique" de la glycoprotéine de surface gp120, du VIH-1 HX10	**15**
Figure 3:	Modèle de la protéine transmembranaire, gp41, du VIH-1	**18**
Figure 4:	Les ARNm produits par le VIH-1	**24**
Figure 5:	Vecteur d'expression rétroviral pDOLHIV*env* utilisé dans les expériences de transfections	**58**
Figure 6:	Séquences et localisation des amorces oligonucléotidiques utilisées dans les expériences de RT-qc-PCR	**92**
Figure 7:	Construction du plasmide utilisé comme standard interne dans les réactions de RT-qc-PCR	**95**
Figure 8:	Analyse par cytométrie de flux du niveau d'expression des antigènes du VIH-1 à la surface des cellules transfectées	**100**
Figure 9:	Immunofluorescence en microscopie	**103**
Figure 10:	Radioimmunoprécipitation	**106**
Figure 11:	Formation de syncitia dans les cellules transfectées exprimant les antigènes de surface du VIH-1	**109**
Figure 12:	Caractérisation immunobiologique des cellules exprimant les antigènes de surface du VIH-1 comme cellules cible dans les tests ADCC	**113**
Figure 13:	Titres d'anticorps ADCC présents dans les sérums de patients (S1 à S11) au stade II de l'infection au VIH-1	**117**
Figure 14:	Titres d'anticorps ADCC présents dans les sérums de patients (S12 à S21) au stade III de l'infection au VIH-1	**120**
Figure 15:	Titres d'anticorps ADCC présents dans les sérums de patients (S22 à S33) au stade IV de l'infection au VIH-1	**123**
Figure 16:	Relation entre l'activité ADCC et le compte des cellules CD4	**128**
Figure 17:	Électrophorégrammes des fragments d'ADN amplifiés par "nested-PCR" des régions V3, C4 et C5 de la gp120/41	**132**
Figure 18:	Séquençage direct des produits PCR: diversité interpatients (région V3 de la gp120)	**136**

Figure 19: Séquençage direct des produits PCR: diversité interpatients (région C4 de la gp120/41) **138**

Figure 20: Séquençage direct des produits PCR: diversité interpatients (région C5 de la gp41) **140**

Figure 21: Diversité génétique intrapatient (région V3) durant le stade II de l'infection (séronégatifs asymptomatiques) **145**

Figure 22: Diversité génétique intrapatient (région V3) durant le stade III de l'infection **147**

Figure 23: Diversité génétique intrapatient (région V3) durant le stade IV de l'infection **149**

Figure 24: Diversité génétique intrapatient (région C4) durant le stade II de l'infection (séronégatifs asymptomatiques) **151**

Figure 25: Diversité génétique intrapatient (région C4) durant le stade III de l'infection **153**

Figure 26: Diversité génétique intrapatient (région C4) durant le stade IV de l'infection **155**

Figure 27: Diversité génétique intrapatient (région C5) durant le stade II de l'infection (séronégatifs asymptomatiques) **157**

Figure 28: Diversité génétique intrapatient (région C5) durant le stade III de l'infection **159**

Figure 29: Diversité génétique intrapatient (région C5) durant le stade IV de l'infection **161**

Figure 30: Relations évolutionnaires parmi les séquences du VIH-1 (région V3) **169**

Figure 31: Relations phylogénétiques entre les séquences de la région C4 **171**

Figure 32: Relations phylogénétiques entre les séquences de la région C5 **173**

Figure 33: Alignement multiple des séquences en acides aminés de la boucle V3 des différentes quasi-espèces isolées chez les patients au stade II de l'infection **178**

Figure 34: Alignement multiple des séquences en acides aminés de la boucle V3 des différentes quasi-espèces isolées chez les patients au stade III de l'infection **180**

Figure 35: Alignement multiple des séquences en acides aminés de la boucle V3 des différentes quasi-espèces isolées chez les patients au stade IV de l'infection **182**

Figure 36: Phénotype inducteur de syncitia versus phénotype non-inducteur de syncitia **184**

Figure 37: Séquence du standard interne utilisé comme cible compétitrice pour la quantification, par qc-PCR, des ARNm viraux régulatrices *tat, rev, nef* et structuraux *pol* **190**

Figure 38: Relation, chez les patients à différents stades de l'infection au VIH-1, entre le nombre de cellules CD4, le niveau d'activité ADCC antiviral, le taux de variabilité génétique provirale et le ratio d'épissage des transcrits messagers viraux **218**

Figure 39: Alignement multiple des séquences nucléotidiques de la boucle V3 durant le stade II de l'infection **262**

Figure 40: Alignement multiple des séquences nucléotidiques de la boucle V3 durant le stade III de l'infection **265**

Figure 41: Alignement multiple des séquences nucléotidiques de la boucle V3 durant le stade IV de l'infection **268**

Figure 42: Alignement multiple des séquences nucléotidiques de la région C4 (gp120/41) durant le stade II de l'infection **271**

Figure 43: Alignement multiple des séquences nucléotidiques de la région C4 (gp120/41) durant le stade III de l'infection **273**

Figure 44: Alignement multiple des séquences nucléotidiques de la région C4 (gp120/41) durant le stade IV de l'infection **275**

Figure 45: Alignement multiple des séquences nucléotidiques de la région C5 (gp41) durant le stade II de l'infection **277**

Figure 46: Alignement multiple des séquences nucléotidiques de la région C5 (gp41) durant le stade III de l'infection **279**

Figure 47: Alignement multiple des séquences nucléotidiques de la région C5 (gp41) durant le stade IV de l'infection **281**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1:	Cohorte croisée de 33 patients à différents stades de l'infection au VIH-1	**70**
Tableau 2:	Classification des manifestations de l'infection au VIH	**72**
Tableau 3:	Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées dans les expériences d'amplification par "nested-PCR"	**79**
Tableau 4:	Tableau récapitulatif de compte de cellules CD4, l'activité ADCC et les titres d'anticorps ADCC	**125**
Tableau 5:	Variabilité génétique intrapatient et interpatients des séquences des épitopes ADCC et des régions avoisinantes au niveau des régions V3, C4 et C5 du gène *env* du VIH-1	**165**
Tableau 6:	Quantification des ARNm viraux	**193**

LISTES DES ABRÉVIATIONS

a.a	:	acide aminé
ADCC	:	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
pb	:	paire de bases
CRS	:	"cis regulating sequence"
CTL	:	lymphocytes T-cytotoxiques
env	:	gène codant pour les glycoprotéines de l'enveloppe
gag	:	antigène spécifique du groupe
gp	:	glycoprotéine
kDa	:	kilo Dalton (10^3 Dalton)
LTR	:	longue répétition terminale
µCi	:	micro Curie (10^{-6} Curie)
MuLV	:	virus de la leucémie murine
nef	:	"negative regulator factor
NK	:	"natural killer"
NSI	:	non-iducteur de syncitia
PBMC	:	"peripheral blood mononucleaire cells"
pol	:	gène codant pour la transcriptase inverse, protéase, intégrase et ribonucléase
rev	:	"regulator of virion-protein expression"
RRE	:	"rev responsive element"
RT-qc-PCR	:	Reverse transcriptase quantitative-compétitive PCR
SI	:	inducteur de syncitia
SIDA	:	Syndrome de l'immunodéficience acquise
TAR	:	"tat transactivating region"
tat	:	"trans-activating transcriptional regulator""
VIH	:	virus de l'immunodéficience humaine

SOMMAIRE

La variabilité génétique du gène *env* du VIH-1, et en particulier celle de la région V3, est directement impliquée dans le contrôle du phénotype viral. Le domaine V3 est en fait impliqué dans le contrôle de nombreuses propriétés biologiques du virus, incluant le tropisme cellulaire, l'infectivité et la cytopathogénicité. Certains changements d'acides aminés au niveau du domaine V3 ont été associés à l'émergence de souches de virus inductrices de syncitia qui sont en corrélation avec le déclin rapide des cellules $CD4^+$ et la progression de la maladie. En plus, cette région renferme des déterminants antigéniques majeurs pour la réponse immunitaire humorale et cellulaire, dont la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC).

L'ADCC est une composante importante de la réponse immunitaire qui, durant l'infection au VIH-1, aide à éliminer les cellules infectées autologues et allogéniques. Cependant, le niveau d'implication de l'ADCC dans le maintien de l'état asymptomatique et son rôle à différents stades de l'infection sont encore mal définis, d'où notre travail dont le but était d'évaluer, dans un premier temps, le niveau de l'activité ADCC (titres d'anticorps ADCC) chez 33 patients à différents stades de l'infection au VIH-1. Ensuite, étudier la diversité génétique des quasi-espèces provirales présentes chez ces mêmes patients afin d'établir, dans un deuxième temps, une corrélation (si corrélation existe) entre la diversité génétique virale et l'activité ADCC à différents stades de l'infection.

L'approche expérimentale consistait en l'établissement de cellules exprimant à leur surface, de façon stable, les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 NL4.3 dont l'intégrité structurale et fonctionnelle sont intactes. Ces cellules, en plus de garder leur résistance à la lyse spontanée par les cellules NK (PBMC) **($p>0,05$)**, comparées à la lyse des cellules CEM.NKR, montraient une susceptibilité significative **($p\leq0,05$)** à la lyse par le mécanisme ADCC en présence de sérum anti-VIH-1 de donneurs séropositifs, en comparaison avec la lyse en présence de sérum normal de donneurs séronégatifs.

L'utilisation de ces cellules pour déterminer les titres d'anticorps ADCC dans les sérums de patients à différents stades de l'infection (étude croisée) a permis de montrer une altération profonde des titres d'anticorps ADCC et de l'activité ADCC avec la progression de l'infection. La moyenne des niveaux ADCC (en pourcentage de lyse spécifique) dirigés par les sérums de patients, a chuté de **$25,7\pm11,5\%$** au stade II de l'infection, à **$10,3\pm8,5\%$** au stade III et à **$6,4\pm8,5\%$** au stade IV. Au niveau des titres d'anticorps

ADCC, 82% (9/11) des sérums de patients au stade II de l'infection présentaient des titres supérieurs à $\mathbf{10^4}$ comparativement à 30% (3/10) au stade III et 25% (3/12) au stade IV.

La chute des titres d'anticorps ADCC qui coïncidait avec la chute du nombre de cellules CD4 (**799±267** au stade II de l'infection, **515±236** au stade III et **37,25±44** au stade IV) ne semble pas, par contre, en relation directe avec la diversité génétique arborée par la population des quasi-espèces provirales isolées à partir des cellules de ces mêmes patients. En effet, l'étude de la diversité génétique des régions de l'enveloppe renfermant les épitopes ADCC (boucle V3, domaine de fixation de la gp120 au récepteur CD4, et la région immunodominante de la gp41) a montré une variabilité génétique intrapatient et interpatients comparable, et ce indépendamment du stade de l'infection. La diversité génétique **intra-/inter-patient** au niveau de la boucle V3 était de l'ordre de **6,1±3,9% (de 0 à 15,2%)/ 12,2±2,1% (de 9,1 à 15,7)** chez les individus au stade II de l'infection, par rapport à **6,4±1,7% (de 2,9 à 9,0)/12,5±2,0 (de 10,0 à 16,0)** au stade III et **8,8±4,7% (de 2,9 à 19,0)/12,4±2,0 (10,9±17,3)** au stade IV. Pour les régions C4 et C5, la diversité génétique intrapatient, très similaire, n'a jamais dépassé **4% (de 1,8 à 4,0)**, et ce, peu importe le stade de l'infection, alors que la diversité interpatient variait entre **5,3 à 8,6%.**

Cependant, l'absence de corrélation entre le taux de variabilité génétique et l'activité ADCC (titres d'anticorps ADCC) n'exclue pas l'émergence de quasi-espèces ayant dirigé des mutations spécifiques, en réponse à la pression sélective exercée par le système immunitaire, qui pourraient leur conférer une meilleure adaptation à l'environnement immunitaire hôte. Ces formes adaptées de quasi-espèces peuvent causer plus de dommages au système immunitaire. Cet énoncé est supporté d'une part, par des taux de substitutions non-synonymes élevés au niveau de la boucle V3, renfermant plusieurs domaines fonctionnels, comparativement aux régions C4 et C5 dont les séquences montraient des taux de substitutions non-synonymes très bas. D'autres part, par l'apparition, chez 58% des patients, de quasi-espèces dont les séquences prédisaient un phénotype inducteur de syncitia, connues pour leur adaptation optimale à l'environnement immunitaire hôte et pour leur vitesse de réplication et leur cytopathogénicité élevée.

L'étude de la réplication virale à l'intérieur des cellules, en utilisant la technique de RT-qc-PCR pour la quantification des ARNm viraux a montré qu'en moyenne le ratio d'épissage (ratio ARNm régulateurs:ARNm structuraux) était **2,3 fois** supérieur chez les patients au stade III et IV comparativement à celui observé chez les patients au stade II de l'infection. Ces ratio, qui témoignent d'une plus grande production de virions durant les

stades avancés de l'infection coïncident avec la chute de l'activité ADCC (chute des titres d'anticorps ADCC) et la dépletion des cellules CD4. Cette étude n'a cependant pas permis d'établir une relation directe entre la cinétique de réplication des souches virales, leur diversité génétique et la chute des titres des anticorps ADCC. En effet, plusieurs patients, dont l'activité ADCC semblait intacte, montraient des ratio d'épissage comparables à ceux de patients dont l'activité ADCC était lourdement altérée. Par contre, les résultats de quantification des ARNm viraux nous ont confirmé un des faits les plus importants dans la pathogenèse associée à l'infection au VIH-1, à savoir que la réplication du virus est active et ce même durant la phase dite ¨quiescente¨ de l'infection (stade asymptomatique).

En conclusion, la diversité génétique du VIH-1 ne semble être ni la cause directe ni la conséquence de la perte de l'activité ADCC (chute des titres d'anticorps ADCC). En fait, la réponse immunitaire, avec l'ADCC en tête, semble bien s'adapter à la présence de souches de virus divergents et en particulier durant le stade asymptomatique de l'infection. Ainsi, nous croyons que la réponse ADCC, probablement comme la réponse CTL, est requise pour éliminer les cellules infectées et aider à maintenir la charge virale aussi basse que possible ainsi que l'état asymptomatique. La progression vers le SIDA pourrait être précipitée suite à des perturbations graduelles de l'immunité cellulaire après la chute du nombre de cellules-T $CD4^+$ et suite à l'altération de la fonction des cellules T. Dans notre étude croisée, la chute des cellules-T $CD4^+$ ne semble pas corréler avec la diversité génétique virale.

L'ensemble de ces résultats soulève de nouvelles questions, mais en particulier celles visant à comprendre les événements capables de perturber une infection au VIH-1 dans un état asymptomatique stable.

INTRODUCTION

La première description clinique du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) date de 1981, suite à une flambée d'infections opportunistes parmi un groupe d'hommes sans problèmes de santé connus (Gottlieb *et al.*, 1981; Masur *et al.*, 1981). L'agent étiologique du SIDA, un pathogène viral à diffusion hématogène, a été isolé en 1983 à partir de lymphocytes de patient ayant développé le SIDA. Il s'agit du 3ième rétrovirus humain (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Popovic *et al.*, 1984) appelé virus de l'immunodéficience humaine type-1 (VIH-1). Ce rétrovirus est le prototype d'une large famille de lentivirus de primates qui comprend également un second sérotype, le VIH-2. Chez l'Homme, le SIDA est caractérisé par une altération profonde du système immunitaire avec atteinte fonctionnelle précoce des lymphocytes CD4. Certains individus infectés par le VIH-1 peuvent cependant demeurer asymptomatiques durant une période qui peut atteindre 15 ans (Lifson *et al.*, 1991, Rutherford *et al.*, 1990) avec un nombre de cellules-T $CD4^+$ relativement stable, des réponses CTL fortes et un nombre de cellules infectées relativement bas indiquant que le virus est parfaitement controlé par le système immunitaire. Cependant, avec le temps ce même système immunitaire s'affaiblit et la plupart des individus infectés développent le SIDA (Ferbas *et al.*, 1995; Rinaldo *et al.*, 1995). Les réponses à des questions telles que la défaillance du système à contrôler l'infection au VIH-1, et comment le VIH-1 induit le SIDA, demeurent très controversées (Pantaleo *et al.*, 1993a,b). Plusieurs explications ont été proposées et parmi tant d'autres citons: i) la réponse immunitaire au VIH-1 est peut-être nuisible aux individus infectés (Zinkernagel, 1995), ii) le VIH-1 peut affaiblir le système immunitaire en entrainant sa dérégulation (Miedema *et al.*, 1990) ou en augmentant la diversité virale (Nowak *et al.*, 1991), iii) la différence dans la pathogénicité virale, arborée par les différentes souches virales, peut contribuer au développement du SIDA (Asjo *et al.*, 1986; Connor *et al.*, 1993).

La théorie du seuil de la diversité génétique et antigénique (Nowak *et al.*, 1990, 1991, 1995) selon laquelle la perte des cellules-T $CD4^+$ chez les individus infectés est principalement due à une augmentation de la diversité génétique et antigénique virale, qui au delà d'un seuil, dépasse la capacité de la réponse immunitaire à contrôler la croissance de la

population virale, est devenue depuis un modèle de référence très «attrayant» pour expliquer la progression différentielle de l'infection au VIH-1. Cette théorie s'explique comme suit: la réponse immunitaire cellulaire contre le VIH-1 est dirigée contre les épitopes conservés et variables en même temps. En assumant que cette réponse contre les épitopes conservés ne peut pas éradiquer le VIH-1, la réponse immunitaire contre les épitopes variables est appelée à éliminer les cellules-T $CD4^+$ infectées et à diminuer la charge virale. Cette réponse contre les épitopes variables pourrait être responsable de l'augmentation de la diversité génétique et antigénique parmi la population virale et du même coup responsable de la dilution la réponse immune, ce qui brouille le système immunitaire du patient, qui devient alors moins effectif. En plus, les mutations continuelles pour échapper à la pression du système immunitaire, oriente la réponse immune vers des épitopes «sous dominants» de plus en plus faibles, loin des épitopes immunodominants reconnus initialement (Nowak *et al.*, 1995).

Cependant, la théorie de "seuil de diversité génétique et antigénique" n'est pas supportée par de nombreux travaux, incluant le notre, (Delwart *et al.*, 1994; Lukashov *et al.*, 1995), qui ont montré qu'il n'existe aucune évidence témoignant de la présence d'un seuil de diversité virale en même temps qu'une chute précipitée du nombre de cellules-T $CD4^+$ chez des patients ayant développé le SIDA. En fait, ces travaux ont montré que les patients qui ont progressé rapidement vers la maladie avaient des niveaux élevés d'ARN viral dans leur plasma mais une diversité virale très limitée, alors que les individus qui ont progressé lentement présentaient une diversité virale plus élevée (Delwart *et al.*, 1994; Lukashov *et al.*, 1995). En plus, il a été montré que le taux d'accumulation des mutations non-synonymes (non-silencieuses) par rapport aux mutations synonymes, est plus élevé chez les progresseurs lents que chez les progresseurs rapides (Lukashov *et al.*, 1995). Cette accumulation de mutations non-synonymes durant le stade asymptomatique témoigne de la présence de contraintes fonctionnelles sélectives sur les "quasi-espèces" virales. Ces contraintes sélectives pourraient être exercées par l'effet seul ou conjugué de la réponse

CTL, ADCC et anticorps neutralisants spécifiques au VIH-1 (Broliden *et al.*, 1990, 1991, 1992; Delwart *et al.*, 1994; Forthal *et al.*, 1995; Javaherian *et al.*, 1989; LaRosa *et al.*, 1990a, b; Liou *et al.*, 1989; Lukashov *et al.*, 1995; Pantaleo *et al.*, 1990; Walker et Plata 1990).

En se basant sur les éléments ci-dessus, nous avons formulé le but principal de cette recherche, qui était d'évaluer le niveau d'activité ADCC et son rôle à différents stades de l'infection au VIH-1, ainsi que l'effet de la diversité génétique virale sur cette réponse ADCC. Plus spécifiquement et pour atteindre notre but, nous nous sommes fixés les objectifs suivants:

Objectifs de la recherche

- Établir des cellules qui expriment à leur surface, de façon stable, les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 NL4.3, résistantes à la lyse spontanée par les cellules effectrices (PBMC) de donneurs séronégatifs mais sensibles à la lyse spécifique par le mécanisme de l'ADCC, en présence d'anticorps anti-VIH-1. Ces cellules serviront de cellules cibles dans les tests ADCC.

- Évaluer les titres d'anticorps ADCC (niveau d'activité ADCC) dans les sérums d'une cohorte croisée de 33 patients à différents stades de l'infection au VIH-1.

- Étudier la diversité génétique des "quasi-espèces" provirales présentes dans les cellules des 33 patients de la cohorte, après amplification par PCR, clonage et séquençage de 3 régions du gène *env* renfermant les séquences des épitopes ADCC (cartographiés jusqu'à date).

- Établir une relation (si une telle relation existe) entre le niveau de l'activité ADCC (titres d'anticorps ADCC) et la diversité génétique des "quasi-espèces" (variabilité des épitopes définis comme cibles potentiels pour les anticorps ADCC). Par la suite, évaluer l'effet de la diversité génétique des "quasi-espèces" sur la réponse ADCC dirigés par les sérums.

- Étudier les niveaux de transcription des ARNm viraux par RT-qc-PCR afin d'évaluer le niveau d'implication de la variabilité génétique et de la réponse ADCC sur le taux de réplication du virus à l'intérieur des cellules infectées.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1- Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

1-1 Données taxonomiques

Le virus de l'immunodéficience humaine type 1 (VIH-1) connu antérieurement sous le nom du virus de la lymphoadénopathie (LAV), du virus de la leucémie humaine à lymphocytes T type III (HTLV-III), ou du virus associé au SIDA (ARV), est un virus à ARN, membre de la famille des lentivirus, non oncogène et cytopathogène (Chiu *et al.*, 1985). Le VIH partage des propriétés morphologiques, biologiques et moléculaires avec les prototypes des lentivirus animaux, dont le virus Visna, le virus de l'encéphalite arthritique caprine et le virus de l'anémie infectieuse équine (Sonigo *et al.*, 1985, Stephens *et al.*, 1986). Un deuxième virus de l'immunodéficience humaine type 2 (VIH-2), antigéniquement distinct du VIH-1, a été isolé peu de temps après la découverte du VIH-1 (Clavel *et al.*, 1986, Coffin *et al.*, 1986). Le VIH-2 a été isolé chez des individus de différentes régions en Afrique, en Europe, aux USA, en Amérique du Sud et récemment en Inde (Grez *et al.*, 1994, Weiss *et al.*, 1988). Les différences sérologiques majeures entre le VIH-1 et le VIH-2 résident principalement au niveau des glycoprotéines de l'enveloppe. Les anticorps contre le VIH-2 montrent généralement des réactions croisées avec les protéines Gag et Pol du VIH-1 mais pas avec les protéines de l'enveloppe du VIH-1 et *vice versa* (Clavel *et al.*, 1987, Gnann *et al.*, 1987).

Des cas d'infections doubles VIH-1/VIH-2 ont été documentés, mais il reste encore à déterminer la prévalence de tels évènements (George *et al.*, 1992, Peeters *et al.*, 1992). Les études sérologiques des glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-2 montrent des réactions croisées avec les protéines de l'enveloppe des souches du virus de l'immunodéficience simien (SIV), un groupe complexe de lentivirus de primates. Certains isolats de SIV peuvent causer une maladie similaire au SIDA chez certaines espèces de primates (macaque Rhésus), alors qu'ils sont relativement non pathogéniques pour leur

espèces d'origines (e.g., SIVagm chez les singes verts d'Afrique) (Gardner et Luciw, 1989).

L'amplification par PCR et le séquençage de certaines régions du gène *env*, en particulier les régions C2-V3 a permis de classer les séquences de VIH-1 dans six sous-types (A à F) (Myers *et al.*, 1992; Nuovo *et al.*, 1994b). Le sous-type A se retrouve principalement en Afrique Centrale, le sous-type B en Amérique du Nord et en Europe, le sous-type C en Afrique du Sud et en Inde, le sous-type D en Afrique Centrale et le sous-type E en Thaïlande. Le sous-type F, récemment identifié, comprend quelques isolats du Brésil (Potts *et al.*, 1993) et tous les virus isolés chez les enfants en Roumanie (Dumitrescu *et al.*, 1994). D'autres sous-types (G, H, I) en cours de caractérisation peuvent comprendre des virus de l'Afrique, de la Russie et du Taiwan (Myers *et al.*, 1993). Il existe cependant certains isolats qui sont génétiquement en dehors de tous les sous-types déjà établis. Ces virus , dont le ANT70 isolé au Cameroun (Gurtler *et al.*, 1994, Vanden Haeselvelde *et al.*, 1994), ont été classifiés dans le sous-type O "outlier" (Myers *et al.*, 1993) et semblent être aussi divergents des souches des différents sous-type de VIH-1 qu'ils le sont du SIVcpz (Vanden Haeselvelde *et al.*, 1994).

1-2 Structure et organisation génomique

Le virion mature du VIH-1 est de forme sphérique d'environ 100 nm de diamètre (fig. 1-A). La nucléocapside centrale "core" du virion est composée de la protéine de la capside virale, p25 (codée par le gène *gag*). À l'intérieur de cette capside (CA) ou nucléoïde, se trouvent deux molécules d'ARN simples brins identiques, étroitement associées à l'ADN polymérase virale ARN-dépendant (Pol ou transcriptase inverse [p64, p51]) et les protéines de la nucléocapside (NC), (p9, p6). La partie interne de la membrane virale est tapissée par la protéine du core p17 myristilée, qui fournit la matrice (MA) pour la structure virale. Cette matrice est vitale pour l'intégrité du virion (Gelderblom *et al.*, 1988,

1989) et pour l'incorporation des protéines de l'enveloppe dans les virions matures (Yu *et al.*, 1992). À l'intérieur du virion se trouve le produit du gène viral accessoire *vpr* (p15). La surface du virus est généralement le résultat de 72 protubérances (en configuration typique de clou à large tête) contenant des glycoprotéines de l'enveloppe en trimères ou en tétramères (Earl *et al.*, 1990, Gelderblom *et al.*, 1988, Ozel *et al.*, 1988, Pinter *et al.*, 1989, Weiss *et al.*, 1990).

Les glycoprotéines de l'enveloppe sont dérivées à partir d'un précurseur de 160 kDa qui est clivé à l'intérieur de la cellule par une enzyme cellulaire, la furine, en une protéine de surface (SU), la gp120 et une protéine transmembranaire (TM), la gp41 (McCune *et al.*, 1988) dont une portion de la région centrale et N-terminale est exprimée à la surface du virion. La région centrale de la gp41 se fixe à la gp120 par des liaisons non-covalentes, probablement à l'aide des deux régions hydrophobiques aux extrémités amino-terminale et carboxy-terminale de la gp120 (Helseth *et al.*, 1991). En général, le virion renferme environ 100 fois plus de protéine p25 du Gag que de protéine gp120 de l'enveloppe (Layne *et al.*, 1992, Moore *et al.*, 1991); et 10 fois plus de p25 que de molécules de la polymérase (Layne *et al.*, 1992).

Le génome est un ARN d'environ 9,8 Kilo paires de bases (kpb) et est caractérisé par la présence, à ces extrémités, de deux séquences LTR (longue répétition terminale) qui encadrent les gènes *gag*, *pol* et *env* (fig. 1-B). Contrairement aux autres rétrovirus, le génome du VIH-1 contient au moins six gènes additionnels dont trois (*tat, rev, nef*) jouent un rôle primordial dans la régulation de la réplication virale. Le transcrit primaire du VIH-1 est un ARNm pleine longueur qui est traduit en protéines Gag et Pol. Le précurseur Gag, (p55) est clivé par la protéase virale (de type aspartyl) en des protéines plus petites, p25, p17, p9 et p6 (Navia *et al.*, 1989; Tritch *et al.*, 1991; Wlodawer *et al.*, 1989). De son côté la protéine précurseur, Pol, est clivée en protéase, (p10), transcriptase inverse/RNase H, (p66, p51) et intégrase, (p32) (Lightfoote *et al.*, 1986; Mous *et al.*, 1988).

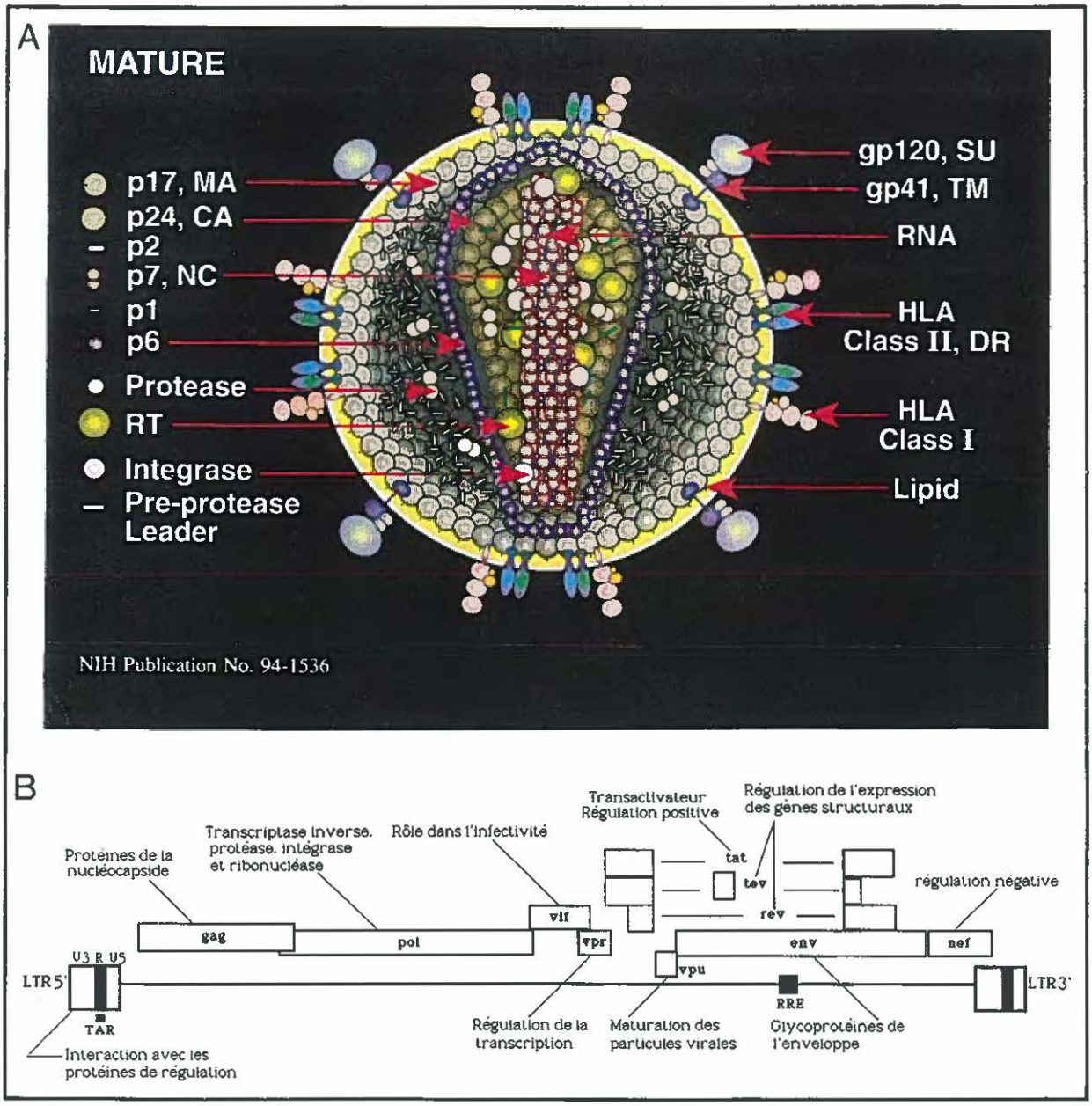
Le VIH-1 code pour trois enzymes majeures qui interviennent à différents niveaux durant le cycle de réplication. Il s'agit de i) l'ADN polymérase ARN-dépendant avec une fonction RNase H, qui agit durant la phase précoce de la réplication pour former des copies d'ADN double brins (ADNc) à partir de l'ARN du virus; ii) l'intégrase, active dans le noyau cellulaire, qui est responsable de l'intégration de l'ADNc viral dans l'ADN chromosomique de l'hôte; et iii) la protéase qui agit durant la maturation de la particule virale en clivant les polyprotéines Gag et Gag-Pol. L'activité de la protéase prend place soit à la surface de la cellule, soit dans le virion en bourgeonnement.

Le précurseur de l'enveloppe, (gp160) dont le messager est dérivé à partir du trancrit viral primaire par simple épissage (monoépissage), est clivé par une protéase cellulaire en glycoprotéine de surface, gp120 et en glycoprotéine transmembranaire, gp41. Les protéines virales régulatrices et accessoires incluant Tat, p14; Tev, p20; Rev, p19; Nef, p27; Vif, p23; Vpr, p15 et Vpu, p16, sont les produits de différents ARNm épissés (Robert-Guroff *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1990; Purcell et Martin, 1993). Ces protéines jouent un rôle très important dans la réplication du VIH-1.

Figure 1: **A: Coupe transversale «schématique» du VIH mature.**

L'ARN viral est associé à des produits des précurseurs Gag et Gag-Pol à l'intérieur d'une nucléocapside cylindrique. La nucléocapside est entourée d'une enveloppe lipidique, acquise lors du bourgeonnement du virions à la surface de la cellule infectée, à laquelle sont ancrées des protéines de surface d'origine cellulaire (HLA classe I et II) et virale (gp120, gp41). Les précurseurs Gag et Gag-Pol sont clivés par la protéase virale. Les produits protéolytiques du précurseur Gag comprennent la p17 (MA), p24 (CA), p2, p7(NC), p1 et la p6. Les produits protéolytiques du précurseur Gag-Pol comprennent la pré-protéase, la protéase, reverse transcriptase (RT) et l'intégrase. MA: matrice; CA: capside; NC: nucléocapside; SU: surface; TM: transmemranaire. **Ref. NIH Publication, 94-1536**.

B: Représentation schématique du génome du VIH-1.


A
MATURE
p17, MA
p24, CA
p2
p7, NC
p1
p6
Protease
RT
Integrase
Pre-protease
Leader
gp120, SU
gp41, TM
RNA
HLA
Class II, DR
HLA
Class I
Lipid
NIH Publication No. 94-1536
B
Protéines de la nucléocapside
Transcriptase inverse, protéase, intégrase et ribonucléase
Rôle dans l'infectivité
Transactivateur Régulation positive
Régulation de l'expression des gènes structuraux
régulation négative
gag
pol
vif
vpr
tat
tev
rev
env
nef
vpu
U3 R U5
LTR5'
LTR3'
TAR
RRE
Interaction avec les protéines de régulation
Régulation de la transcription
Maturation des particules virales
Glycoprotéines de l'enveloppe

2- Biologie du VIH-1

2-1 Établissement de l'infection

2-1.1 Récepteur CD4

La déplétion sélective et progressive des lymphocytes-T $CD4^+$ chez les patients au stade SIDA, témoigne du tropisme spécifique du virus pour les cellules exprimant l'antigène de surface CD4 (Klatzmann *et al.*, 1984, McDougal *et al.*, 1985). L'interaction réussie entre le virus et le récepteur à la surface de la cellule est un prérequis pour la transmission du VIH-1. Des processus subséquents sont impliqués pour la pénétration de la nucléocapside virale à travers la membrane cellulaire.

La protéine mature CD4 est une molécule de 55 kDa composée de 4 régions (V1 à V4) semblables aux régions extracellulaires des immunoglobulines, d'une région transmembranaire et d'un segment cytoplasmique (Maddon *et al.*, 1985). L'expression de la molécule CD4 à la surface des cellules humaines lymphoïdes et non lymphoïdes, est suffisant pour les rendre susceptibles à l'infection par le VIH-1. Les études de mutations dirigées a permis d'identifier un seule site dans le domaine V1 (a.a. 41 à 55) impliqué dans la fixation de la gp120 (Arthos *et al.* 1989, Bowman *et al.*, 1990, Landau *et al.*, 1988). Des mutations à l'intérieur de la région V1 du CD4 peuvent inhiber la fusion des cellules (formation de syncitia) sans pour autant interférer avec la fixation du virus (Camerini et Seed, 1990). Ceci suggère que l'attachement du virus à la surface de cellules cibles suivi de la fusion des membranes sont dirigés par des sites distincts à l'intérieur du domaine V1 du CD4.

2-1.2 Glycoprotéines de l'enveloppe

2-1.2.1 Biosynthèse des glycoprotéines de l'enveloppe

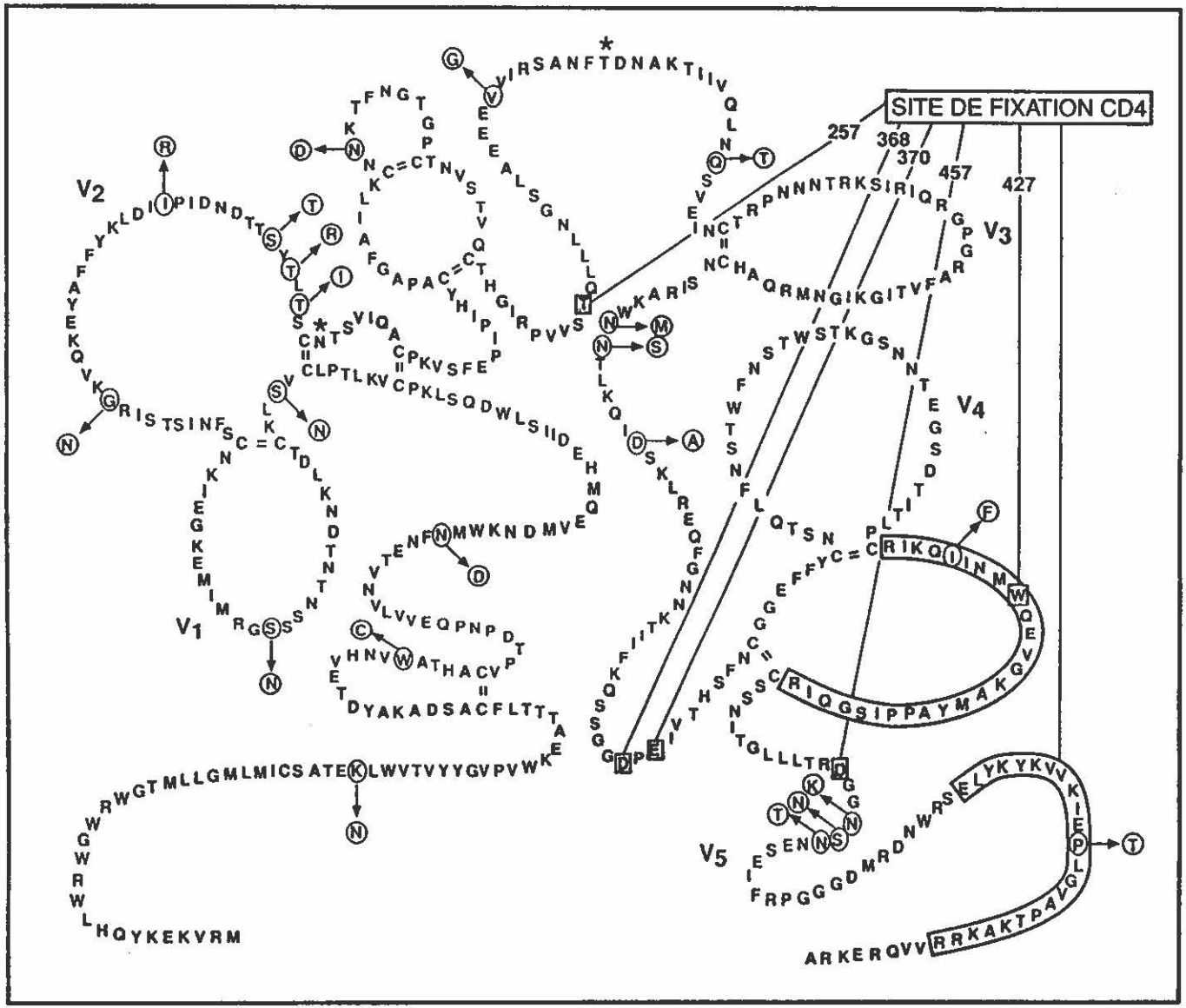
Les glycoprotéines de l'enveloppe localisées à la surface des particules virales et à la surface des cellules produisant le virus sont produites tard dans le cycle de réplication du virus, à partir d'un ARNm simplement épissé, sous forme d'un polypeptide précurseur, gp160 d'environ 860 acides aminés. L'ARNm de l'enveloppe est bicistronique et code pour les protéines Vpu et Env. Au cours de sa synthèse, la gp160 est dirigée vers le réticulum endoplasmique rugueux via une séquence signale N-terminale (Allan *et al.*, 1985, Robey *et al.*, 1985), où elle sera ancrée par une région transmembranaire d'environ 40 acides aminés (Berman *et al.*, 1988, Haffar *et al.*, 1988). La formation de dimère de la protéine précurseur a lieu dans le réticulum endoplasmique (RE) (Earl *et al.*, 1990, 1991). Cependant, son clivage en deux sous-unités, gp120 et gp41, a probablement lieu dans un compartiment post-RE lors de son transit au niveau de l'appareil de Golgi (Dewar *et al.*, 1989; Earl *et al.*, 1991; Stein et Engleman, 1990). La gp160 est fortement modifiée par l'addition de chaînes de sucres en embranchements (Kozarsky *et al.*, 1989, Matthews *et al.*, 1987). En fait, plus de la moitié du poids moléculaire final de la glycoprotéine de l'enveloppe est dérivée de telles additions. Ces chaînes des sucres sont coupées par une variété d'enzymes cellulaires, dont les α-glucosidases (Kozarsky *et al.*, 1989).

2-1.2.2 Fixation au récepteur CD4

Les glycoprotéines de l'enveloppe sont incorporées dans la bicouche lipidique du virion dans une configuration typique de "clou à large tête" dont le résultat est un groupement de motifs d'environ 72 protubérances par virion (Takahashi *et al.*, 1989b, Ozel *et al.*, 1988). La cartographie à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-gp120, capables de bloquer l'interaction de haute affinité (10^9 M) entre le CD4 et la gp120, ainsi que les travaux de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier, dans la région conservée C4 proche de l'extrémité C-terminale de la gp120, les résidus spécifiques associés à la fixation du CD4 (a.a. 397-439) (Olshevsky *et al.*, 1990, Sun *et al.*, 1989). Le site de fixation de la gp120 au CD4 est formé de quatre régions non contiguës de la gp120 qui sont mis en continuité grâce à la structure secondaire et tertiaire de la protéine (fig. 2) (Lasky *et al.*, 1987, Olshevsky *et al.*, 1990). Il s'agit des deux domaines hydrophobes dans les régions conservées C2 et C4 de la gp120 et des domaines hydrophiles dans les régions C3 et C4. La région de fixation du CD4 est localisée dans une structure en poche de la gp120 dont le fond hydrophobe interagit avec les acides aminés hydrophobes en saillies à la surface de CD4. La surface de cette structure en poche est hydrophile et contient trois acides aminés de charge positive. Une mutation de un de ces 3 acides aminés chargés réduit substantiellement l'affinité de la gp120 pour la molécule CD4. Il semble que ces acides aminés chargés interagissent avec les acides aminés de charges opposées, à la base de la région de fixation du CD4 (Olshevsky *et al.*, 1990, Steimer *et al.*, 1991b).

Figure 2: Structure secondaire «schématique» de la glycoprotéine de surface gp120, du VIH-1 HX10.

Les cinq régions variables de la gp120 (V1 à V5) sont séparés par cinq régions conservées. Les domaines et les résidus amino-acides impliqués dans l'interaction de la gp120 avec le récepteur CD4 sont également indiquées.
Ref. Retroviruses of Human AIDS and Related Animal Diseases. Nara, 1991

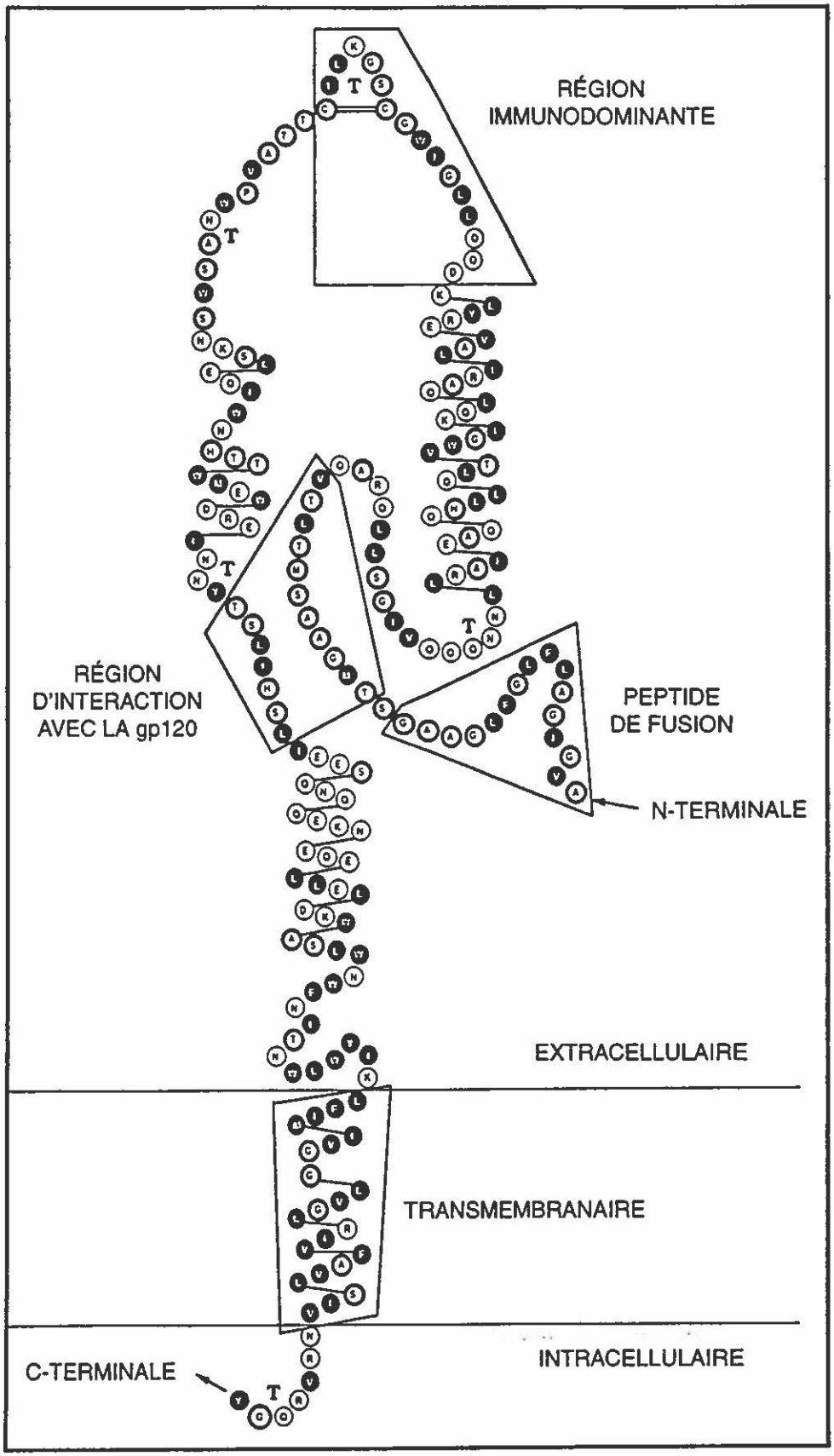

SITE DE FIXATION CD4
257
368
370
457
427
V1
V2
V3
V4
V5

2-1.3 Fusion virus-cellule

Chez les Orthomyxovirus et les Paramyxovirus, l'activité fusiogénique est déclenchée par la génération, après clivage endoprotéolytique, d'une nouvelle région N-terminale dans la glycoprotéine transmembranaire (White *et al.*, 1983). Des mécanismes similaires, suite au clivage intracellulaire de la gp160 pour générer le complexe hétérodimérique gp120/41, semblent gouverner l'entrée du VIH-1 dans les cellules cibles et la fusion cytopathique entre les cellules infectées et les cellules non infectées. En effet, les mutations affectant l'extrémité hydrophobe N-terminale de la gp41, détruisent le pouvoir de fusion des membranes, l'entrée du virus et la formation de syncitia (Freed *et al.*, 1990; Kowalski *et al.*, 1991).

Un autre événement impliquant le clivage, par des protéases cellulaires, de la boucle V3 de la gp120 semble également influencer l'entrée du VIH-1 dans les cellules (Kido *et al.*, 1990, Murakami *et al.*, 1991). La troisième région variable (V3) de la gp120 forme une boucle, grâce à la présence des résidus cystéines aux positions 301 et 336. La majorité des acides aminés de la boucle V3 sont très variables entre les différentes souches du VIH-1 à l'exception des acides aminés Gly-Pro-Gly-Arg (GPGR), à la pointe de la boucle, hautement conservée. Cette séquence qui forme un site de fixation pour les anticorps capables de bloquer l'infection et d'inhiber la fusion des cellules infectées (Rusche *et al.*, 1988, Skinner *et al.*, 1988), pourrait également contenir des sites de clivage pour les protéases cellulaires (telle la protéase TL-2 "trypsin-like") (Clements *et al.*, 1991, Kido *et al.*, 1991). Ces enzymes, lorsque présentes à la surface des cellules, clivent la gp120 après fixation au CD4. Ce clivage semble faciliter le changement conformationnel de l'enveloppe qui permet à une autre région virale, au niveau de la gp41 (fig. 3), de fusionner avec la membrane de la cellule (Sattentau et Moore, 1991). Ces observations suggèrent également que les cellules $CD4^+$ qui ne peuvent être infectées par certaines souches de VIH-1 ne possèdent pas ces enzymes protéolytiques cellulaires.

Figure 3: Modèle de la protéine transmembranaire, gp41, du VIH-1 montrant les différentes régions fonctionnelles présentes dans la portion extracellulaire de la gp41.
Ref. HIV and the Pathogenesis of AIDS. Levy, 1994


RÉGION
IMMUNODOMINANTE
RÉGION
D'INTERACTION
AVEC LA gp120
PEPTIDE
DE FUSION
N-TERMINALE
EXTRACELLULAIRE
TRANSMEMBRANAIRE
INTRACELLULAIRE
C-TERMINALE

2-1.4 Entrée de la nucléocapside virale

L'entrée du VIH-1 est dépendante de l'introduction de la nucléocapside virale dans le cytoplasme de la cellule cible. L'apparition des particules virales dans les compartiments endosomaux a suggéré dans un premier temps que l'internalisation du VIH-1 est le résultat de l'endocytose du complexe récepteur-virus dans des vésicules intracellulaires (Pauza et Price, 1988). Cette voie d'entrée est notamment empruntée par les orthomyxovirus, et est dépendante du pH bas des endosomes acides. Cependant, la neutralisation du pH "acide" des compartiments endosomaux avec des agents lysosomotropiques (e.g. chloroquinine et NH_4Cl) n'inhibent pas l'entrée de la nucléocapside virale dans le cytoplasme des cellules traitées (Stein *et al.*, 1987, McClure *et al.*, 1988). En plus, les molécules CD4 tronquées sans le domaine cytoplasmique sont capables de diriger l'infection (Bedinger *et al.*, 1988). Ces faits supportent l'hypothèse selon laquelle l'entrée du VIH-1 se produit par fusion directe des membranes du virus et de la cellule hôte, en empruntant une voie pH indépendante qui ne requiert pas l'endocytose du récepteur.

2-1.5 Conversion de l'ARN viral en ADN complémentaire (ADNc)

La conversion de l'ARN viral en ADN est l'événement central du cycle de réplication du VIH-1. Le duplex du génome viral est converti à une simple forme d'ADN double brin (Varmus, 1988) grâce à l'activité des enzymes virales, l'ADN polymérase et la ribonucléase H, présentes en multiples copies dans la particule virale. Le niveau de conversion de l'ARN viral en ADN dépend du type de cellules infectées et de l'état d'activation de la cellule. Par exemple, la conversion de l'ARN viral en ADN à lieu dans les premieres 2 à 6 heures après l'infection des cellules T $CD4^+$ en réplication (Kim *et al.*, 1989, Farnet et Haseltine, 1990). Alors que ce processus s'étend sur une plus longue période, 1 à 2 jours, après l'infection de cultures primaires de monocytes et de

macrophages. Les ADNc de l'ARN viral en présence de la protéine de la matrice virale et de l'intégrase, forment le complexe de préintégration. Ce complexe est transporté vers le noyau où l'ADN viral, sous forme circulaire, s'intègre aux chromosomes de la cellule. L'intégration du provirus semble être aléatoire mais essentielle pour la production, par les cellules, de virions progéniture (Bushman *et al.*, 1990; Muesing *et al.*, 1985).

2-1.6 Intégration de l'ADN viral

Après sa synthèse dans le cytoplasme, l'ADN viral migre vers le noyau par un moyen encore inconnu. L'ADN viral semble accéder au noyau lors de dissolution-reconstitution de la membrane nucléaire durant la division cellulaire. Cependant, le VIH-1 peut aussi infecter des cellules non-divisibles comme les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Gartner *et al.*, 1986, Langhoff *et al.*, 1991).

L'ADN viral dans le noyau peut soit s'intégrer dans l'ADN de la cellule hôte, soit se circulariser (Varmus, 1988). Les deux formes d'ADN, intégrées et circulaires, sont stables dans la cellule initialement infectée. Cependant, seules les formes intégrées se répliquent au même temps que la division cellulaire. Par conséquent, et en absence de réinfection, les formes d'ADN viral circulaires sont diluées dans les populations cellulaires. Les formes d'ADN linéaires et circulaires sont détectées dans les noyaux des cellules-T $CD4^+$ peu après l'infection (Kim *et al.*, 1989; Farnet et Haseltine, 1990). Contrairement aux formes d'ADN linéaires qui disparaissent rapidement, les formes circulaires sont stables pendant plusieurs jours et semblent servir de substrat pour la transcription de l'ARN dans les cellules au repos (Kim *et al.*, 1989; Farnet et Haseltine, 1990).

L'intégrase de 31kDa dérivée du même précurseur que celui de l'ADN polymérase et de la ribonucléase H est présente en multiples copies dans la particule virale. Elle reconnaît spécifiquement des séquences aux extrémités de l'ADN viral et possède des activités endonucléases spécifiques et non spécifiques. L'intégration du VIH-1 se fait par des liaisons covalentes entre les extrémités de l'ADN viral et de l'ADN hôte. L'ADN viral

est inséré entre 5 bases répétées de la séquence hôte, et les deux nucléotides terminaux de l'ADN du virus sont déletés à la jonction des séquences hôtes et virales (Muesing *et al.*, 1985, Bushman *et al.*, 1990). Aucun chromosome, ni site d'intégration préférentiel n'a été détecté dans l'ADN nucléaire hôte.

2-2 Expression du virus au cours de l'infection

2-2.1 Avant-propos

La réplication du VIH-1 est gouvernée par l'interaction complexe et coordonnée d'un grand nombre de facteurs viraux et cellulaires. L'ADN proviral peut rester silencieux en absence d'activation cellulaire, avec restriction du cycle de réplication. Cependant, et suite à l'activation cellulaire, des facteurs transcriptionnels de l'hôte se fixent sur les sites de reconnaissance des éléments activateurs du VIH-1, conduisant à l'induction de la transcription virale. L'expression des gènes codant pour les protéines virales régulatrices transactivent, via des mécanismes de rétro-régulation intégrés, la transcription et l'expression des gènes viraux tardifs codant pour les protéines structurales du virion. Après la traduction, les protéines virales sont soumises aux modifications post-transcriptionnelles dont le clivage, la glycosylation, la myristilation et la phosphorylation. L'assemblage de la nucléocapside du virion, composée de l'ARN génomique, des protéines virales modifiées et des enzymes, prend place dans la membrane plasmique. Les virions matures sont formés par bourgeonnement à travers la membrane cellulaire durant lequel ils acquièrent une bicouche lipidique externe contenant les glycoprotéines virale de l'enveloppe.

2-2.2 Stade précoce de l'expression virale

Les ARNm précoces produites par les cellules infectées suite à l'intégration du virus correspondent aux transcrits doublement épissés codant principalement pour les gènes

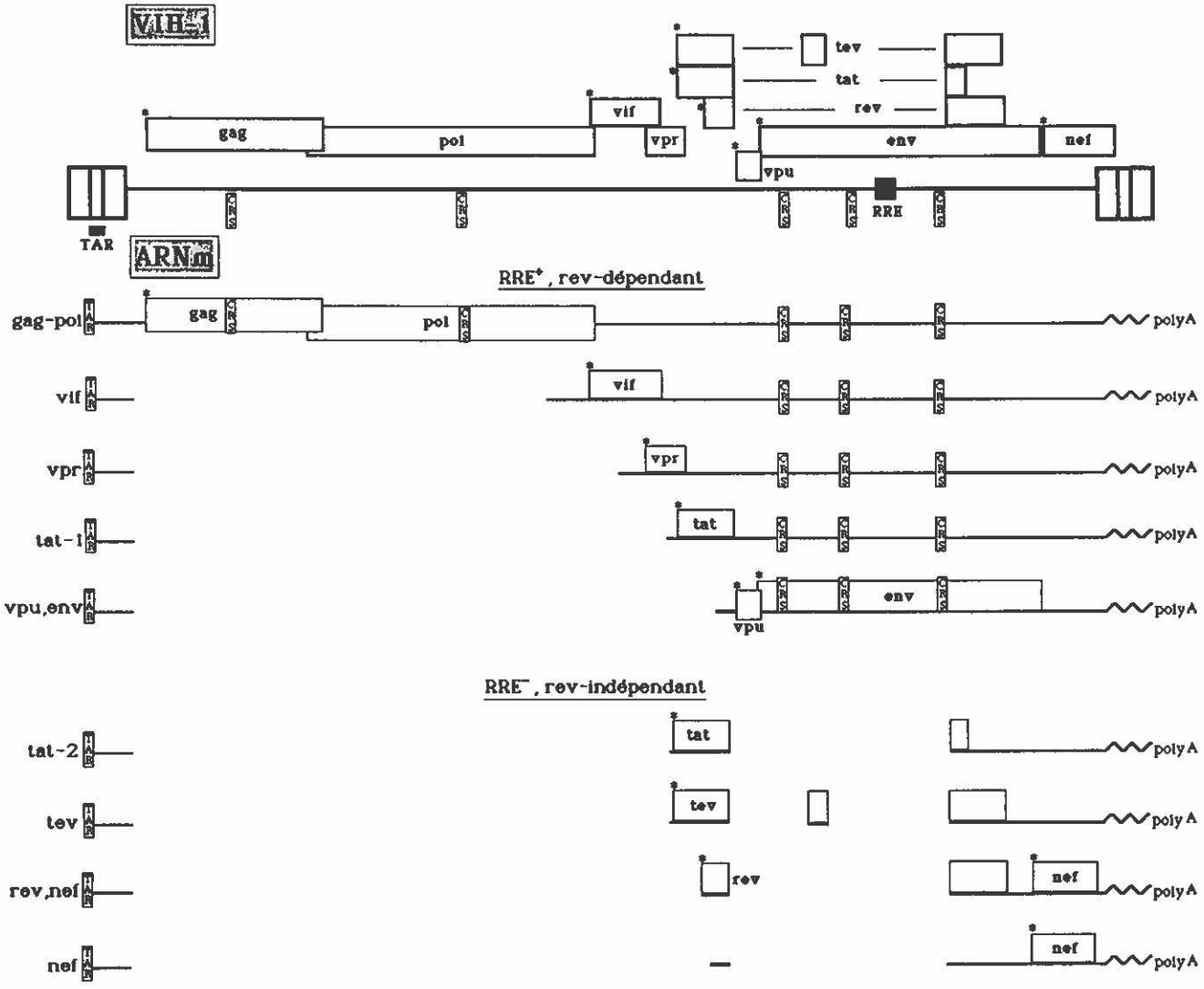
régulateurs majeurs *tat*, *rev* et *nef* (Greene, 1991; Kim *et al.*, 1989). Il semble que les ARNm *nef* représentent la majorité de ces transcrits (80%) (Robert-Guroff *et al.*, 1990). Cependant, et à cause de sa capacité de transactiver les promoteurs influençant la transcription, la protéine Tat est la première produite. Vraisemblablement, la prédominance de l'un des produits de ces deux gènes viraux détermine si l'infection au VIH-1 rentre dans un état productif ou latent. Ainsi, l'expression de la protéine Tat active substantiellement la production du virus (Dayton *et al.*, 1986, Fisher *et al.*, 1986). Au contraire, l'expression de la protéine Nef par certaines souches de virus peut induire la latence (Luciw *et al.*, 1987), dépendant de l'effet de cette protéine sur le milieu intracellulaire. La protéine Rev est responsable de l'équilibre entre l'expression des protéines Tat et Nef pour favoriser la production des ARNm non-épissés codant pour d'autres produits viraux essentiels à la production de virus infectieux (Feinberg *et al.*, 1986, Sodroski *et al.*, 1986 a,b).

2-2.2.1 Synthèse de l'ARN viral

La première étape dans l'expression du virus est la transcription de l'ARN à partir de l'ADN viral dans le noyau de la cellule infectée. L'ARN viral est produit par l'ARN polymérase II cellulaire. Le produit de la réaction de transcription est une molécule d'ARN linéaire pleine-longueur qui s'étend du bout 5' de la région R du LTR 5' jusqu'au bout 3' de la région R du LTR 3'. Les transcrits primaires contiennent des structures TAR 5' et poly A 3' terminales (fig. 4). Seul le brin sens de l'ADN viral est transcrit puis traduit en protéines virales. Deux copies de transcrits primaires pleine-longueur sont incorporées dans chaque particule virale bourgeonnante. Ces transcrits primaires forment un dimère stable qui constitue le génome de la particule virale. Les transcrits primaires pleine-longueur contiennent multiples sites d'épissage, plus de 30 différentes formes d'ARN viral épissées ont été identifiées dans le noyau des cellules infectées. Les transcrits non-épissés et épissés sont par la suite transportés vers le cytoplasme où ils servent à diriger la synthèse des protéines virales (Schwartz et al., 1990; Purcell et Martin, 1993).

Figure 4: Les ARNm produits par le VIH-1.

Les codons d'initiation AUG utilisés efficacement sont indiqués par des étoiles. Les ARNm peuvent être groupés en deux classes: les ARNm non-épissés ou partiellement épissés contenant la séquence **RRE** (*rev*-responsive element) dépendant de l'action *rev* pour leur expression et les ARNm de petites tailles avec épissage multiple ne contenant pas la séquence RRE et sont rev-indépendant.


VIH-1
tev
tat
rev
gag
pol
vif
vpr
env
nef
vpu
TAR
RRE
ARNm
RRE+, rev-dépendant
gag-pol
vif
vpr
tat-1
vpu,env
polyA
RRE-, rev-indépendant
tat-2
tev
rev,nef
nef

2-2.2.2 Contrôle cellulaire de l'expression virale

L'attachement et l'entrée du virus dans différents types de cellules peuvent être similaires, mais les événements post-pénétration diffèrent tellement que les titres des virus progéniture varient énormément. Ceci signifie que les facteurs viraux et intracellulaires contrôlant les événements post-pénétration peuvent influencer la dissémination et la pathogenèse du VIH-1 chez l'hôte (Evans *et al.*, 1987, von Briesen *et al.*, 1990). Ainsi, et bien que le LTR du VIH-1 peut à lui seul remplir la fonction de promoteur du virus, la transcription des ARNm précoces, par l'ARN polymérase II cellulaire, semble principalement compter sur la fixation au niveau du LTR de facteurs de transcription cellulaires. Il s'agit particulièrement du facteur nucléaire kappa B (NF-κB), du facteur nucléaire des cellules T-activées (NFAT), de la protéine d'activation 1 (AP-1), des protéines SP-1 et du TBP (Tat Binding Proteins) (Gaynor, 1992). Le milieu intracellulaire peut, grâce à ces facteurs de transcription cellulaires, contrôler la dominance relative des protéines régulatrices virales dans une cellule infectée.

Dans les cellules T activées, les interactions de facteurs intracellulaires avec des régions du LTR viral font partie d'un processus de transduction du signal selon lequel la fixation des antigènes ou des mitogènes au récepteur des cellules-T (CD3) et CD28 affecte l'expression génique à l'intérieur de la cellule (Garcia *et al.*, 1987, Kato *et al.*, 1991). L'activation des facteurs transcriptionnels a lieu durant ces étapes de stimulation des cellules-T. Ainsi par exemple, le NF-κB va se dissocier de son inhibiteur IκB, auquel il est normalement associé, après phosphorylation de ce dernier (IκB) par la protéine kinase C (PKC). Ceci permet la translocation du NF-κB vers le noyau pour fixer des séquences spécifiques du LTR proviral (Nolan *et al.*, 1991). La perte d'expression du NF-κB par des lignées cellulaires mutantes est associée avec une réduction de l'infection par le VIH-1 (Qian *et al.*, 1994).

Il a déjà été montré que le CD4 est physiquement associé à la protéine tyrosine kinase spécifique aux lymphocytes (PTK) $p56^{lck}$ (Sundstrom et Nilsson, 1976; Sodroski *et al.*, 1985). Ceci suggère un rôle direct du CD4 dans la transduction du signal, suite à la fixation d'un antigène au récepteur CD4, en contrôlant l'activité PTK du $p56^{lck}$ (Rudd *et al.*, 1988; Veillette *et al.*, 1988). La $p56^{lck}$ qui possède une grande variété de cibles intracellulaires, tel le récepteur de l'interleukine-2 (IL-2) (Hatakeyama *et al.*, 1991), pourrait donc affecter directement ou indirectement l'activité des facteurs cellulaires qui se fixent au LTR du VIH-1. Comme nous l'avons déjà montré (Merzouki *et al.*, 1995) dans un système d'étude de l'activation du virus, un des substrats de la $p56^{lck}$ pourrait directement ou indirectement activer le LTR du VIH-1 après fixation aux éléments régulateurs et/ou activateurs du promoteur. Certains auteurs ont montré une activation des lymphocytes $CD4^+$ après attachement de la gp120 au CD4 en constatant une augmentation des niveaux de l'inositol triphosphate intracellulaire, des niveaux de calcium, ainsi qu'une augmentation de l'expression du récepteur IL-2 (Fields *et al.*, 1988, Kornfeld *et al.*, 1988). Cependant, et jusqu'à présent, l'effet de la transduction du signal, via le CD4, sur la production du VIH-1 *in vivo* n'est pas bien connu.

Les cytokines (TNF-α en particulier) ainsi que d'autres stimuli externes peuvent également influencer l'expression du VIH-1 après interaction avec le LTR viral en agissant sur les facteurs de transactivation intracellulaires dont le NF-κB (Kinter *et al.*, 1990, Stanley *et al.*, 1989). Des virus comme le CMV et l'herpes simplex peuvent aussi augmenter la production du VIH à travers l'activation du LTR viral, un processus qui peut-être dirigé par une cytokine (Mosca *et al.*, 1987, Petersen *et al.*, 1992).

2-2.2.3 La protéine Tat

Le gène *tat* contient deux exons codants dont l'ARNm final est obtenu après épissage multiple des transcrits primaires du VIH-1. Lors des réactions d'épissage, les séquences des gènes *gag, pol,* et *vif* ainsi que la majeure partie des séquences du gène *vpr* sont excisées de l'extrémité 5' du messager. Tandis que les séquences des gènes *vpt, vpu* et la grande partie des séquences du gène *env* sont excisées de l'extrémité 3' du messager *tat*. (fig. 4) (Schwartz *et al.*, 1990).

Pour exercer son effet, la protéine Tat interagit en *trans* avec une courte séquence nucléotidique nommée **T**ransactivator **R**esponse (TAR), en forme de boucle en épingle à cheveux (Jakobovits *et al.*, 1988) présente au bout 5' du brin d'ARN naissant (Cordingley *et al.*, 1990; Weeks *et al.*, 1990). La protéine Tat agit en augmentant le niveau de transcription des ARN viraux, en stabilisant les ARNm matures et en favorisant leur traduction en protéines (Laspia *et al.*, 1989, Roy *et al.*, 1990). La protéine Tat augmente aussi, l'habilité de l'ARN polymérase II à compléter les transcrits courts qui se terminent prématurément après l'initiation efficace de la transcription (Marciniak *et al.*, 1990; Selby *et al.*, 1989; Toohey et Jones, 1989). En absence de Tat il y'a très peu d'accumulation de l'ARN viral.

2-2.2.4 La protéine Rev

Les transcrits primaires du VIH-1 sont transformés par les composantes cellulaires d'epissage à plus de 30 espèces distinctes d'ARN, qui codent chacune pour au moins une protéine (Schwartz *et al.*, 1990). Le transcrit primaire contient 2 sites d'epissage donneurs majeurs et au moins 3 sites mineurs 5'. Il contient aussi, au moins 7 sites d'épissage accepteurs majeurs et de nombreux sites mineurs (Schwartz *et al.*, 1990). La protéine virale Rev, régulatrice de l'expression des protéines du virion contrôle sélectivement

l'accumulation des ARN viraux non épissés, simplement épissés ou ayant subit un épissage multiple.

En absence de la fonction Rev les séquences des gènes *gag, pol, vif* et la majorité de la séquence du gène *vpr,* ainsi que les séquences des gènes *vpt* et *vpu* et la majorité de la séquence du gène *env*, sont excisées des ARNm qui quittent le noyau pour la traduction. Ces ARNm courts ayant subit un épissage multiple codent pour les protéines fonctionnelles Tat, Rev et Nef (fig. 4). Le gène *rev* est composé de deux exons codants dont le produit de traduction est une protéine de 20 kDa (Feinberg *et al.*, 1986, Sodroski *et al.*, 1986a). L'exon 5' chevauche le bout 3' du premier exon du *tat*, alors que le second exon chevauche l'exon codant 3' du gène *tat* et du gène *env*. Les protéines Tat et Rev ont en commun les sites d'épissage 5' et 3' qui joignent le premier et le second exon. Les séquences essentielles pour la fonction de la protéine Rev sont localisées entièrement dans le second exon.

La régulation sélective, par la protéine Rev, de l'expression des gènes viraux se fait par l'intermédiaire de deux séquences nucléotidiques appellées RRE et CRS. La séquence CRS (**C**is-acting **R**epressive **S**equence), localisée sur les ARNm des gènes structuraux (*gag, pol* et *env*) (Rosen *et al.*, 1988), agit en *cis* et prévient la traduction des ARNm viraux porteurs de cette séquence en absence d'interaction de la protéine Rev fonctionnelle avec la séquence RRE (***Rev*** **R**esponsive **E**lement) localisée sur les mêmes brins d'ARN (fig. 4) (Dayton *et al.*, 1988, Malim *et al.*, 1989).

2-2.2.5 La protéine Nef

La protéine Nef correspond au produit du cadre de lecture ouvert 3' qui commence du côté 3' de la séquence codante du gène *env* et chevauche la presque totalité de la région U3 du LTR 3' (Rosen *et al.*, 1985, Wain-Hobson *et al.*, 1985). Ce cadre de lecture code pour la protéine Nef de 25 kDa à 27 kDa qui est localisée dans le cytoplasme des cellules infectées. La protéine Nef est phosphorylée et myristilée à l'extrémité amino-terminale

(Arya et Gallo, 1988). Le site d'epissage 3' de l'ARN messager du gène *nef* est aussi le site accepteur des seconds exons des gènes *tat* et *rev*. Le codon d'initiation du *nef* est le premier codon méthionine de cette ARNm (fig. 4) (Arya *et al.*, 1985). La protéine *nef* n'est pas requise pour la réplication virale dans les cellules en culture. En effet, plusieurs souches de VIH-1, VIH-2 et SIV isolées après multiples passages en culture cellulaire sont défectives pour l'expression de la protéine Nef. Il semble que les virus *nef*-défectifs se répliquent plus rapidement dans les cellules en culture que les virus *nef* (+) (Cheng-Mayer *et al.*, 1989).

2-2.3 Stade tardif de l'expression du virus

La fonction de la protéine Rev divise l'étape d'expression du cycle de réplication du virus en deux phases. Une phase précoce durant laquelle les ARNm produits après épissages multiples sont traduits (Tat, Rev et Nef en particulier). Une phase tardive durant laquelle les ARNm pleine-longueur et simplement épissés sont traduits (fig. 4).

L'événement central dans la transition de la phase précoce à la phase tardive de l'expression, est l'accumulation de la protéine Rev fonctionnelle. Cette accumulation dépend en fait de la synthèse de l'ARNm pleine-longueur, qui sert de précurseur à l'ARNm de Rev. Alors que la synthèse de l'ARNm pleine-longueur est elle même dépendante de la fonction de la protéine Tat, dont l'expression dépend de la synthèse de petites quantités de transcrits primaires sans l'aide du promoteur du VIH-1.

2-2.3-1 Assemblage du précurseur de la capside

L'assemblage du précurseur de la capside a lieu au niveau de la surface interne de la membrane plasmique (Bryant Ratner, 1990; Gottlinger *et al.*, 1989; Pal *et al.*, 1990). L'assemblage, le bourgeonnement et la maturation de la capside ont lieu en absence des glycoprotéines de l'enveloppe (Ratner *et al.*, 1991). Les glycoprotéines de l'enveloppe,

déposées à l'extérieur de la surface de la membrane plasmique, s'assemblent aux particules virales durant le processus de bourgeonnement . Le principe qui commande l'association de la capside du virus bourgeonnant et des glycoprotéines de l'enveloppe n'est pas bien connu.

L'ARN génomique du virus est capturé par la polyprotéine précurseur de la capside grâce à une séquence appelée séquence d'encapsidation ou séquence Psi. Cette séquence est localisée sur l'ARN viral à proximité du site d'initiation du précurseur de la capside (Aldovini et Young, 1990; Lever *et al.*, 1989). Une partie de la séquence Psi est excisée de tous les ARNm épissés, ainsi seules les ARN viraux pleine-longueur sont incorporés dans les particules bourgeonnantes. Seulement deux copies de l'ARN viral sont incorporées par particule virale et ce malgré l'existence de multiples sites de fixation pour l'ARN à l'intérieur de la particule assemblée (Darlix *et al.*, 1990). C'est au moment de l'encapsidation que l'amorce ARNt s'associe étroitement à l'ARN viral (Kleiman *et al.*, 1991).

Le précurseur de la capside (Gag, p55) est clivé en quatre polypeptides majeurs. Le polypeptide p17 amino-terminal, myristilé qui reste associé à la surface de la membrane (Gelderblom *et al.*, 1987) forme la protéine de la matrice. La protéine majeure de la capside, laquelle est initialement clivée en une protéine de 25 kDa subit une maturation en une forme de 24 à 25 kDa lors d'un événement de clivage tardif (Tritch *et al.*, 1991). La protéine majeure de la capside forme une structure tubulaire autour de la ribonucléoprotéine qui contient l'ARN viral (Gelderblom *et al.*, 1987). La partie interne du core du virus contient les enzymes virales de réplication, incluant l'ADN polymérase, l'ARNase H et l'intégrase.

La région carboxy-terminale du précurseur de la capside est clivée en deux petites protéines de 9 kDa et de 6 kDa. La protéine de 9 kDa, appelée protéine de la nucléocapside, se fixe à l'ARN viral (Darlix *et al.*, 1990; Gorelick *et al.*, 1990), alors que les séquences de la protéine de 6 kDa sont requises pour la libération des particules virales à la surface des

cellules infectées (Gottlinger *et al.*, 1991).

La protéase virale, clivée à partir du précurseur Pol, en un monomère de 10 kDa (Debouck *et al.*, 1987) est active sous forme d'homodimère (Nutt *et al.*, 1988). La structure tridimensionnelle, en cristallographie par rayon X, a montré que le site actif de la protéase est créé par l'association de deux acides aspartiques. Chaque monomère de l'enzyme contient un seul acide aspartique, d'où la dimérisation pour la création d'une protéase active (Lapatto *et al.*, 1989, Navia *et al.*, 1989, Wlodawer *et al.*, 1989). La spécificité du clivage protéolytique de l'enzyme est principalement déterminée par la séquence primaire d'acides aminés et par la structure tertiaire du substrat (Navia et al, 1989, Weber *et al.*, 1989). La protéase virale clive aussi le précurseur des enzymes de réplication en ADN polymérase et intégrase de 65 kDa et 31 kDa (Lightfoote *et al.*, 1986, Mous *et al.*, 1988). Plus tard dans la maturation, l'homodimère de 65kDa est clivé en une forme de l'enzyme virale ADN polymérase-ribonucléase H de 65-51kDa. Le mécanisme d'activation de la protéase dans la particule virale assemblée n'est pas connu. Les virus défectifs pour la protéase s'assemblent et bourgeonnent à partir de la surface (Gottlinger *et al.*, 1989, Peng *et al.*, 1989), mais ne sont pas capables d'initier un second tour d'infection. Ceci suggère que la défectuosité de la protéase prévient soit la pénétration dans la cellule, après l'attachement et la fusion, soit l'accomplissement du processus de la transcription inverse.

2-2.3.2 Gènes régulateurs tardifs

Trois protéines virales, Vif, Vpr et Vpu, non identifiées chez d'autres rétrovirus, sont produites tard dans le cycle d'infection, à partir d'ARNm simplement épissés. L'accumulation des ARNm simplement épissés, tard dans l'infection, est une conséquence de la fonction Rev (fig. 4).

2-2.3.2.1 La protéine Vif

La protéine Vif de 23 kDa (Lee *et al.*, 1986, Kan *et al.*, 1986) qui se retrouve dans le cytoplasme des cellules infectées n'est pas incorporée dans les particules virales matures. La synthèse des protéines virales, l'assemblage de la capside et le bourgeonnement du virus semblent être normaux dans les virus défectifs pour le gène *vif*. Il a été rapporté que la protéine Vif augmente l'infectivité du VIH-1. Il a également été rapporté, mais non confirmé, que la protéine Vif agit comme protéase pour enlever les acides aminés carboxy-terminaux de la glycoprotéine transmembranaire de l'enveloppe, la gp41 (Guy *et al.*, 1991).

2-2.3.2.2 La protéine Vpr

La protéine Vpr est incorporée en multiples copies dans la particule virale mature (Cohen *et al.*, 1990a, Yu *et al.*, 1990). Les virus défectifs pour la protéine Vpr initient des nouveaux tours d'infection beaucoup plus lentement que les virus non défectifs (Cohen *et al.*, 1990b, Ogawa *et al.*, 1989). La protéine Vpr produite par un gène indépendant peut-être incorporée en **trans** dans une particule virale *vpr* défective. Cette protéine augmente le niveau de transcription de l'ARN à partir des promoteurs cellulaires et viraux (Cohen *et al.*, 1990a). Il semble que la présence de la protéine Vpr dans la cellule infectée augmente le niveau basal initial de la transcription du provirus permettant ainsi la synthèse des premières molécules de la protéine Tat, nécessaires aux étapes subséquentes de l'expression génique du virus.

2-2.3.2.3 La protéine Vpu

La protéine Vpu est produite à partir du même ARNm que celui de la glycoprotéine de l'enveloppe. Le codon d'initiation de la Vpu est utilisé avec presque la même fréquence que le codon AUG de la protéine de l'enveloppe, dans les réactions de traduction *in vitro*.

La protéine Vpu de 15-20 kDa, qui se retrouve dans le cytoplasme des cellules infectées n'est pas associée a la particule virale mature (Matsuda *et al.*, 1988, Strebel *et al.*, 1988). La Vpu peut affecter l'efficacité de l'assemblage et du bourgeonnement des particules virales (Klimkait *et al.*, 1990, Terwilliger *et al.*, 1989). Elle semble également aider à la dissociation des complexes gp120-CD4 formés à l'intérieur de l'appareil de Golgi (Raja *et al.*, 1994, Willey *et al.*, 1992).

2-3 Cytopathogénicité et effets cytopathogéniques du VIH-1

In vivo, la pathogenèse du VIH-1 se traduit principalement par les effets cytopathiques du virus et/ou ces protéines sur les cellules de l'hôte. La formation de cellules multinucléees (syncitia) en culture de cellules (*in vitro*) et peut-être même chez l'hôte (*in vivo*), est la caractéristique principale de l'infection au VIH-1. Les cellules infectées exprimant à leur surface les glycoprotéines de l'enveloppe virale peuvent diriger la fusion avec un grand nombre de cellules $CD4^+$ non infectées entraînant la formation de syncitia (Lifson *et al.*, 1986 a,b,c).

Le mécanisme par lequel le VIH-1 induit la formation de syncitia n'est pas complètement élucidé. Cependant, il est clair que l'induction de la fusion des cellules est directement associée aux glycoprotéines de l'enveloppe. En effet, l'expression des glycoprotéines de l'enveloppe par transfection du gène *env* , en absence de toutes autres protéines régulatrices ou structurales du VIH-1 est suffisante pour induire la formation de syncitia dans les lignées cellulaires $CD4^+$ (Merzouki *et al.*, 1994a, Sodroski *et al.*, 1986b, Tang et Levy, 1990). La formation de syncitia peut-être bloquée par certains anticorps monoclonaux anti-CD4 montrant que la cytopathologie induite par le VIH-1 est en partie gouvernée par l'interaction avec le récepteur CD4 (Truneh *et al.*, 1991, Wilks *et al.*, 1990).

L'introduction de mutations spécifiques au niveau du site de clivage de la gp160 entraîne, *in vitro*, une baisse dramatique de la formation de syncitia. Ceci montre l'importance du clivage de la gp160 par les protéases de la cellule, dans l'induction de

l'activité fusiogénique de l'enveloppe (Freed *et al.*, 1989, Bosch et Pfeiffer, 1992). En effet, la région N-terminale de la gp41, générée après ce clivage, contient une région composée presque entièrement d'acides aminés hydrophobes (Gallaher, 1987) similaire à celle impliquée dans la fusion virus-cellule chez les orthomyxovirus et les paramyxovirus (Freed *et al.*, 1990). Certaines protéines de la membrane cellulaire, telles l'intégrine et LFA-1, peuvent également être impliquées dans le processus de fusion cellule-cellule (Hildreth et Orentas, 1989). Il a été montré que des anticorps monoclonaux contre ces protéines de surface bloquent la formation de syncitia mais pas l'infection virale (Pantaleo *et al.*, 1991). L'évidence de la présence, sauf dans le cerveau, de cellules multinucléees *in vivo* n'est toujours pas bien établie (Pang *et al.*, 1990, Sharer *et al.*, 1985).

In vivo, l'effet cytopathique du VIH-1 sur les cellules CD4+ n'est pas uniquement limité à l'induction de syncitia. En fait, les lymphocytes périphériques normaux sont souvent tués sans évidence de fusion cellule-cellule. Une auto-fusion a été considérée impliquant des changements dans la perméabilité de la membrane plasmique de la cellule infectée (Bergeron et Sodroski, 1992, Somasundaran et Robinson, 1987). D'autres mécanismes qui peuvent être impliqués dans la cytopathologie virale sont: i) l'accumulation de haut niveaux d'ADN de VIH-1 non-intégré capable d'altérer la perméabilité de la membrane cellulaire (Leonard *et al.*, 1988). Dans le cerveau, les dommages neurologiques ont été associés à la présence dans les cellules de grandes quantité d'ADN viral non-intégré (Pang *et al.*, 1990); ii) la formation de complexe intracellulaire CD4-gp120 entraînant une réduction des ARNm de CD4 et des protéines dans les cellules infectées (Hoxie *et al.*, 1986), iii) la production des seconds messagers altérés, suite à la transduction du signal (Gupta et Vayuvegula, 1987); iv) l'accumulation des protéines virales incluant la gp160, gp41, Nef, et Tat, peut également causer la mort de la cellule (Perez *et al.*, 1992, Sabatier *et al.*, 1991, Sodroski *et al.*, 1986b, Werner *et al.*, 1991), v) la gp160 semble être impliquée dans l'induction de la mort programmée des cellules ou apoptose (Lu *et al.*, 1994), et, vi) la destruction auto-immune des cellules CD4+ normales ayant fixées la gp120 circulante, par

les cellules-T cytotoxiques spécifiques au VIH-1 (CTL) (Koenig *et al.*, 1988, Walker *et al.*, 1987, 1990), et par le mécanisme de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) (Blumberg *et al.*, 1987, Ojo-Amaize *et al.*, 1987). Le niveau d'implication de chacun ou de tous ces processus dans la cytopathologie causée par le VIH-1 n'est pas bien connu.

2-4 Tropisme du VIH-1

Le niveau d'expression des récepteurs CD4 semble influencer la susceptibilité de certaines cellules à l'infection par le VIH-1 (Asjo *et al.*, 1987) mais la corrélation entre l'infectivité et l'expression du CD4 n'est pas absolue. La lignée cellulaire monocytaire U937 ayant un plus haut pourcentage de cellules $CD4^+$ que la lignée de cellules-T H9, est moins susceptible à l'infection par la souche VIH-1 W13 (Kim *et al.*, 1990). Ceci est attribuée à une entrée inefficace du virus. En effet, Cann *et al.* (1990) ont montré que la réplication restreinte du VIH-1 JR-CSF (clone moléculaire) dans les lignées de cellules-T est outrepassée par la transfection directe de l'ADN proviral du VIH-1 JR-CSF dans les cellules non permissives.

L'entrée inefficace du VIH-1 dans des cellules $CD4^+$ telles les lymphocytes $CD4^+$ au repos ou les monocytes $CD4^+$ non-différenciés peut être due à l'absence de récepteurs secondaires nécessaires à l'infection par le VIH-1. Des protéines de surface de la cellule qui réagissent avec des régions de la gp41 ou avec la boucle V3 ont déjà été décrites et peuvent être les présumées molécules "récepteurs" de fusion (Henderson et Qureshi, 1993, Murakami *et al.*, 1993). Les travaux de Callebaut *et al.* (1993) supportent le rôle possible de la molécule CD26 comme récepteur secondaire pour le VIH-1. Cependant, le fait que le CD26 est un nouveau récepteur pour le VIH-1 ne fait pas l'unanimité. En particulier depuis qu'il a été démontré que les anticorps contre le CD26 n'inhibent pas la fusion cellule-cellule (Stamatatos *et al.*, 1994) et que des lignées de cellules-T humaines (e.g., Jurkat, HUT 78) qui n'expriment pas le CD26 sont hautement susceptibles à l'infection par le VIH-1.

Le VIH-1 peut également infecter des variétés de cellules avec un niveau d'expression de CD4 non détectable. Il s'agit par exemple des cellules B, des cellules NK, des cellules folliculaires dendritiques, des cellules endothéliales de la moelle osseuse, des cellules gliales, des oligodendrocytes, des astrocytes, des fibroblastes, des cellules de Langerhans, des cellules coloréctales, des cellules tubulaires rénales, des hépatocytes, des cellules de la rétine et des cellules de la prostate (Barboza *et al.*, 1992, Cao *et al.*, 1990, Cheng-Mayer *et al.*, 1990, Chehimi *et al.*, 1991, Clapham *et al.*, 1989, Patterson et Knight, 1987, Tateno *et al.*, 1989). L'entrée et la réplication du VIH-1 dans ces cellules *in vitro* est généralement inefficace.

L'infection par le VIH-1 de cellules $CD4^-$ peut être due à la présence d'un récepteur cellulaire alternatif pour le VIH-1. Il s'agit par exemple de la molécule glycolipide Galactosyl Ceramide (GalC) identifiée à la surface des cellules $CD4^-$ dérivées du cerveau, et qui est utilisé comme récepteur alternatif par le VIH-1 (Harouse *et al.*, 1991). Le récepteur GalC a été également associé à l'infection des cellules dérivées de l'intestin (Yahi *et al.*, 1992).

La molécule d'adhésion LFA-1 peut également offrir un mécanisme alternatif pour l'entrée du virus via la fusion cellule-cellule qui permet le transfert du virus de cellule à cellule (Hansen *et al.*, 1991, Hildreth et Orentas, 1989). D'autre part, Curtis *et al.* (1992) ont rapporté que les lectines fixant le mannose associées à la membrane des cellules placentaires $CD4^-$ pourraient servir de récepteur alternatif pour l'entrée du virus. Ceci concorde bien avec le fait que la gp120 du VIH-1 contient des concentrations élevées de mannose (Hansen *et al.*, 1991).

Le VIH-1 peut également infecter les cellules par des mécanismes qui prennent avantage de la réponse immunitaire de l'hôte à l'infection. En effet plusieurs études ont montré que le phénomène ADE "(antibody dependent enhancement)" associé à l'infection au VIH-1 a lieu suite à la réponse humorale. Ce phénomène implique vraisemblablement la fixation de la portion Fab des anticorps non-neutralisants à la surface du virion et le

transfert du virus dans la cellule à travers le récepteur du complément ou le récepteur Fc (Homsy *et al.*, 1989, Laurence *et al.*, 1990, Reisinger *et al.*, 1990).

Une autre hypothèse a été émise pour expliquer les mécanismes qui gouvernent l'infection des cellules $CD4^-$ et selon laquelle l'élargissement du tropisme cellulaire est dû à l'apparition de virus pseudotypes. Ces virus pseudotypes surgissent lors de l'étape d'assemblage durant laquelle les glycoprotéines de l'enveloppe sont échangées entre deux virus enveloppés sans aucune parenté. Il en résulte des virions avec une mosaïque de glycoprotéines de l'enveloppe.

De nombreuses études indiquent que le VIH-1 peut former des virus pseudotypes dans les cellules infectées avec le virus de la léucemie murine xénotropique (MLV) (Lusso *et al.*, 1990), et amphotropique (AMLV) (Chesebro *et al.*, 1990, Spector *et al.*, 1990), le virus de la stomatite vésiculaire (Dalgleish *et al.*, 1984, Maddon *et al.*, 1986, Zhu *et al.*, 1990), le virus herpes simplex (Zhu *et al.*, 1990), et le virus de la léucemie humaine des cellules T (HTLV) (Clapham *et al.*, 1984, Landau *et al.*, 1991).

Les virus pseudotypes n'ont pas été isolés chez les individus infectés par le VIH-1. Cependant, la fréquence d'infections multiples avec le HTLV, le cytomégalovirus (CMV), le virus d'Epstein-Barr (EBV), le virus herpes humain type-6 (HHV-6) et d'autres virus, (Fiala *et al.*, 1986, Lee *et al.*, 1989, Salahuddin *et al.*, 1986) durant l'infection par le VIH-1 suggèrent que ces pseudotypes peuvent émerger et comptent en partie dans la dissémination du virus dans les cellules $CD4^-$.

Il a été montré récemment que les chémokines et leur récepteurs, qui appartiennent à la superfamille des récepteurs hétérodimériques "GTP-binding protein" (protéine G), peuvent jouer un rôle très important dans la régulation de l'infection au VIH-1. En effet, Berson *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996 ont montré que le récepteur C-C chémokine LESTR/Fusine agit comme co-récepteur avec la molécule CD4 pour l'entrée dans les cellules des souches de

VIH-1 cellules-T tropique (cofacteur de fusion), mais ne peut cependant agir comme co-récepteur pour l'entrée des souches de VIH-1 macrophage-tropique. Alkhatib *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996 ont montré que le récepteur CCR5 des β-chémokines qui est en fait le récepteur cellulaire principal pour les chémokines RANTES, MIP-1α et MIP-1β, agit comme co-récepteur pour l'entrée des souches de VIH-1 macrophage-tropique.

Ces chémokines, capables de supprimer l'infection au VIH-1 (Cocchi *et al.*, 1995), sont produites à des niveaux élevés par les cellules $CD8^+$ de patients infectés par le VIH-1 et par les cellules $CD4^+$ d'individus, à hauts risques et longues termes séronégatifs, qui semblent être réfractaires à l'infection *ex vivo* par le VIH-1 (Feng *et al.*, 1996). Le mode d'action des β-chémokines n'est pas bien connu mais pourrait impliquer une inhibition compétitive des interactions récepteur-VIH-1 et/ou de l'initiation des voies de signalisation cellulaire qui se traduit par une dissémination limitée du virus. Cependant, il a été montré que la boucle V3 de la gp120 est impliquée dans le tropisme cellulaire et dans la sélection du co-récepteur (Ashorn *et al.*, 1990; Broder *et al.*, 1993; Broder et Berger, 1995; Choe *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996).

L'identification des récepteurs C-C ou β-chémokines (LESTR/Fusine, CCR2, CCR3, CCR5) comme co-récepteurs (cofacteurs) pour l'entrée dans les cellules des souches de VIH-1 cellules-T et macrophage-tropiques est d'une grande importance pour la compréhension des bases moléculaires du tropisme viral qui pourrait offrir de nouvelles voies pour le développement de stratégies antivirales (Alkhatib *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996).

3- Variabilité génétique et diversité

L'une des caractéristiques majeures des VIH, est leur diversité génétique qui touche en particulier le gène de l'enveloppe. Cette variabilité est en partie responsable des difficultés rencontrées pour le développement d'un vaccin efficace et probablement des divergences dans les propriétés biologiques des différents isolats. Il n'est toujours pas bien défini comment des souches de VIH-1 avec des propriétés biologiques différentes peuvent surgir au cours de l'infection, par contre il est bien connu que les erreurs introduites par la transcriptase inverse participent sûrement et activement dans le changement des génomes (Preston *et al.*, 1988, Roberts *et al.*, 1988, Takeuchi *et al.*, 1988). Des changements qui peuvent atteindre 10 paires de bases par génome viral par cycle de réplication (Preston *et al.*, 1988).

La distribution et le degré de variabilité n'est pas uniforme sur tout le génome viral. Le gène *env* est le plus variable, alors que les gènes *gag* et *pol* sont relativement conservés. A l'intérieur du gène *env*, la fréquence de variation est plus importante dans des régions appelées domaines variables (V1 à V5) par rapport aux régions appellées domaines conservés (C1 à C6) (Modrow *et al.*, 1987). Les changements dans le gène *env* correspondent à des délétions, insertions et/ou duplications, contrairement aux changements observés dans les régions plus conservées comme *gag* et *pol*, où ils correspondent largement à des mutations ponctuelles. En plus, les changements d'un simple nucléotide dans le gène *env* touchent fréquemment le premier ou le second nucléotide du codon, conduisant à des substitutions d'acides aminés non-silencieuses (mutations non-synonymes). De même les changements dans la troisième position du codon peuvent être également associés à des changements d'acides aminés, contrairement à ceux dans le gène *gag*, le plus souvent silencieux (mutations synonymes).

Le haut niveau de mutation des séquences et l'évidence d'une diversité génotypique à l'intérieur d'isolats séquentiels (Saag *et al.*, 1988), suggèrent que le VIH-1 évolue

rapidement et continuellement *in vivo* comme population hétérogène de variants proches mais non identiques appelés "quasi-espèces".

Des variants de VIH-1 (isolés chez un même individu) avec des activités biologiques divergentes ont été identifiés suggérant que les changements génotypiques peuvent influencer les propriétés fonctionnelles du virus (Fisher *et al.*, 1988, Sakai *et al.*, 1988). Une corrélation a également été montrée entre l'émergence, *in vitro*, de variants de VIH-1 plus cytopathogènes et la progression de la maladie, il s'agit de variants ou "quasi-espèces" inducteur de syncitia (SI) (Cheng-Mayer *et al.*, 1988; Cornelissen *et al.*, 1995; de Jong *et al.*, 1992a, b; Fouchier *et al.*, 1992; Kuiken *et al.*, 1995). Contrairement aux variants VIH-1 isolés chez les patients asymptomatiques, qui se répliquent lentement et produisent peu de virus en culture cellulaire (variants ou "quasi-espèces" non-inducteur de syncitia, NSI), les virus isolés chez les patients durant les stades avancés de la maladie, se répliquent rapidement et produisent des titres élevés de virus en culture cellulaire (Asjo *et al.*, 1986, Camerini *et al.*, 1994, Fenyo *et al.*, 1988; Roos *et al.*, 1992).

Koot *et al.* (1993) ont rapporté que l'apparition dans le sang de tels variants SI, avec un tropisme élevée pour les cellules-T, peut prédire la progression vers le SIDA dans un intervalle de deux ans. D'autres études ont confirmé que la présence chez les individus de virus SI durant l'infection primaire est en corrélation avec la dépletion accélérée des cellules $CD4^+$ et la progression rapide de la maladie (Donaldson *et al.*, 1994, Nielsen *et al.*, 1993, Roos *et al.*, 1992). Camerini et al. (1994), en utilisant des implants de thymus foetal dans les souris SCID-humanisés ont montré que la destruction de ce tissu est plus rapide en présence de virus SI qu'en présence de virus non-inducteur de syncitia (NSI).

La présence de variants VIH-1 de phénotype SI a été associée au déclin rapide des cellules $CD4^+$, caractéristique de la progression de la maladie (Donaldson *et al.*, 1994, Koot *et al.*, 1993, Nielsen *et al.*, 1993, Roos *et al.*, 1992). Cependant, les individus infectés par des variants NSI peuvent également subir, avec le temps, la chute de leur cellules $CD4^+$ et la progression vers la maladie (Richman et Bozzette, 1994). Ces observations semblent

converger vers le fait qu'il serait peut-être plus important de considérer la vitesse et le niveau de réplication du virus plutôt que sa cytopathogénicité, pour expliquer l'altération de la fonction des cellules-T et les pertubrations graduelles du système immunitaire associées à la progression de l'infection vers le stade SIDA.

Groenink *et al.* (1991) ont montré que la capacité des clones moléculaires (dérivés d'un isolat unique) à induire la formation des syncitia ou à présenter un tropisme pour les cellules-T sont des propriétés qui peuvent être discernées au niveau clonal. Ces travaux supportent le fait que les isolats du VIH-1 contiennent de multiples génotypes viraux qui, dépendamment de la nature et de l'importance de la diversité génétique, peuvent contribuer à modeler le phénotype biologique du virus (de Jong *et al.*, 1992a, b; Fouchier *et al.*, 1992; Kuiken *et al.*, 1995; Cornelissen *et al.*, 1995).

De nombreuses études ont démontré que la région de l'enveloppe contient les séquences génétiques primaires responsables du tropisme et de la cytopathologie du virus (Arya et Sadaie, 1993, Cann *et al.*, 1990, Carrillo *et al.*, 1993, Cheng-Mayer *et al.*, 1990, Chesebro *et al.*, 1991, Liu *et al.*, 1990, O'Brien *et al.*, 1990, Shioda *et al.*, 1992, York-Higgins *et al.*, 1990). Shioda *et al.*, (1992) ont montré que le changement de trois acides aminés dans la boucle V3 de la gp120 (positions 311, 319, et 323) confère à des souches de VIH-1 normalement cellules-T tropique, un tropisme pour les macrophages. De leur côté Carrillo *et al.* (1993) ont réussi a éliminer complètement le tropisme pour les cellules-T de certains isolats viraux en remplaçant leur boucle V3 par la boucle V3 de variants ayant un tropisme pour les macrophages.

4- Quantification de l'infection *in vivo*

L'infection primaire par le VIH-1 est caractérisée par une phase aiguë de la maladie, et pendant une courte période précédant la séroconversion, le virus est détecté dans le fluide cérébro-spinal, dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) et dans le plasma (Albert *et al.*, 1987, Daar et al., 1991, Gaines *et al.*, 1987, Goudsmit *et al.*, 1986). Un haut niveau de virus infectieux a rarement été démontré dans le plasma et les PBMC durant l'infection primaire. Le déclin rapide de la quantité de virus libres et de virus associés aux cellules observé à la séroconversion, témoigne du développement chez l'hôte de réponses immunes effectives capables de limiter la réplication virale (Daar *et al.*, 1991). Cependant, plusieurs travaux et en particulier ceux de Fauci (1993) et Pantaleo *et al.*, (1993b) ont mis à jour d'autres facteurs pouvant expliquer la charge virale faible dans le système périphérique durant les stades précoces de l'infection. Ces faits suggèrent que le VIH-1 est séquestré dans les nodules lymphatiques à travers le réseau des cellules dendritiques folliculaire (formant peut-être des complexes avec le complément et/ou les anticorps). En effet, Nuovo *et al.* (1994a,b) ont montré la présence de VIH-1 dans 20% des cellules dendritiques folliculaires, $CD21^+$. Ces cellules dendritiques folliculaires sont en contact très étroit avec les lymphocytes. Ainsi, et avec la progression vers la maladie, les nodules lymphatiques s'atrophient et les virus et les cellules $CD4^+$ infectées sont relâchées dans le sang périphérique (Fauci, 1993; Nuovo *et al.*, 1994a,b; Pantaleo *et al.*, 1993b)

La relation entre la charge virale et le statut immunologique des individus infectés par le VIH-1 a été intensivement étudiée. Simmonds *et al.* (1990b) ont montré, en utilisant la technique PCR, que la fréquence moyenne de PBMC porteurs de provirus est de l'ordre de 1 dans 8 000 cellules. Cette fréquence est plus faible chez les patients asymptomatiques (1 dans 6 000 à 1 dans 80 000 cellules) que chez les patients au stade SIDA (1 dans 770 à 1 dans 3 300 cellules). La fréquence des cellules-T $CD4^+$ contenant l'ADN du VIH-1 a été

estimée à au moins 1 dans 100 cellules chez les patients au stade SIDA, et de 1 dans 100 à 1 dans 100 000 cellules chez les patients asymptomatiques.

Ho *et al.* (1989) ont montré que la fréquence de PBMC infectées a passé de 1 dans 50 000 cellules chez les patients asymptomatiques à environ 1 dans 400 cellules chez les patients au stade SIDA. Alors que des travaux utilisant la technique de qc-PCR ont montré que le nombre de cellules CD4+ infectées dans le sang est de l'ordre de 1 dans 10 chez certains patients au stade SIDA et peut atteindre 1 dans 1 000 chez certains individus asymptomatiques (Hsia et Spector, 1991, Schnittman *et al.*, 1989). Bagasra *et al.* (1992) et Patterson *et al.* (1993), ont montré, en utilisant la technique d'hybridation PCR-*in situ*, que chez les patients symptomatiques 1 PBMC sur 10 est infectée. Ces observations augmentent énormément le nombre de cellules pouvant être considérées comme cibles pour l'infection par le VIH-1 et confirme par conséquent la nature polytropique du virus.

Les études par PCR ont établi la présence de haut niveaux de VIH-1, en particulier dans les lymphocytes CD4+ et les nodules lymphatiques des individus infectés (Embretson *et al.*, 1993, Nuovo *et al.*, 1994a,b, Pantaleo *et al.*, 1993a). Avec environ 500 milliards à 1000 milliards de cellules blanches dans l'organisme, certains auteurs estiment que chez les individus infectés asymptomatiques, 20 à 30% de ces cellules (principalement des CD4+) peuvent être infectées par le VIH (Embretson *et al.*, 1993, Pantaleo *et al.*, 1993a). Cependant, en mesurant le niveau de transcription de l'ARN viral, il a été suggéré que la majorité de ces cellules infectées ne produisent pas le virus. En fait, seule 1 dans 300 à 1 dans 400 cellules infectées dans les nodules lymphatiques des individus asymptomatiques semble produire le virus (Embretson *et al.*, 1993, Pantaleo *et al.*, 1993a). La relation entre les cellules CD4+ infectées dans le sang et la quantité des cellules porteuses du VIH dans l'organisme (e.g. tissu lymphoïde) n'est pas bien définie. Fauci (1993) et Pantaleo *et al.* (1993a) ont alors suggéré que le sang ne représente qu'une très petite fenêtre sur la dynamique de l'infection et la charge virale chez l'hôte, en particulier durant la période asymptomatique (Piatak *et al.*, 1993). Effectivement les derniers travaux de Ho *et al.*,

(1995) et de Wei *et al.*, (1995) sur la dynamique de l'infection par le VIH-1 et la rotation de la population virale, supportent ces faits et en fournissent de nouvelles interprétations.

Contrairement à ce qu'il était généralement accepté Ho *et al.* (1995), ainsi que Wei *et al.* (1995) ont montré que l'infection au VIH-1 n'est pas une infection latente au réveil tardif, mais plutôt une infection qui obéit à un processus dynamique au cours duquel jusqu'à 10 milliards de particules virales sont relâchés dans la circulation chaque jour. Un nombre équivalent de virus est éliminé par le système immunitaire. Cependant et grâce à la rapidité de la rotation de la population virale, la moitié des virus éliminés sont remplacés en 6 heures (la demi-vie des virus est de 6 heures), alors qu'il faudrait en moyenne 1 à 2 jours pour qu'une de ces nouvelles particules virales infecte une nouvelle cellule (la demi-vie des cellules infectées est de un jour et demi). Avec cette vitesse de rotation de la population virale, et vu le taux de mutation du VIH, il a été estimé qu'une mutation virale se produit chaque jour. Certaines de ces mutations confèrent une résistance aux traitements antiviraux.

Wei *et al.* (1995) ont démontré que la majorité des cellules infectées, 400 à 800 cellules par million, contiennent des virus défectifs incapables de se répliquer, par rapport à une faible quantité de cellules actives, 10 à 20 cellules par million, porteuses de virus infectieux et capables de se répliquer. La demi-vie des cellules actives est de moins de 5 jours, il existe donc un troisième groupe de cellules de taille très restreinte, environ 0,3 cellules par million, qui contient du virus latent mais qui peut s'activer ultérieurement. Ces cellules, même très peu nombreuses, pourraient suffire à relancer le processus infectieux, et l'évolution vers la maladie, dans le cas où toutes les cellules infectées et activées sont détruites par le système immunitaire ou par un traitement antiviral.

5- Réponse immunitaire à l'infection au VIH-1

5-1 Avant-propos

L'infection au VIH-1 entraîne le plus souvent la génération de réponses immunitaires antivirales humorales et cellulaires polyvalentes. Certaines de ces réponses persistent à travers la progression de la maladie, alors que d'autres succombent aux formes variées de suppression immunes qui marquent la progression vers le SIDA. Les effets antiviraux majeurs des anticorps sont attribués à leur propriétés de neutralisation et à leur habilité à diriger la cytotoxicité dépendante des anticorps après fixation aux cellules effectrices (NK/K). Les lymphocytes T-cytotoxiques spécifiques au VIH-1 représentent une partie importante des réponses immunitaires contre le VIH-1, et sont présentes chez un pourcentage élevé de patients. Cependant, les mécanismes immunitaires impliquant des cellules effectrices peuvent avoir un double rôle. Le premier est protecteur lors de la réponse initiale à l'infection et durant laquelle ces mécanismes sont désignés à neutraliser le VIH libre et à éliminer les cellules infectées. Le second est pathogénique lors de la phase chronique de l'infection, où ces mêmes mécanismes peuvent être impliqués dans l'élimination des cellules infectées par le VIH (i.e. les cellules-T CD4, cellules dendritiques folliculaires et les macrophages) aidant à la détérioration progressive du système immunitaire.

5-2 Réponse humorale

Dans le cas du VIH-1, la séroconversion peut avoir lieu quelques jours après l'infection. Chez certains individus, les anticorps antiviraux sont détectés (réponse IgM) six jours après l'infection (Cooper *et al.*, 1985, Gaines *et al.*, 1988). Par la suite des niveaux IgG peuvent être démontrés, généralement dans un intervalle de deux semaines. Chez certains individus, les anticorps de séroconversion n'apparaissent que plusieurs mois après

l'infection (Gaines *et al.*, 1987, Horsburgh *et al.*, 1989, Tindall et Cooper, 1991). Les anticorps anti-p24 apparaissent dans les deux premières semaines de l'infection aiguë et atteignent leur niveau le plus élevé durant le stade asymptomatique avant de chuter avec la progression de l'infection à des niveaux généralement non-détectables (Clark *et al.*, 1991, Daar *et al.*, 1991).

5-2.1 Anticorps neutralisants anti-VIH-1

Les anticorps neutralisants anti-VIH-1 bloquent l'infection en inhibant l'interaction gp120-CD4, en inhibant la fusion des membranes virales et plasmiques et en empêchant l'entrée de la nucléocapside virale dans la cellule (Berman *et al.*, 1990, Emini *et al.*, 1990, Girard *et al.*, 1991). Les anticorps neutralisants peuvent être spécifiques au type (neutralisent un type unique de VIH-1 ou des types apparentés) (Palker *et al.*, 1988, Goudsmit *et al.*, 1988a) ou spécifiques au groupe (neutralisent plusieurs types de VIH-1, sans tenir compte du degré de diversité de leur séquences primaires) (Weiss *et al.*, 1986). Au moins 5 régions de l'enveloppe virale semblent être impliquées dans la neutralisation du VIH-1. Quatre régions de la gp120 et la région immunodominante de la gp41 (Goudsmit *et al.*, 1988a, Ho *et al.*, 1991, Palker *et al.*, 1988, Putney *et al.*, 1986, Rusche *et al.*, 1988, Weiss *et al.*, 1986).

Le domaine immunodominant principal de neutralisation, le PND, de la gp120 se trouve dans la portion centrale (couronne) de la boucle V3 (a.a. 308-322) (Broliden *et al.*, 1991 et 1992, Javaherian *et al.*, 1989, LaRosa *et al.*, 1990a,b). Les anticorps dirigés contre le PND inhibent l'infection en empêchant le clivage de la gp120, et par conséquent son changement conformationnel requis pour l'entrée virale dans la cellule, et la fusion des cellules infectées (Clements *et al.*, 1991, Kido *et al.*, 1990). Des anticorps contre le PND n'ont pas réussi à neutraliser des mutants ayant la même séquence de la boucle V3, mais avec des changements au niveau d'autres régions de la gp120 (Klasse *et al.*, 1993, Willey *et al.*, 1989). Ceci suggère la présence, en même temps, des épitopes linéaires et

conformationnels au niveau de la boucle V3.

La seconde région de neutralisation majeure sur la gp120 est le domaine de fixation de la gp120 au récepteur CD4 (a.a. 413 à 447) (Lasky *et al.*, 1987). Les anticorps contre cette région neutralisent un grand nombre de souches différentes de VIH-1, même avec des boucles V3 différentes (Kang *et al.*, 1991, Pinter *et al.*, 1993, Steimer *et al.*, 1991b). Ces anticorps sont dépendants de la conformation, et reconnaissent des épitopes discontinus sur la gp120 impliqués dans l'interaction avec le récepteur CD4 (Moore et Ho, 1993, Steimer *et al.*, 1991b, Thali *et al.*, 1992). Le troisième et le quatrième site majeur de neutralisation sur la gp120 se retrouvent au niveau des régions V1 et V2 (Fung *et al.*, 1992, Haigwood *et al.*, 1990, McKeating *et al.*, 1993). Les déterminants semblent être linéaires et conformationnels, et sont reconnus par des anticorps dirigés contre des épitopes glycosylés et non-glycosylés (Ho *et al.*, 1991, McKeating *et al.*, 1993).

Le rôle et l'intérêt clinique de ces anticorps neutralisants n'est pas très clair. Chez certains individus infectés, les anticorps neutralisants rencontrés dans le plasma peuvent être dirigés contre les isolats viraux précoces et non pas contre les isolats présents au moment de la collecte du plasma, suggérant une reconnaissance tardive du VIH-1 par le système immunitaire (Wrin *et al.*, 1994). En plus, les changements du virus en réponse à la pression immunitaire, pour échapper à la neutralisation font que ces anticorps neutralisants, peut-être efficaces au début de l'infection, ont moins d'effet durant les stades tardifs de l'infection (Arendrup *et al.*, 1992, McKeating *et al.*, 1989, Nara *et al.*, 1990, Reitz *et al.*, 1988)

5-2.2 Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

Un mécanisme de défense immunologique opérationnel, et semble-t-il très efficace, contre les infections virales et les tumeurs est la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). Lors de cette réaction, les anticorps, spécifiques des antigènes vont se

fixer à des structures de surface de cellules cibles, entraînant leur déstruction, non restreinte au CMH, par des cellules effectrices $CD16^+$ exprimant le récepteur Fc.

Dans les cas de l'infection au VIH-1, les anticorps ADCC anti-VIH-1 sont parmi les premiers à apparaître chez les patients récemment séroconvertis (2 à 12 mois après la séroconversion) (Bolognesi, 1988; Goudsmit *et al.*, 1988a,b), contrairement aux anticorps neutralisants qui apparaissent plus tard et qui sont initialement spécifiques à l'isolat. Les anticorps ADCC dirigent, dès le début de l'infection, la lyse des cellules cibles infectées par des isolats viraux divergents (Ljunggren *et al.*, 1989a; Lyerly *et al.*, 1987a,b). Ceci est d'autant plus important depuis qu'il a été établi que la transmission du VIH-1 à l'intérieur des groupes à risque se produit à travers une combinaison de virus libres et de cellules allogéniques infectées. L'ADCC peut ainsi aider à éliminer de la circulation les cellules hétérologues infectées avec une large variété d'isolats viraux.

Seules les cellules activées exprimant les antigènes de surface du VIH-1 peuvent servir de cibles pour l'ADCC (Koup *et al.*, 1989, Tanneau *et al.*, 1990). Ainsi les anticorps ADCC spécifiques au VIH-1 principalement des IgG1 (Ljunggren *et al* ., 1988), se fixent aux antigènes viraux (gp120/41) présents à la surface des cellules infectées, qui sont alors tuées par les cellules effectrices (NK/K). Alors que seules les glycoprotéines de l'enveloppe (gp120/41) semblent servir de cibles pour les anticorps ADCC, aucune corrélation n'a été établie entre le pouvoir de neutralisation et l'habilité des sérums de patients à diriger l'ADCC. Ceci suggère que les épitopes servant de cibles pour l'ADCC sont distincts des épitopes de neutralisation (Böttiger *et al.*, 1988). Le fait que l'activité antivirale de la réponse ADCC est plus importante chez les patients asymptomatiques que chez les patients à des stades avancés de la maladie suggère un rôle protecteur de l'ADCC chez les individus séropositifs (Blumberg *et al.*, 1987, Ahmad *et al.*, 1994, Ahmad et Menezes, 1995, 1996, Merzouki *et al.*, 1994a, Rook *et al.*,1987; Tyler *et al.*,1990a). Cependant, le niveau d'implication de la réponse ADCC dans le maintien de l'état asymptomatique et son rôle durant la progression de l'infection sont encore mal définis. En

plus, il a déjà été montré qu'il y a une perte d'habilité des anticorps neutralisants à neutraliser leur virus autologues, des mois après l'infection avec le VIH-1, peut-être due à des événements de mutations dirigés par les antigènes viraux. Pour l'ADCC, il reste encore à évaluer si les cellules effectrices et le sérum d'un même patient sont capables de diriger une activité d'ADCC contre des cibles autologues exprimant les souches virales autologues à différents stades de l'infection.

La cartographie, à l'aide d'anticorps monoclonaux de souris (IgG1) (Broliden *et al.*, 1990) et d'anticorps monoclonaux chimères souris-humain (Liou *et al.*, 1989), a permis de localiser deux épitopes ADCC au niveau de la région V3 de la gp120 dont les séquences en acides aminés sont **RIQRGPGRAFVTIGK** (a.a. 308-322) et **RKSIRIQRGPGRAFY** (a.a. 304-324). Forthal et al. (1995) ont montré, en utilisant un anticorps monoclonal humain (IgG1λ), que la séquence de l'épitope ADCC au niveau de la région V3 se réduit à la séquence **GRAF**. À remarquer, cependant que la séquence **GRAF** se trouve dans la région intersection des deux épitopes ADCC déja cartographiés au niveau de la région V3.

Lyerly *et al.* (1987b) ont localisé un épitope ADCC d'environ 40 acides aminés au niveau de la région C-terminale de la gp120, en étudiant les profils d'adsorption d'anticorps anti-gp120 à la protéine recombinante pEnv9. L'utilisation d'anticorps monoclonaux humains (IgG1λ et IgG3λ) par Forthal *et al.* (1995), a montré que l'épitope ADCC à l'extrémité C-terminale de la gp120 se réduit à 7 acides aminés (a.a. 503-509). Deux autres épitopes ADCC ont été cartographiés au niveau de la gp41, à l'aide d'anticorps monoclonaux humains (IgG1κ et IgG2κ) (Broliden *et al.*, 1992; Forthal *et al.*, 1995). Le premier est localisé dans la région immunodominante de la gp41 (a.a. 579-604) alors que le second est localisé dans une région plus conservée de la gp41 (a.a. 644-663).

5-3 Réponse cellulaire

L'immunité cellulaire est présente chez les individus exposés au VIH avant l'immunité humorale (Clerici *et al.*, 1992, 1994). En effet, Clerici *et al.* (1992, 1994) ont détecté des réponses prolifératives des cellules-T-auxiliaires spécifiques aux peptides VIH, peu de temps après l'infection aiguë mais avant que la séroconversion ne prenne place. En plus, d'autres auteurs ont montré une activité anti-VIH des cellules $CD8^+$ chez les individus infectés, avant la séroconversion. Cette réponse des cellules $CD8^+$, capable de supprimer la réplication du VIH, apparaît avant la détection des anticorps neutralisants et pendant la diminution de la virémie. Ceci suggère que l'immunité cellulaire constitue le premier mécanisme de contrôle de la réplication du VIH, immédiatement après l'infection.

5-3.1 Réponse des lymphocytes-T et la fonction des cellules $CD4^+$

Les épitopes reconnus par les cellules T-auxiliaires ont été identifiés sur les protéines Env, Gag et Pol du VIH-1. Cependant, peu de ces épitopes sont immunodominants même s'ils sont fréquemment reconnus par les cellules-T de patients infectés et d'animaux immunisés. L'activité cytotoxique des cellules $CD4^+$ est dirigée contre les cellules infectées, ou les cellules exprimant des peptides de VIH en association avec les molécules polymorphiques du CMH classe II (Hammond *et al.*, 1993, Orentas *et al.*, 1990). Cette réponse est généralement associée aux cellules $CD4^+$ de type TH-1 (Del Prete *et al.*, 1991), et elle est spécifique à la souche virale (Hammond *et al.*, 1993).

Les cellules-T $CD4^+$ humaines peuvent être classées en deux sous-populations, TH1 et TH2 (Clerici et Shearer, 1993, Romagnani, 1992, Sher *et al.*, 1992). Les cellules TH1 sécrètent l'IL-2, TNF-β et l'IFN-γ, nécessaires pour l'immunité cellulaire, alors que les cellules TH2 produisent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, et l'IL-10, qui augmentent la production d'anticorps. Chez les individus infectés par le VIH-1, ces cytokines peuvent jouer un rôle

régulateur du système immunitaire et affecter ainsi la progression de l'infection (Clerici et Shearer, 1993, Gazzinelli *et al.*, 1992, Maggi *et al.*, 1987, Shearer et Clerici, 1991, Sher *et al.*, 1992). La réponse de type TH1 se retrouve principalement chez les individus asymptomatiques, alors que la réponse de type TH2 a lieu durant le stade symptomatique de l'infection (Clerici *et al.*, 1992, Clerici et Shearer, 1993, Shearer et Clerici, 1991).

Les fonctions des cellules-T qui participent au contrôle des réponses anti-VIH sont affectées très tôt dans l'infection, avant même le déclin substantiel du nombre de cellules $CD4^+$ (Gruters *et al.*, 1990, Lane *et al.*, 1985, Miedema *et al.*, 1988, Shearer et Clerici, 1991). Ces fonctions sont évaluées en mesurant la prolifération et la production d'IL-2 des cellules exposées à des stimuli tels l'influenza A et le PHA (Clerici *et al.*, 1989, Shearer et Clerici, 1991). Les individus asymptomatiques qui ne montrent pas de réponses à de tels stimuli semblent progresser plus rapidement vers la maladie.

5-3.2 Cytotoxité des lymphocytes-T $CD8^+$, restreinte au CMH

L'activité CTL, restreinte au CMH classe I a été démontrée contre les protéines Gag, Pol, Env, Vif et Nef du VIH-1 (Clerici *et al.*, 1991, Hosmalin *et al.*, 1990, Koenig *et al.*, 1990, Nixon *et al.*, 1988, Riviere *et al.*, 1989, Walker et Plata, 1990). La fréquence des CTL anti-VIH-1 chez les sujets asymptomatiques est très importante, de l'ordre de 10 à 20 précurseurs CTL pour 10^4 cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) et peut atteindre des niveaux très bas, voire non-détectables, durant le stade SIDA (Hoffenbach *et al.*, 1989). Contrairement aux CTL $CD4^+$, les CTL $CD8^+$ montrent une réactivité croisée avec des souches de VIH-1 très divergentes (Hammond *et al.*, 1993). Cependant et malgré certaine corrélation entre l'activité CTL et l'état clinique asymptomatique, le rôle précis de CTL dans l'infection par le VIH reste encore à définir, en particulier si on considère que la progression de l'infection, accompagnée d'une augmentation du nombre de cellules infectées par le VIH, a lieu en présence de cellules $CD8^+$ (Autran *et al.*, 1991, Carmichael *et al.*, 1993). Les raisons de la perte de la fonction

effectrice des CTL anti-VIH-1 chez les patients au stade SIDA sont présentement inconnues. Cependant, le déclin de la fonction des cellules CD4 T-auxiliaires, le déclin de la production d'anticorps, l'infection des cellules présentatrices de l'antigène et l'infection du micro environnement hématopoïétique génératif peuvent contribuer à la diminution ou à la perte de la fonction CTL spécifique au VIH-1 (Pantaleo *et al.*, 1990, Walker et Plata, 1990). Pantaleo *et al.*, (1990) ont montré que les mécanismes cytolytiques effecteurs des CTL $CD8^+$ des patients au stade SIDA sont intacts, mais présentent cependant une défectuosité dans l'expression clonale des précurseurs CTL anti-VIH. D'autre part, Hoffenbach *et al.*, 1989 ont montré la présence de hauts niveaux de CTL anti-VIH chez des sujets normaux non infectés. Cette observation, qui reste a confirmer, suggère une réactivité croisée de certaines protéines virales avec les protéines cellulaires.

Il a également été montré que des lymphocytes T-$CD8^+$ d'individus infectés sont capables de supprimer, *in vitro*, la réplication virale sans tuer les cellules infectées. Cette activité antivirale non-dirigée par les cellules NK et non restreinte au HLA, est dépendante du nombre de cellules $CD8^+$ (Walker *et al.*, 1986, Mackewicz *et al.*, 1991). Ce type d'activité anti-VIH est semble-t-il dû à la sécrétion par les cellules $CD8^+$ d'un facteur antiviral (CAF) soluble, qui ne correspond à aucune des cytokines connues (Brinchmann *et al.*, 1991b, Levy *et al.*, 1991, Mackewicz *et al.*, 1994). La caractérisation du CAF a montré, jusqu'à présent, qu'il s'agit d'une petite protéine (<30 kDa) produite par les cellules $CD8^+$, activées. Cette protéine (CAF) est capable de supprimer la réplication du VIH après intégration du virus sans affecter, ni la prolifération ni l'activation des cellules $CD4^+$ (Sadat-Sowti *et al.*, 1991).

5-3.3 Réponse cellulaire anti-VIH dirigée par des cellules non-T

Le rôle potentiel de la réponse immunitaire anti-VIH dirigée par les cellules non-T réside dans la capacité des cellules NK et autres cellules FcR(+) à éliminer les cellules infectées, directement ou par le mécanisme de l'ADCC, dans un contexte non restreint au CMH (Tyler *et al.*, 1989, Walker et Plata, 1990). Le rôle anti-VIH des cellules NK et de l'ADCC, dans le maintien de l'état asymptomatique chez les sujets séropositifs n'est pas bien connu. Cependant, il semble que le déclin de l'ADCC anti-VIH et de la fonction des cellules effectrices (NK/K) est en corrélation avec la progression de la maladie (Ljunggren *et al.*, 1989a,b, Tyler *et al.*, 1989, 1990a,b, Weinhold *et al.*, 1988). Il a également été montré que les monocytes de sujets asymptomatiques sont capables de diriger l'ADCC, un mécanisme immunitaire potentiel contre le sarcome de Kaposi et d'autres tumeurs reliés au SIDA (Jewett *et al.*, 1990).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1- Établissement et caractérisation de clones cellulaires exprimant les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 NL4.3

Le nombre de cellules cibles exprimant les antigènes de surface du VIH-1 peut influencer le devenir de la réponse ADCC induite par le VIH-1. Les cellules de sang périphériques (PBMC) de patients infectés ne sont pas très appropriées comme cibles pour l'ADCC à cause du nombre très faible de cellules exprimant les antigènes viraux de surface (environ 1 cellule par 10 000 à 20 000 cellules). Alternativement, des cellules infectées en culture peuvent être utilisées. Cependant, dans une telle approche, il est difficile de prédire le temps optimal requis pour produire des cibles appropriées avec une bonne viabilité et un nombre élevé et constant de cellules exprimant les antigènes viraux. En plus, la manipulation du virus infectieux pour les essais d'ADCC de routine peut constituer un danger potentiel de contamination. Des cellules cibles standards exprimant les antigènes VIH-1 sont donc nécessaires pour des essais ADCC reproductibles et comparables

1-1 Description des lignées cellulaires et conditions de culture

Deux lignées cellulaires de lymphoblastoide humain ont été utilisées au cours de ces expériences. La première lignée CEM-T4 est un sous-clone de la lignée CEM qui expriment à haut niveau les récepteurs de surface CD4 (Foley *et al.*, 1965). La deuxième lignée CEM.NKR, dérivée à partir de la lignée CEM par immunosélection, est résistante à la lyse spontanée par les cellules NK/K. Ces lignées cellulaires ont été maintenues en culture à 37°C et 5% de CO_2 dans du milieu R10. Le milieu R10 est composé de milieu RPMI 1640 (BRL) contenant 10% de sérum foetal de veau (SFV) (BRL) décomplémenté à 56°C pendant 10 min, et additionné de 25 ug/ml de pénicilline, et 25 ug/ml de streptomycine (BRL). Ces cellules nous ont été fournies par le NIH (National Institutes of Health), contribution du Dr. P. Clapham et du Dr. P. Cresswell (AIDS Reasearch and Reference Reagent Program Catalog, 1990)

Les passages cellulaires ont été effectués de façon à avoir une densité de 10^6 cellules/ml, ce qui représentait un passage par intervalle de 3 jours. Le nombre de cellules vivantes a été déterminé à l'aide d'un hématiemètre, par exclusion du bleu de trypan 1% préparé dans du PBS.

1-2 Vecteurs d'expression rétroviraux pDOLHIV*env* et pDOLHIV*env*R

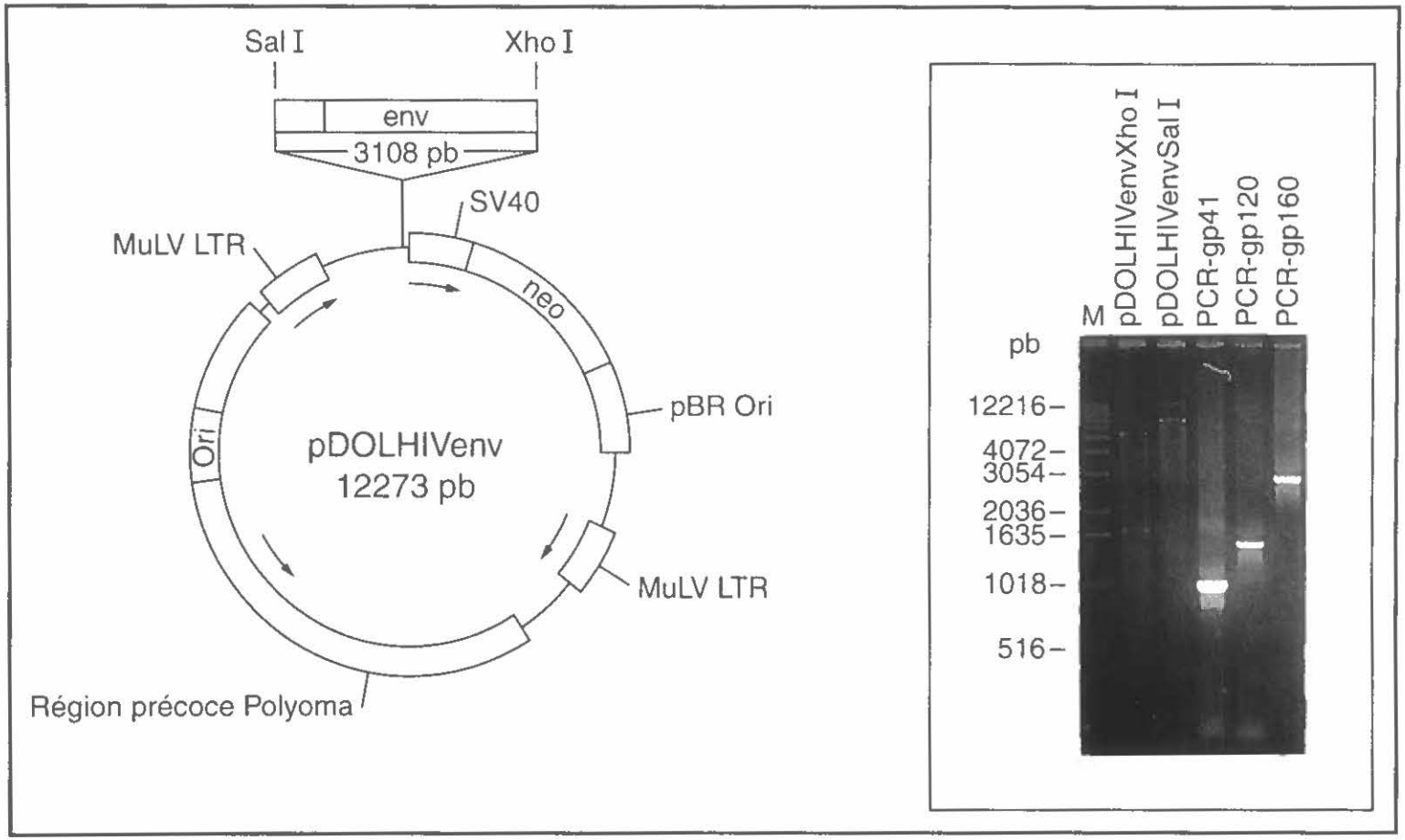
Deux vecteurs d'expression rétroviraux ont été utilisés au cours de ces expériences. Le premier vecteur pDOLHIV*env* (fig. 5) contient les cadres de lectures ouverts codants pour les gènes *env*, *tat* et *rev* du VIH-1 NL4.3. Le second, pDOLHIV*env*R contient les mêmes cadres de lectures codants mais dans une orientation inverse et a servi de contrôle dans toutes les expériences subséquentes. Le VIH-1 NL4.3 est un clone moléculaire infectieux (pNL4.3) construit au laboratoire (Adachi *et al.*, 1986) par l'association de l'extrémité 5' du provirus VIH-1 NY5 et de l'extrémité 3' du VIH-1 LAV (LAI). L'expression de ces cadres de lectures codants est dirigée par le promoteur du LTR du MuLV (Virus de la Leucémie Murine).

Les vecteurs pDOLHIV*env* et pDOLHIV*env*R ont été obtenus après l'introduction du fragment SalI-XhoI du clone proviral pNL4.3 dans le site SalI du vecteur pDOL (Freed *et al.*, 1989). Le vecteur pDOL (Korman *et al.*, 1987) contient l'origine de réplication du pBR322, l'origine de réplication du SV40 ainsi que le gène de résistance à la neomycine (Neo^r), qui leur permettent une propagation dans les cellules bactériennes en présence de l'antibiotique ß kanamycine et dans les cellules eucaryotiques en présence d'antibiotique comme l'aminoglycoside G418 (généticine).

Ces plasmides nous ont été fournis par le NIH dans des bactéries JM107, contribution du Dr. E. Freed et du Dr. R. Risser (AIDS Reasearch and Reference Reagent Program Catalog, 1990)

Figure 5: **Vecteur d'expression rétroviral pDOLHIV*env* utilisé dans les expériences de transfections.**

Le fragment SalI-XhoI du clone proviral pNL4.3, inséré dans le vecteur pDOL, contient les séquences codantes pour le gènes *tat*, *rev* et *env*. Le plasmide pDOLHIVenvR, utilisé comme contrôle lors des expériences de transfections, contient le même insert SalI-XhoI mais dans le sens inverse (**Ref. NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program Catalog., 1990**). La présence et l'intégrité des séquences codantes pour les glycoprotéines de l'enveloppe (gp160, gp120 et gp41) après amplification par PCR et analyse par électrophorèse sur gel d'agarose.


Sal I
Xho I
env
3108 pb
SV40
MuLV LTR
neo
pBR Ori
Ori
pDOLHIVenv
12273 pb
MuLV LTR
Région précoce Polyoma
M
pDOLHIVenvXho I
pDOLHIVenvSal I
PCR-gp41
PCR-gp120
PCR-gp160
pb
12216
4072
3054
2036
1635
1018
516

2- Utilisation des clones cellulaires CEMC2 et CEMG6, comme cellules cibles, dans les tests ADCC

2-1 Résistance à la lyse spontanée par les PBMC de donneurs séronégatifs

Les cellules CEM.NKR sont résistantes à la lyse par les PBMC de donneurs séronégatifs. Le maintien de cette résistance par les cellules des clones CEMC2 et CEMG6 exprimant les antigènes de surface du VIH-1 a été confirmé lors d'un test standard de relargage de ^{51}Cr (Patel et Menezes, 1982). Brièvement, 10^6 cellules ont été marquées avec du ^{51}Cr (100 µCi de $Na_2{}^{51}CrO_4$) pendant 1 h à 37°C, tel que décrit dans la section 3.3 de Matériel et Méthodes (cellules cibles). Les cellules marquées ont été lavées 3 fois avec du milieu de culture R10, puis 10^4 cellules, dans 100 µl de milieu, ont été déposées dans un plateau à 96-puits. Par la suite 5 x 10^5 PBMC préparées tel que décrit dans la section 3.3 de Matériel et Méthodes (cellules effectrices), ont été ajoutées à chacun des puits contenant les cellules cibles marquées. Après 16 h d'incubation à 37°C et 5% de CO_2, les plateaux ont été centrifugés à 800 x g pendant 5 min, puis 100 µl de surnageant ont été récoltés, de chacun des puits, pour mesurer la radioactivité relâchée à l'aide d'un compteur à scintillation gamma (Beckman).

Le pourcentage de lyse a été calculé comme suit:

$$\left[\frac{(\mathcal{R}^{vité}\ \text{relâchée expérimentale} - \mathcal{R}^{vité}\ \text{relâchée spontanée})}{(\mathcal{R}^{vité}\ \text{relâchée maximale})} \times 100\right]$$

La radioactivité relâchée maximale (du ^{51}Cr) a été obtenue par incubation de 100 µl de cellules cibles avec 100 µl de Triton X-100 à 0,5%. La radioactivité relâchée spontanée (du ^{51}Cr) a été obtenue après incubation de 100 µl de cellules cibles avec 100 µl de milieu de culture sans PBMC. Nous avons également utilisé les cellules K562 (cibles standards pour la lyse NK) et les cellules CEME4 (issus des cellules CEM-T4) exprimant les antigènes viraux de surface, comme contrôles pour évaluer l'ampleur de la lyse par les PBMC.

2-2 Lyse spécifique par le mécanisme ADCC

La lyse significative, par le mécanisme ADCC, des cellules CEMC2 et CEMG6 en présence de sérums anti-VIH-1 est l'une des caractéristiques qui fait de ces cellules des cibles de choix pour évaluer l'activité ADCC chez les individus infectés par le VIH-1. Le "pool" de sérums de patients séropositifs à des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-5} ont été utilisés dans les tests ADCC visant à montrer la lyse spécifique des cellules CEMC2 et CEMG6. Le protocole expérimental du test ADCC était identique à celui décrit dans la section 3.3 de Matériel et Méthodes.

2-3 Analyses statistiques: test t de Student

Le test t de Student a été utilisé pour déterminer la signification statistique entre deux moyennes. Les différences de moyennes ont été considérées comme significatives à un niveau de confiance de 95%. La déviation standard de la moyenne des valeurs de chacun des tests est rapportée entre parenthèses

3- Mesure de la réponse ADCC anti-VIH-1: étude croisée d'une cohorte de patients à différents stades de l'infection

3-1 Données cliniques

La cohorte de 33 patients enrôlés dans cette étude croisée (tableau 1) est divisée en 3 groupes. Les groupes 1 et 2 étaient composés de 11 et 10 patients, respectivement au stade II et III de l'infection, selon la classification de CDC (Centers for Disease Control, 1987), et ne recevaient aucun traitement (tableau 1). Le groupe 3 était composé de 12 patients au stade VI de l'infection (VIC1 et VID1) dont 5 patients étaient sous traitement AZT et 7 sous traitement DDI (tableau 1). Les facteurs de risque associés à l'infection au VIH-1 chez les individus inclus dans cette cohorte étaient, drogues intraveineuses et contacts sexuels avec des individus séropositifs.

La description détaillée des différents stades de l'infection selon le CDC est fournie dans le tableau 2.

Tableau 1: Cohorte croisée de 33 patients à différents stades de l'infection au VIH-1.

La classification des stades de l'infection au VIH-1 était celle du CDC (Centres for disease control (CDC), 1987). La description détaillée des différents stades de l'infection selon le CDC est fournie dans le **tableau 2**

Sérum	Cellules CD4 (mm^3)	Classe CDC
C1	1400	Séronégatif
C2	1180	Séronégatif
C3	840	Séronégatif
C4	820	Séronégatif
C5	1100	Séronégatif
Moyenne	**1026 ± 240**	
1	1010	II
2	980	II
3	430	II
4	640	II
5	1050	II
6	1220	II
7	700	II
8	710	II
9	380	II
10	975	II
11	700	II
Moyenne	**799 ± 267**	
12	700	III
13	926	III
14	735	III
15	210	III
16	220	III
17	390	III
18	400	III
19	360	III
20	620	III
21	595	III
Moyenne	**515 ± 236**	
22	21	IV C1 AZT
23	25	IV C1 DDI
24	7	IV C1 DDI Rétinite
25	148	IV C1 AZT Rétinite
26	28	IV C1 DDI Rétinite
27	100	IV C1 DDI Rétinite
28	1	IV C1 DDI Rétinite
29	2	IV C1 DDI
30	7	IV C1 DDI CMV
31	50	IV C1 AZT
32	28	IV D AZT SIDA-SK
33	30	IV C1 AZT
Moyenne	**37.25 ± 44**	

Tableau 2: Classification des manifestations de l'infection au VIH.

Cette classification comprend quatre groupes (I, II, III, IV) dont le groupe IV est divisé en 5 sous groupes (A, B, C, D, E) (CDC, 1987). Dans cette classification les quatre grands groupes s'excluent mutuellement (un patient ne peut appartenir à deux groupes différents au même moment). Par contre, un patient du groupe IV peut appartenir au même temps à plusieurs sous-groupes.

I. Primo-infection

Séroconversion prouvée, symptomatique ou non.

IIA. sujects sans anomalies biologiques.

IIB. sujets avec anomalies biologiques

II. Sans symptômes cliniques

(anémie, leucopénie, lymphopénie ou lymphopénie T4, thrombopénie, hypergammaglobulinémie, anergie cutanée).

III. Syndrome lymphadénopathique chronique

Présence, pendant au moins trois mois, de ganglions, d'au moins 1 cm de diamètre dans deux aires extra inguinales.

IIIA. sujets sans anomalies biologiques.

IIIB. sujets avec anomalies biologiques.
(anémie, leucopénie, lymphopénie, thrombopénie, hypergammaglobulinémie, anergie cutanée).

IV. Symptomatique

IVA. Signes généraux

Un ou plusieurs signes parmi lesquels: fièvre, durant plus d'un mois; amaigrissement non désiré de plus de 10% du poids corporel habituel; diarrhée durant plus d'un mois.

IVB. Signes neuroleptiques

B1. atteinte centrale (méningite, encéphalite, myélopathie).

B2. neuropathie périphérique.

IVC. Infections opportunistes

C1. infections, parmi lesquelles: pneumocystose; cryptosporidiose; toxoplasmose cérébrale; isosporose; candidose œsophagienne, bronchique ou pulmonaire; cryptococcose; histoplasmose disséminée, coccidioïdomycose disséminée; mycobactériose atypique; cytomégalovirose disséminée; herpès cutanéo-muqueux chronique; herpèse-virose digestive, respiratoire ou disséminée; leucoencéphalite multifocale progressive.

C2. autres infections, parmi lesquelles: leucoplasie «velue» de la cavité buccale; zona atteignant plusieurs dermatoses; septicémie à salmonelles récidivante; tuberculose; candidose buccale; nocardiose.

IVD. Infections malignes

parmi lesquelles: sarcome de Kaposi, lymphome malin non hodgkinien, lymphome malin cérébral isolé.

IVE. Autres manifestations

parmi lesquelles: pneumopathie lymphoïde interstitielle chronique; manifestations ne pouvant être classées dans un des groupes précédents.

3-2 Préparation des échantillons cliniques

Les échantillons de sang périphérique ont été récoltés dans des tubes ACD (acide citrique dextrose) à raison de deux tubes de 6 ml chacun par patient. Le sang a été par la suite mélangé avec un volume égal de PBS (150 mM NaCl; 150 mM sodium phosphate [pH 7,4]) puis séparé par centrifugation à travers un gradient Ficoll-Hypaque pendant 20 min à 400 x g. Environ 2 ml de sérum ont été récoltés alors que les lymphocytes à la surface du gradient Ficoll-Hypaque ont été transférés dans un nouveau tube puis lavés 3 fois dans 10 ml de PBS. Les cellules ont été par la suite, dispersées dans 1 ml de PBS puis aliquotées dans deux tubes Eppendorf à raison de 900 µl pour l'extraction de l'ARN et 100 µl pour l'extraction de l'ADN. Les tubes ont été par la suite centrifugés à 14 000 rpm pendant 5 min et la concentration des cellules a été ajustée à 10^7 cellules/ml de tampon de lyse pour l'extraction de l'ARN ou pour la purification de l'ADN. Le tampon pour l'extraction d'ARN était composé de guanidium thiocyanate 4 M, citrate de sodium 25 mM [pH 7,0], sarcosyl 0,5% [N-Lauroyl-Sarcosine], β-mércaptoéthanol 0,1 M. Le tampon pour la purification de l'ADN était composé de Tris HCl 10 mM [pH 8,3], KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2,5 mM, NP-40 1%, Tween-20 1%. Les échantillons de sérums et des cellules ont été gardés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

3-3 Test ADCC anti-VIH-1 (ADCC indirecte)

Les tests ADCC ont été mis au point dans des plateaux de microtitrage 96-puits. Toutes les conditions ont été testées en triplicata.

Cellules cibles: Seules les cellules CEMC2 et CEMG6 avec une viabilité supérieure à 85% étaient utilisées dans les tests visant à déterminer les titres d'anticorps ADCC dans les sérums des sujets inclus dans cette étude. Brièvement, 3 x 10^6 cellules ont été marquées avec du ^{51}Cr dans 1 ml de milieu R10 en présence de 150 µCi $Na_2{}^{51}CrO_4$ pendant 1 h à

37°C. Les cellules marquées ont été lavées 4 fois dans 10 ml de milieu R10 et la concentration a été ajustée à 2 x 10^5 cellules vivantes par ml de milieu R10.

Cellules effectrices: Les cellules effectrices ont été isolées à partir de sang frais de donneurs séronégatifs par centrifugation sur gradient Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Canada). Deux parts de sang frais non coagulé ont été diluées avec une part de solution saline équilibrée Hanks (HBSS) puis centrifugé pendant 20 min à 400 x g à travers 15 ml de Ficoll-Hypaque. La bande riche en lymphocytes à l'interface HBSS-Ficoll-Hypaque a été récoltée et les cellules ont été lavées 3 fois dans 5 ml de HBSS. La concentration a été ajustée à 5 x 10^6 cellules vivantes par ml de milieu R10.

Test ADCC: Les sérums des différents patients ont été inactivés à 56°C pendant 30 min. Les dilutions de sérums ont été préparés dans le milieu R10 en tenant compte du volume requis de chaque dilution lors des tests ADCC. Les dilutions finales utilisées étaient 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, et 10^{-5}.

Lors du test, ont été ajoutés dans l'ordre, 50 µl de chacune des dilutions de sérums anti-VIH-1, 100 µl de cellules cibles (10^4 cellules), et 50 µl de cellules effectrices (5 x 10^5 cellules). Pour chacun des tests ADCC la radioactivité relâchée maximale (du ^{51}Cr) a été obtenu par incubation de 100 µl de cellules cibles avec 100 µl de Triton X-100 0,5%. La radioactivité relâchée spontanée (du ^{51}Cr) a été obtenu par incubation de 100 µl de cellules cibles avec 100 µl de milieu R10. La lyse des cellules n'exprimant pas la gp120/160 qui constitue le bruit de fond a été obtenue par incubation de 100 µl de cellules cibles contrôles en présence de 50 µl de cellules effectrices et 50 µl de la dilution 10^{-3} du "pool" de sérums anti-VIH-1. Après une incubation de 6 h à 37°C et 5% de CO_2, les plateaux ont été centrifugés à 800 x g pendant 5 min et 100 µl de surnageant ont été récoltés de chaque puits. La radioactivité relâchée a été mesurée sur compteur à scintillation gamma (Beckman)

Le pourcentage de lyse des cellules cibles dans chacun des puits a été calculé comme suit:

$$\left[\frac{(\mathcal{R}^{\text{vitesse}} \text{ relâchée expérimentale} - \mathcal{R}^{\text{vitesse}} \text{ relâchée spontanée})}{(\mathcal{R}^{\text{vitesse}} \text{ relâchée maximale} - \mathcal{R}^{\text{vitesse}} \text{ relâchée spontanée})} \times 100\right]$$

Alors que la lyse spécifique des cellules cibles exprimant la gp120/160 du VIH-1 en présence d'anticorps anti-VIH-1 a été calculée selon la formule suivante:

$$\left(\begin{array}{c}\% \text{ de lyse des cellules cibles} \\ \text{exprimant la gp120/160}\end{array}\right) - \left(\begin{array}{c}\% \text{ de lyse des cellules contrôles} \\ \text{n'exprimant pas la gp120/160}\end{array}\right)$$

3-4 Analyse des données

Pour chaque sérum le titre des anticorps ADCC était déterminé comme étant l'inverse de la plus haute dilution du sérum qui donnait une lyse spécifique 5% supérieure à celle des cellules contrôles en présence de ce même sérum. Cependant le niveau d'activité ADCC, pour chaque sérum, était exprimé sous forme de moyenne des pourcentages de lyse spécifique des cellules cibles en présence d'anticorps anti-VIH-1 à la dilution 10^{-3} (chaque test était effectué en triplicata). La déviation standard était calculée pour chaque test (chaque sérum) et elle est rapportée entre parenthèses dans le texte.

4- Étude de la diversité génétique des quasi-espèces provirales présentes chez les patients de la cohorte croisée

L'étude de la diversité génétique virale touche en fait trois régions du gène *env* qui renferment les épitopes ADCC cartographiés jusqu'à présent. Il s'agit de la région V3 au niveau de la gp120, la région C-terminale de la gp120, et la région immunodominante de la gp41.

4-1 Amplification des domaines du gène *env*, renfermant les séquences des épitopes ADCC

Les amplifications des trois domaines du gène *env* ont été réalisées directement à partir des lysats cellulaires préparées tel que nous l'avons décrit dans la section 3.2 de Matériel et Méthodes, en utilisant la technique de "nested-PCR". La qualité (et/ou la quantité) des préparations d'ADN cellulaire, de chacun des échantillons cliniques, a été vérifiée par amplification par PCR d'une portion du gène HLA-DQα humain, en utilisant les amorces GH26 ($^{5'}$GTGCTGCAGGTGTAAACTTGTACCA$^{3'}$) et GH27 ($^{5'}$CACGGATCCGGTAGCAGC GGTAGAG$^{3'}$). La spécificité des fragments HLA-DQα amplifiés à l'aide de ces amorces a été confirmée par le séquençage direct des fragments PCR.

4-1.1 Choix des amorces oligonucléotidiques

Les amorces oligonucléotidiques utilisées dans ce travail ont été choisies de façon à permettre l'amplification, par "nested-PCR", de trois régions différentes du gène de l'enveloppe du plus grand nombre possible de souches du VIH-1 connues. Ces trois régions renferment les quatre épitopes ADCC cartographiés jusqu'à date. Les séquences des amorces utilisées dans ce projet ont été sélectionnées à l'aide du programme Oligoscan (Montpetit *et al.*, 1992). Ce programme permet la localisation des séquences des régions

communes à toutes les souches de VIH-1 du sous-type B déjà publiées (Los Alamos, 1991). Pour élargir le nombre de souches de VIH-1 qui peuvent être amplifiées en utilisant ces amorces, les paires de bases non homologues, qui changent le plus souvent, entre les différentes souches ont été remplacées par des résidus Inosines (I). Les résidus I sont capables de s'apparier, sans préférence, aux nucléotides A, T, C et G (Tableau 3).

4-1.2 Synthèse des amorces oligonucléotidiques

Les amorces ont été synthétisées à l'aide d'un synthétiseur de la compagnie Applied Biosystems (394 DNA synthesizer, Université de Calgary) en utilisant des bases-o-méthyl-phosphoramidite comme précurseurs. Les oligonucléotides ont été par la suite purifiés sur un gel préparatif 24% acrylamide/7M urée et par chromatographie d'exclusion sur colonne de Sephadex G-25M. Pour la synthèse des oligonucleotides fluorescents, un groupement amine a été ajouté à l'extrémité 5' auquel a été couplé un des quatre fluorochromes (FAM: jaune, JOE: bleu, ROX: rouge, TAMRA: vert) tel que décrit par Applied Biosystems. La concentration des oligonucléotides a été déterminée en mesurant la densité optique à 260 nm. La concentration en picomoles des oligonucléotides a été calculée en utilisant formule de conversion de l'absorbance en pmol/ul dérivée de la loi de Beer qui donne:

A260 x 100 / (1,54 nA + 0,75nC + 1,17 nG + 0,92 nT) pmol /µl. (nA, nC, nG et nT correspondent au nombre de A, C, G et T dans l'oligonucléotide).

Tableau 3: Séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées dans les expériences d'amplification par ¨nested-PCR¨.

Les amorces "externes" ont été utilisées lors du premier tour-PCR pour l'amplification de deux fragments de 440 pb et de 796 pb à l'intérieur du gène *env*. Ces deux fragments ont été utilisés comme matrices, lors du deuxième tour-PCR, pour amplifier, à l'aide des amorces "internes", les trois régions V3, C4 et C5 du gène *env* renfermant les séquences des épitopes ADCC.

Amorce	Séquence 5' 3'	Localisation "VIH-1 LAI"[a] nt[#]	gène *env*
V3F.externe	TGTAIAAATGTCAGCACAGTACAITGT	6532-6558	gp120
V3R.externe	ACAGIAGAAAAATTCCCCTCIACAATT	6972-6946	gp120
V3F. interne	TGCTGTTIAATGGCAGTCTAGCAGAAG	6593-6619	gp120
V3R. interne	TACAATTTCTGGITCICCICCTGAGGA	6933-6907	gp120
C4.6F.externe	ATTACIGGGCTICTATTAACAAGAGAT	7162-7188	gp120
C4.6R.externe	GGTGAITATCCCTGCCTAACTCTATT	7958-7933	gp41
C4F.interne	ATGAGGGAIAATTGGAGAAGTIAATTA	7240-7266	gp120
C4R.interne	TCAGCAAITTGTTITGITGITGCACTA	7486-7460	gp41
C5F.interne	CTGGGGCATCAAICAGCTCCAGGCAAG	7527-7553	gp41
C5R.interne	AACCTAIIAAICCTCCTACTATCATTA	7900-7844	gp41

[a] Wain-Hobson *et al.*, 1985

4-1.3 Réaction de polymérisation en chaîne

Pour l'amplification, par "nested PCR", des trois régions du gène *env*, nous avons utilisé 5 paires d'amorces différentes (tableau 3). La technique du "nested PCR" (ou PCR à deux tours) consistait en l'amplification, lors d'un premier tour PCR, de deux fragments de 440 pb et de 796 pb à l'aide des amorces "externes". Ces deux fragments ont servi par la suite de matrices, lors du second tour PCR, pour amplifier à l'aide des amorces "internes", les trois régions, V3, C4, et C5, renfermant les épitopes ADCC. La technique d'amplification par PCR utilisée était celle du "hot-start" (D'Aquila *et al.*, 1991) qui permet d'augmenter la spécificité de l'amplification des fragments ciblés.

Pour toutes les réactions d'amplification, 1 µg d'ADN cellulaire matrice a été utilisé dans un volume réactionnel final de 100 µl contenant du $MgCl_2$ 2,0 mM, Tris-HCl [pH 8,3] 10 mM, KCl 50 mM, mélange de dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) à une concentration finale de 200 µM de chaque, deux amorces à une concentration de 0,5 µM chacune et 2,5 unités de *Taq* polymérase (Amplitaq, Perkin Elmer Cetus).

Les paramètres expérimentaux au cours du cycle d'amplification "premier tour-PCR" ont été choisis comme suit: dénaturation de l'ADN matrice pendant 10 sec à 95°C , appariement des amorces "externes" à l'ADN matrice dénaturé durant 10 sec à 45°C et 48°C, respectivement pour les régions V3 et C4-C5, et extension par la *Taq* polymérase de ces amorces durant 15 sec à 72°C. Ce cycle a été répété 35 fois. Un 36ème cycle d'amplification a été ajouté et qui consistait en une étape d'extension de 10 min à 72°C. Cette étape d'élongation permet d'avoir des amplicons de pleine longueur.

Par la suite des aliquots de 10 µl du produit du premier tour-PCR ont été utilisés comme matrice pour les amorces "internes" lors du second tour-PCR afin d'amplifier les trois régions renfermant les épitopes ADCC. Les paramètres d'amplification du second tour-PCR étaient identiques à ceux du premier tour-PCR à l'exception du 36ème cycle qui

consistait à une étape de dénaturation de 3 min suivie d'une étape d'extension de 7 min. Ces étapes permettent d'avoir des amplicons de pleine longueur dans le but d'augmenter l'efficacité de clonage. L'appariement des amorces "internes" à l'ADN matrice avait eu lieu à 50°C, 44°C et 46°C respectivement pour les régions V3, C4 et C5. Toutes les amplifications par PCR ont été effectuées dans un thermocycleur programmable de Perkin Elmer Cetus, modèle 9600.

Nous avons utilisé des contrôles négatifs d'amplification à chaque expérience de PCR. Ces contrôles négatifs consistaient en l'introduction, lors de l'amplification des échantillons cliniques, d'ADN cellulaire d'individus séronégatifs préparé de la même façon que celui des individus infectés enrolés dans cette étude. Les fragments PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% et purifiés par la suite en utilisant le protocole "Sephaglass" de Pharmacia (Pharmacia, Canada). Ces fragments ont été utilisés dans les réactions de séquençage direct des produits PCR et dans les expériences de clonage et de séquençage des plasmides recombinants.

4-1.4 Polymorphisme de taille parmi les fragments PCR

Afin d'avoir un premier aperçu de la diversité génétique parmi les populations provirales, nous avons amplifié par "nested PCR" les trois régions V3, C4 et C5 en utilisant cette fois-ci des amorces fluorescentes. Ainsi des fluorochromes ont été ajoutés au groupement amine de l'extrémité 5' des trois paires d'amorces internes; V3F.interne-ROX (Rouge), V3R.interne-FAM (Jaune), C4F.interne-JOE (Bleu), C4R.interne-ROX (Rouge), C5F.interne-JOE (Bleu) et C5R.interne-FAM (Jaune) (tableau 3).

Les fragments PCR fluorescents ont été analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en utilisant un Balayeur de gènes (Gene Scanner) (GeneScan software, 373A DNA Sequencing System d'applied Biosystems). Cette approche dont la résolution est capable de distinguer des fragments d'ADN (simples brins) de tailles très peu différentes (la différence de tailles entre les fragments se chiffre à quelques paires de

bases), nous a permis d'évaluer le polymorphisme de taille parmi les fragments PCR, ce qui constitue un premier reflet de la diversité génétique parmi les populations provirales.

4-2 Clonage des fragments d' ADN amplifiés par PCR

Pour le clonage des fragments PCR, nous avons utilisé le système TA Cloning™ de Invitrogen qui permet l'insertion directe des fragments PCR dans le plasmide de clonage TA pCRII. Ce système prend avantage de l'activité de l'ADN polymérase *Taq* à ajouter des simples déoxyadénosines (A) aux extrémités 3' de toutes les molécules doubles brins. Ces A-dépassants sont utilisés pour insérer les fragments PCR dans le vecteur TA dont les extrémités 3' T-dépassants sont utilisées comme site d'insertion.

4-2.1 Réaction de ligation

Les réactions de ligation ont été effectuées selon le protocole proposé par Invitrogen avec quelques modifications. Les rapports molaires insert:vecteur utilisés étaient de 1:2 et 1:3. Généralement, 100 à 150 ng de produit PCR ont été incubés en présence de 50 ng de vecteur TA, de 2 unités d'ADN ligase T4, et de tampon de ligation (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM, KCl 60 mM, glycérol 50% (v/v), pH 7,6) dans un volume final de 10 µl, pendant 16 h à 12°C. Ensuite 2 µl de produit de ligation ont été utilisés pour transformer des cellules bactériennes compétentes.

4-2.2 Transformation des cellules bactériennes

Dans les réactions de transformation, 2 µl (20 à 30 ng d'ADN) du mélange de ligation ont été incubés en présence de bactéries *E.coli* (INVa F') compétentes et de 2 µl d'une solution de ß-mércaptoéthanol 0,5 M, dans un bain de glace pendant 30 min. Pour permettre la pénétration de l'ADN dans les bactéries, la mixture ADN-bactéries a été soumise à un choc thermique de 45 sec à 42°C, puis transférée immédiatement sur glace. La

régénération des parois bactériennes s'est faite durant une incubation de 60 min à 37°C avec agitation (250 rpm) en présence de 500 µl de milieu de culture SOC. Après ce temps de récupération, les bactéries transformées étaient étalées sur une gélose LB (5% extrait de levure, 10% bacto-tryptone, 10% NaCl et 1,5% bacto-agar) contenant 50 µg/ml ß-kanamycine et 1,6 µg/ml du substrat X-Gal. Les géloses étaient par la suite incubées pendant 18h à 37°C en position inversée avant le début de la sélection des colonies recombinantes.

4-2.3 Sélection des colonies recombinantes

Seules les bactéries transformées sont capables de croître sur la gélose LB contenant de la ß-kanamycine, et ce grâce à la présence chez le vecteur TA du gène de résistance à cet antibiotique, alors que la sélection des bactéries recombinantes repose sur la présence ou non de l'enzyme ß-galactosidase fonctionnelle. Les bactéries transformées par le vecteur TA produisent la ß-galactosidase fonctionnelle capable d'hydrolyser le substrat X-Gal et produire un chromophore bleu (colonies bleues). L'insertion d'un fragment d'ADN dans le vecteur devrait interférer avec la production de la ß-galactosidase par les bactéries transformées recombinantes (colonies blanches). Ainsi, pour chaque transformation d'un des produits PCR, 4 à 10 colonies recombinantes ont été collectées puis ensemencées, séparemment, dans 3 ml de bouillon LB contenant 50 µg/mL de ß-kanamycine. Après une incubation de 18 h à 37°C avec agitation, 2 ml de chaque culture ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN plasmidique en utilisant le système Magic Miniprep™ de Promega.

4-2.4 Purification des ADN plasmidiques "Mini-préparation"

Deux ml de chaque culture ont été centrifugés à 12 000 x g pendant 1 min, le milieu de culture a été par la suite éliminé et les culots bactériens ont été dispersés dans 200 µl de la solution de resuspension (Tris-HCl 50 mM [pH 7,5], EDTA 10 mM, RNase A 5 µg/ml).

Les parois bactériennes ont été digérées, à la température ambiante, avec 200 µl de la solution de lyse (NaOH 0,2 M, SDS 1%). Les lysats bactériens ont été par la suite neutralisés avec 200 µl de la solution de neutralisation (KOAc 2,55 M, pH 4,8). Après une centrifugation à 14 000 x g pendant 5 min, pour se débarrasser des débris cellulaires, les surnageants ont été transférés dans des nouveaux tubes. Ces surnageants ont été incubés pendant 5 min sur glace en présence de 1 ml de Résine "*Magic™ resin*, Promega" capable de fixer uniquement l'ADN. La mixture surnageant-résine a été par la suite poussée à travers des mini-colonnes (*Magic Minicolumn*) à l'aide de seringues de 3 ml. La résine retenue dans la colonne a été lavée avec 2 ml de la solution de lavage (NaCl 200 mM, Tris-HCl 20 mM [pH 7,5], EDTA 50 mM, EtOH 50%). Après une première centrifugation de 20 sec afin d' éliminer le surplus de la solution de lavage, l'ADN plasmidique a été élué, de la colonne, par l'addition de 50 µl de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM) puis récupéré, dans des tubes Eppendorf, lors d'une deuxième centrifugation. Les ADN ainsi purifiés (environ 500 ng/µl) ont été utilisés dans les réactions de digestion par enzymes de restriction afin de confirmer la présence des inserts dans les plasmides recombinants et dans les réactions de séquençage.

4-2.5 Séquençage des plasmides recombinants

Entre 4 à 10 plasmides recombinants, issus de chacunes des amplifications par PCR, ont été séquençés. Nous avons utilisé les trois paires d'amorces PCR internes V3F.interne, V3R.interne, C4F.interne, C4R.interne, C5F.interne et C5R.interne (tableau 3) dans les réactions de séquençage des deux brins des différents plasmides recombinants.

4-2.5.1 Séquençage manuel

Certains des plasmides recombinants ont été séquencés par la technique de Sanger modifiée par Mierendorf et Pfeffer (1987) en présence de didéoxyribonucléotides en

utilisant l'enzyme Sequenase (polymérase T7 modifiée) comme enzyme de polymérisation et le dATP marqué au ^{35}S (>600 Ci/mmol, 10 mCi/ml) ([^{35}S]dATP, Amersham) comme nucléotide radioactif. Brièvement, 5 µg d'ADN plasmidique contenus dans 10 µl de TE ont été mélangés à 20 µl d'une solution dénaturante 0,2 N NaOH et 0,2 mM EDTA. Après une incubation de 30 min à 37°C, 3 µl d'une solution de neutralisation 2 M NH_4OAc (pH 4,5) ont été ajoutés en même temps que 82,5 µl d'éthanol absolu. Les ADN ont été précipités à -70°C pendant 30 min, puis centrifugés à 12 800 x g pendant 15 min. Les culots d'ADN ont été lavés 2 fois avec 1 ml d'éthanol 70%, séchés sous vide, puis resuspendus dans 14 µl du mélange d'appariement (Tris-HCl 40 mM, pH 7,5; $MgCl_2$ 10 mM; $NaCl_2$ 50 mM et 2,0 pmol d'amorce). Après une incubation de 20 min à 37°C, ont été ajoutés au complexe matrice-amorce: 1 µl de 0,1 M DTT; 2 µl d'un mélange de 1,5 µM de chacun des nucléotides dGTP, dCTP, dTTP; 3 U de polymérase et 1 µl de [α-^{35}S]dATP (Amersham, >600 Ci/mmol, 10 mCi/ml). Après une incubation de 5 min à la température ambiante, 4,5 µl de ce mélange ont été répartis dans 4 tubes identifiés G, A, T, C contenant 2,5 µl du mélange de terminaison. Chacun des mélanges de terminaison contenait 80 µM de chaque déoxynucléotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) et 8 µM d'un des quatre didéoxynucléotides (ddATP, ddGTP, ddCTP, ou ddTTP). Après une incubation de 5 min à 37°C, la réaction de polymérisation a été arrêtée par l'addition de 5 µl de la solution d'arrêt (formamide 95%, EDTA 20 mM, bromophénol bleu 0,05%, xylène cyanol 0,05%).

Les produits de réactions de séquençage ont été chauffés pendant 2 min à 85°C, 2 µl ont été par la suite chargés dans les puits d'un gel de 5% acrylamide:bis (19:1) contenant 7 M urée. L'électrophorèse de séquençage a été réalisée sur des gels d'une épaisseur non-uniforme de 0,2 à 0.8 mm en utilisant un appareil IBI modèle STS 45. Après une électrophorèse de 3 h dans du tampon TBE sous un voltage de 1 800 V (60 W), le gel a été fixé dans une solution de 10% méthanol, 10% acide acétique et rincé 3 fois avec de l'eau. Le gel a été séché à l'aide de séchoirs à cheveux pendant 45 min et les séquences ont été révélées après autoradiographie de 16 à 48 h, à la température de la pièce en utilisant un

film de type X-Omat (Kodak).

4-2.5.2 Séquençage automatique

Les fragments PCR et les plasmides recombinants ont été également séquencés à l'aide d'un séquenceur automatique (Modèle 373A DNA Sequencing System d'Applied Biosystems) en présence des dideoxy de terminaison marqués au fluorochromes ABI, et en utilisant l'ADN polymérase AmpliTaq comme enzyme de polymérisation. Brièvement, 1 µg d'ADN plasmidique (ou de produit PCR) contenu dans 9,5 µl de TE a été mélangé avec 3,2 pmol d'amorce (2 µl) et 9,5 µl du mélange de terminaison (pour 1000 µl: 1,58 µM A-dyedeoxy, 94,74 µM T-dyedeoxy, 0,42 µM G-dyedeoxy, 47,37 µM C-dyedeoxy, 78,95 µM dITP, 15,79 µM dATP, 15,79 µM dCTP, 15,79 µM dTTP, 168,42 mM Tris-HCl (pH 9,0), 4,21 mM $(NH4)_2SO4$, 42,10 mM $MgCl_2$, 0,42 unités/µl d'ADN polymérase AmpliTaq). Les mélanges réactionnels (20 µl) ont été par la suite placés dans un thermocycleur programmable (Perkin-Elmer Cetus Modèle 9600) pour 25 cycles. Chacun des cycles comprenait une étape de dénaturation à 96°C pendant 10 sec, une étape d'appariement à 50°C pendant 5 sec et une étape de polymérisation à 60°C pendant 4 min. Les dideoxy (dyedeoxy) non incorporés ont été éliminés par chromatographie sur colonnes de Sephadex pré-équilibrées (Centri-Sep column). Les produits de séquençage purifiés par chromatographie ont été par la suite séchés sous vide, puis resuspendus dans 5 µl de tampon de chargement, formamide-EDTA 50 mM [pH 8,0] (4:1). Après une incubation de 2 min à 90°C, 4 µl du produit de séquençage ont été séparés par électrophorèse sur un gel de 6% acrylamide-bis (19:1) d'une épaisseur uniforme de 0,2 mm, contenant 7 M urée. L'électrophorèse a été effectuée dans du tampon TBE pendant 13 h sous un voltage constant de 2 000 V (60 mA). Les données (séquences de nucléotides) ont été collectées par le séquenceur d'ADN à l'aide du logiciel ¨Analysis-Data collection Software V.1.2.0¨. Ce logiciel dont la fonction d'analyse est l'interprétation des chromatogrammes d'électrophorèse procède à un traitement mathématique des données d'intensité de

fluorescence des fragments d'ADN qui passent devant le détecteur, en utilisant des algorithmes développés par Applied Biosystems. Le résultat de ces traitements est l'attribution d'un nucléotide aux différents pics de fluorescence obtenus.

4-2.5.3 Analyse des séquences du VIH-1

Une fenêtre de 273 pb à 276 pb contenant peu ou pas d'ambiguïtés a été choisie à l'intérieur de la région V3 séquencée pour des analyses plus poussées. De même pour les régions C4 et C5, une fenêtre de 153 pb à 156 pb et une fenêtre de 153 pb sans ambiguïtés ont été sélectionnées pour les analyses subséquentes. Toutes les analyses des séquences du VIH-1 ont été effectuées sur un ordinateur Power Macintosh de type 7000/600.

Plusieurs programmes d'analyse de séquences ont été utilisés au cours de ce travail, dont les programmes SeqEd, GeneWorks et PHYLIP pour l'alignement et la traduction des séquences nucléotidiques et l'étude des relations phylogénétiques entre les séquences d'ADN et de protéine.

4-2.5.3.1 Le programme SeqEd

Le programme SeqEd, développé par ABI permet l'importation et l'édition des séquences nucléotidiques collectées par le séquenceur. En plus de l'analyse très détaillée des chromatogrammes permettant de résoudre manuellement les ambiguïtés en comparant les pics de fluorescence de chacun des nucléotides à l'intérieur des séquences des deux brins. Les séquences éditées par SeqEd étaient sauvegardés en format texte, puis importées par le logiciel Gene Works pour réaliser les alignements multiples.

4-2.5.3.2 Le programme Gene Works

Le programme commercial GeneWorks distribué par Microgenesis utilise des algorithmes permettant la recherche des homologies entre les différentes séquences. Ce logiciel a été utilisé pour la traduction des séquences et la détermination des cadres de lecture, mais principalement pour la création d'alignements multiples des séquences nucléotidiques et peptidiques. Ces alignements étaient sauvegardés en format PHYLIP nécessaire pour effectuer des analyses plus poussées à l'aide du programme PHYLIP.

4-2.5.3.3 PHYLIP (Phylogeny Inference Package), analyses phylogénétiques

PHYLIP (Felsenstein, 1989) comprend une multitude de programmes permettant l'étude des phylogénies à partir des données de séquences d'acide nucléique et de protéine. La version la plus récente de PHYLIP (version 3.5c) utilisée au cours de ce projet est disponible via le réseau InterNet à l'adresse, joe@genetics.washington.edu ou à l'adresse, joe@evolution.genetics.washington.edu.

Les alignements multiples des séquences générées par GeneWorks sont réalignés par le programme PHYLIP, puis utilisés pour les calculs de la variabilité génétique intrapatient et interpatients. Ces calculs ont été effectués en utilisant le modèle à deux paramètres de Kimura à l'aide du programme **DNADIST** (pour les séquences d'ADN) et en utilisant l'algorithme dayhoff PAM matrix à l'aide du programme **PROTDIST** (pour les séquences de protéines). Ces analyses ont généré un grand nombre de larges tables de similarités dont la présentation dans la section Résultat n'est pas très pratique. Seules les valeurs délimitant les intervalles de variabilité intra- et inter-patients des séquences nucléotidiques et peptidiques ont été rapportées. Les arbres phylogénétiques **non-enracinés** ont été construits en se basant sur les matrices de distances générées par les programmes DNADIST et PROTDIST en utilisant la méthode de ¨neighbor-joining¨ à l'aide

du programme **NEIGHBOR**. La robustesse des arbres "neighbor-joining" a été établie en faisant un bootstrap (sur 100 replicats) de multiples alignements à l'aide du programme **SEGBOOT**. Les arbres consensus finals, après bootstrap, ont été construits en utilisant le programme **CONSENSE**. Les séquences du VIH-1 MN ont été utilisées comme groupe externe (**outgroup**) lors des analyses phylogénétiques, alors que les arbres phylogénétiques établis sont toutes des arbres **non-enracinés**.

La pression de la sélection est exprimée sous forme de ratio substitutions non-synonymes/substitutions synonymes tel que décrit par Nei et Gojobori, (1986), en comparant les séquences des différents quasi-éspèces d'un patient avec la séquence prédominante chez ce même patient, obtenue par séquençage direct du fragment PCR.

Les résultats des analyses des séquences ont été utilisés dans le but d'établir une relation (si relation existe) entre la nature des populations provirales (au niveau des cellules) et la réponse immunitaire ADCC (au niveau du sérum).

5- Étude des niveaux de transcription des ARNm viraux

L'étude des niveaux de transcription des ARNm viraux devrait nous permettre d'étudier les relations qui peuvent exister entre l'activité ADCC, la diversité génétique virale et la réplication du virus dans les cellules infectées des individus de notre cohorte. L'approche expérimentale que nous avons développée (Merzouki *et al.*, 1994b), consistait à quantifier, en utilisant la technique de reverse transcription-quantitative compétitive-PCR (RT-qc-PCR), les transcrits régulateurs (*tat*, *rev* et *nef*) et les transcrits structuraux (*pol*).

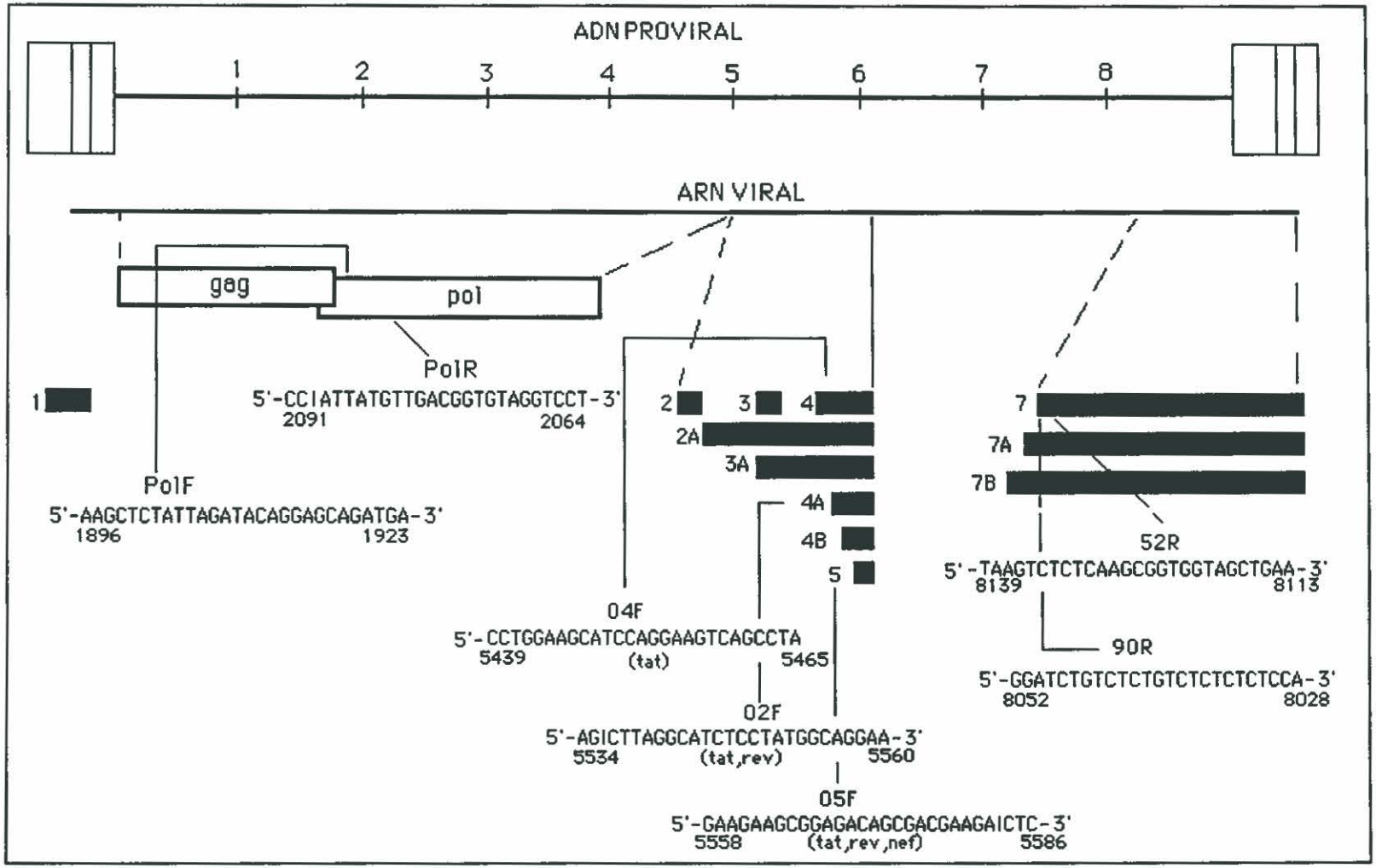
Le principe de la quantification des transcrits viraux consiste en l'introduction lors des réactions de qc-PCR, d'une cible compétitrice (standard interne) connue qui est amplifiée avec la même efficacité que les transcrits viraux inconnus. Le nombre de copies de transcrits messagers viraux est déterminé après amplification, au point d'équivalence où le nombre de copies du standard interne est égal au nombre de copies de transcrits viraux. Deux raisons justifient l'utilisation de la méthode de RT-qc-PCR i) le niveau et le profil d'expression des ARNm du VIH-1 sont gérés, en grande partie, par l'activité des protéines régulatrices Tat, Rev et Nef, ii) nous avons déjà montré (Michael *et al.*, 1995) que le ratio d'épissage (i.e. ratio: transcrits régulateurs *tat*, *rev*, *nef* : transcrits structuraux *pol*) peut servir d'indicateur du niveau de réplication du virus. Cette méthode s'est avérée très efficace, dû en particulier au fait que cette méthode utilise un standard interne commun aux 3 gènes régulateurs, *tat*, *rev* et *nef* et que le marquage non radioactif des produits PCR, en utilisant des amorces fluorescentes, permet la collection et l'analyse automatique des données sur un Balayeur de gènes (Gene Scanner) de plusieurs échantillons cliniques à la fois (Merzouki *et al.*, 1994b, Michael *et al.*, 1995).

5-1 Construction du standard interne

Une représentation schématique du standard interne et une brève introduction expliquant comment ce standard interne a été préparé, est présentée dans la figure 6. Tout les détails concernant la construction du standard interne et sa caractérisation ont été déjà publiés (Merzouki *et al.*, 1994a, Annexe A; Michael *et al.*, 1995).

Figure 6: Séquences et localisation des amorces oligonucléotidiques utilisées dans les expériences de RT-qc-PCR (Reverse Transcription-quantitative compétitive-PCR.

Les réactions de transcription inverse ont été effectuées en utilisant l'amorce 52R. Ensuite l'amorce 52R a été utilisée en combinaison, lors d'un premier tour PCR, avec les amorces 04F, 02F et 05F pour l'amplification spécifique des transcrits *tat*, *rev* et *nef* respectivement. Les produits d'amplification du premier tour-PCR ont servi de matrices lors du deuxième tour-PCR, en utilisant cette fois-ci l'amorce 90R marquée avec le fluorochrome FAM (bleu), en combinaison avec les amorces 04F, 02F et 05F pour l'amplification des transcrits *tat*, *rev* et *nef* respectivement (Merzouki *et al.*, 1994b). La localisation (numérotation) des amorces sur le génome du VIH-1 correspond à celle décrite pour la souche VIH-1 LAV (Wain-Hobson *et al.*, 1985).


ADN PROVIRAL
1
2
3
4
5
6
7
8
ARN VIRAL
gag
pol
Pol R
5'-CCIATTATGTTGACGGTGTAGGTCCT-3'
2091
2064
1
Pol F
5'-AAGCTCTATTAGATACAGGAGCAGATGA-3'
1896
1923
2
3
4
2A
3A
4A
4B
5
04F
5'-CCTGGAAGCATCCAGGAAGTCAGCCTA
5439
(tat)
5465
02F
5'-AGICTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAA-3'
5534
(tat,rev)
5560
05F
5'-GAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGAICTC-3'
5558
(tat,rev,nef)
5586
7
7A
7B
52R
5'-TAAGTCTCTCAAGCGGTGGTAGCTGAA-3'
8139
8113
90R
5'-GGATCTGTCTCTGTCTCTCTCTCCA-3'
8052
8028

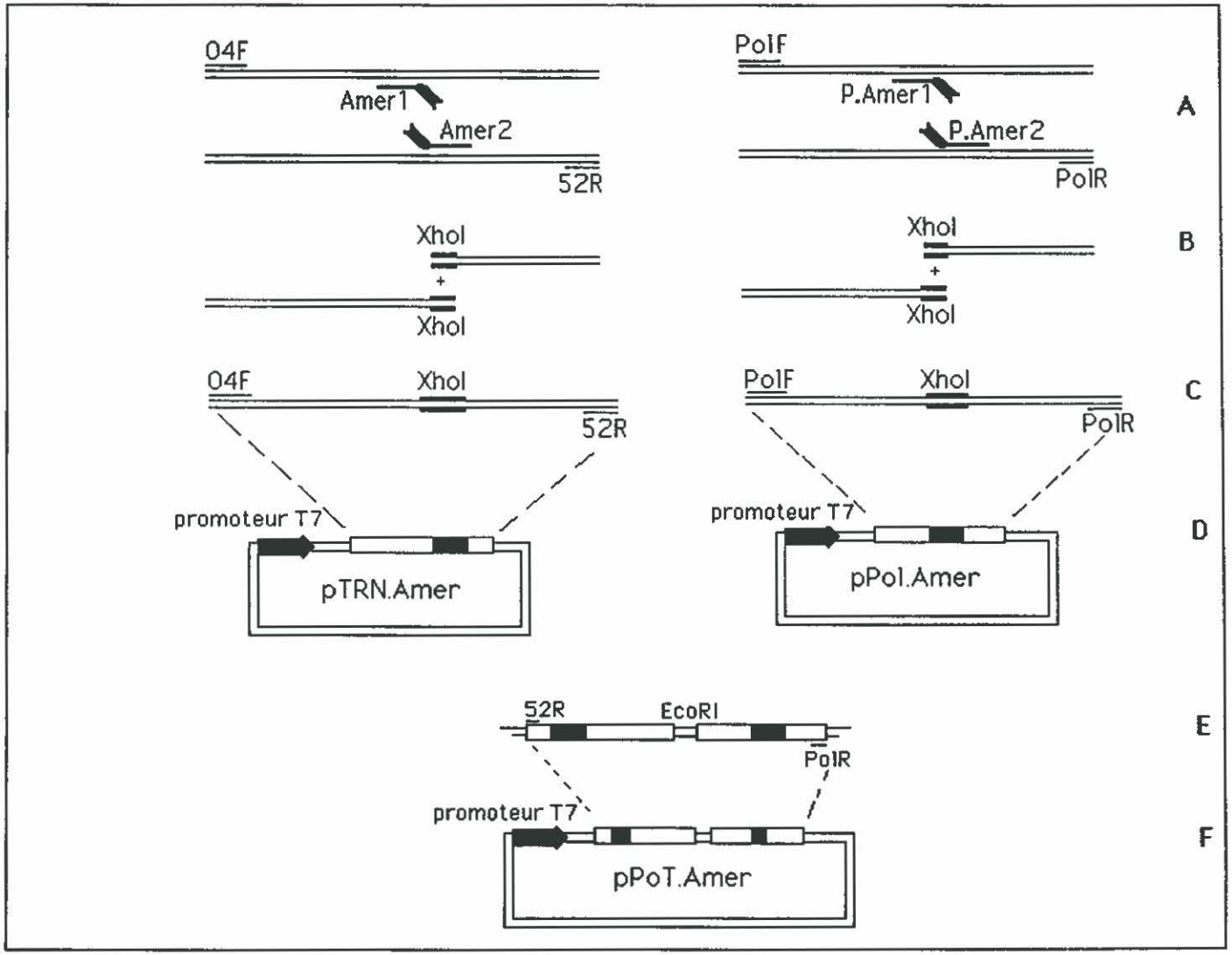
5-2 Détermination des niveaux d'ARNm du VIH-1

Environ 10^5 cellules dispérsées dans 500 µl de tampon de lyse ARN (section 3.2 de Matériel et Méthodes) ont été utilisées pour l'extraction de l'ARN selon la méthode de Chomczynski et Sacchi, (1987). La stratégie de synthèse des ADNc aux segments d'ARNm était identique à celle que nous avons déjà décrite (Merzouki *et al.*, 1994b). Brièvement, l'ARN extrait a été transcrit en ADNc à l'aide de deux amorces antisens, l'amorce 52R (fig. 7) pour les transcrites régulateurs polycistroniques (*tat*, *tat-rev* et *tat-rev-nef*) et l'amorce polR pour les ARNm non épissés (pol). L'ADNc a été additionné à des quantités croissantes d'ADN du standard interne, et les deux matrices ont été par la suite co-amplifiées, lors d'un premier tour PCR. Les amorces externes 04F-52R ont été utilisées pour amplifier les messagers *tat*, les amorces 02F-52R pour amplifier les messagers *rev*, les amorces 05F-52R pour amplifier les messagers *nef* et les amorces polF-polR pour amplifier les messagers *pol*. Après le premier tour d'amplification, 2 µl de produit PCR ont été utilisés pour la seconde réaction d'amplification, en utilisant les amorces internes 04F-90R-FAM (*tat*), 02F-90R-FAM (*rev*), 05F-90R-FAM (*nef*) et polF-polRb-JOE (*pol*) (fig.7). Les produits PCR ont été analysés sur un Balayeur de gènes (Gene Scanner) (Gene Scanner Analysis V1.2.2, 672 Software. Applied Biosystems). Les séquences d'amorces et leur localisation dans le génome du VIH-1 LAI, utilisées lors de ces expériences sont représentées dans la figure 7. Les amorces 90R et polR ont été marquées à leur extrémités 5', respectivement avec le fluorochrome FAM (bleu) et JOE (vert), tel que décrit dans la section 4.2.1 de Matériel et Méthodes.

Le nombre de transcrits messagers dans l'echantillon clinique a été calculé à partir d'une courbe standard dont chaque point correspondait au ratio de l'aire de fluorescence de la matrice cible (transcrits messagers) par rapport à celle de la matrice compétitrice (Merzouki *et al.*, 1994b). Ce ratio a été déterminé pour les différentes quantités croissantes d'ADN compétiteur ajoutées. Tous les résultats sont exprimés en nombre de copies de molécules d'ARNm par 1000 PBMC.

Figure 7: **Construction du plasmide utilisé comme standard interne dans les réactions de qc-PCR (quantitative compétitive-PCR).**

Deux fragments PCR séparés, le premier représente la région commune aux trois gènes *tat*, *rev* et *nef* (côté gauche de la figure) et le deuxième représente le gène *pol* (côté droit), ont été amplifiés à partir de l'ARN total des cellules CEM infectées avec le VIH-1 LAV. Après purification, chaque fragment a été réamplifié dans deux réactions PCR séparées, en utilisant les paires d'amorces 04F-Amer1 et 52R-Amer2 pour les gènes *tat-rev-nef* et les paires d'amorces PolF-P.Amer1 et PolR-P.Amer2 pour le gène *pol.* **(ligne A)**. Les amorces internes Amer1, Amer2, P.Amer1 et P.Amer2 contiennent chacune une queue de 17 à 21 extra-nucléotides et des sites de restriction *Xho*I à leur extrémité 5'. Les sous-produits PCR pour chacun des fragments **(ligne B)** ont été alors digérés par *Xho*I, puis ligués **(ligne C)** et clonés directement dans le vecteur de clonage TA pCR-II (Invitrogen) pour créer les plasmides pTRN.Amer et pPol. Amer **(ligne D)**. Les inserts à l'intérieur de ces plasmides ont été flanqués des deux côtés par des sites *Eco*RI. Les inserts libérés, après digestion par *Eco*RI, des plasmides pTRN.Amer et pPol.Amer ont été ligués ensemble **(ligne E)**. Le produit de ligation a été par la suite amplifié en utilisant les amorces 52R et PolR et le fragment mixte résultant a été cloné dans le vecteur pCR-II pour créer le plasmide standard interne, pPoT. Amer **(ligne F)**. (Merzouki *et al.*, 1994b; Michael *et al.*, 1995). Le plasmide pPoT.Amer a été utilisé comme standard interne, dans les réactions de qc-PCR, pour la quantification des transcrits messagers *tat*, *rev*, *nef*, et *pol.*


04F
Amer1
Amer2
52R
PolF
P.Amer1
P.Amer2
PolR
A
XhoI
+
XhoI
B
04F
XhoI
52R
promoteur T7
pTRN.Amer
PolF
XhoI
PolR
promoteur T7
pPol.Amer
C
D
52R
EcoRI
PolR
promoteur T7
pPoT.Amer
E
F

RÉSULTATS

1- Établissement des cellules exprimant les antigènes de surface du VIH-1 NL4.3

Le premier objectif de ce projet de recherche consistait à l'établissement de cellules qui expriment de façon stable les antigènes viraux de surface codés par le gène *env* du VIH-1 NL4.3. Nous avons donc utilisé le vecteur d'expression pDOLHIVenv qui renferme les séquences codantes des gènes *tat*, *rev* et *env* du VIH-1 NL4.3, en amont du promoteur du LTR de MuLV. Une fois transfecté dans les cellules eucaryotes, ce plasmide est capable de diriger la synthèse d'un polypeptide précurseur d'environ 861 acides aminés, hautement glycosylé, ayant une masse moléculaire de 160 kDa (gp160) qui est clivé par une protéase cellulaire (la furine) en une glycoprotéine externe de 120 kDa (gp120) et une glycoprotéine transmembranaire de 41 kDa (gp41).

1-2 Transfection par électroporation

Les paramètres d'électroporation des plasmides pDOLHIVenv et pDOLHIVenvR ont été sélectionnés en mesurant l'efficacité de transfection en variant le voltage (V) et la capacité (FD: Faraday). Plusieurs essais préliminaires nous ont permis d'établir les conditions optimales de transfection à 200 V avec une capacité de 900 µFD pour les cellules CEM-T4 et 250V avec une capacité de 300 µFD pour les cellules CEM.NKR. Ces conditions entraînaient une mortalité cellulaire respectivement de 40% et de 50%. Les cellules CEM-T4 et CEM.NKR transfectées avec les plasmides pDOLHIVenv et pDOLHIVenvR ont été maintenues en culture en milieu de sélection (R10 contenant 1000 µg/ml de généticine G418) puis clonées par dilution limite. La concentration optimale de 1000 µg/ml de généticine a été déterminée au préalable lors des tests de cytotoxicité à la généticine. Les clones cellulaires ainsi établis ont été criblés pour l'expression des antigènes de surface du VIH-1.

1-3 Quantification du niveau d'expression des antigènes de surface du VIH-1

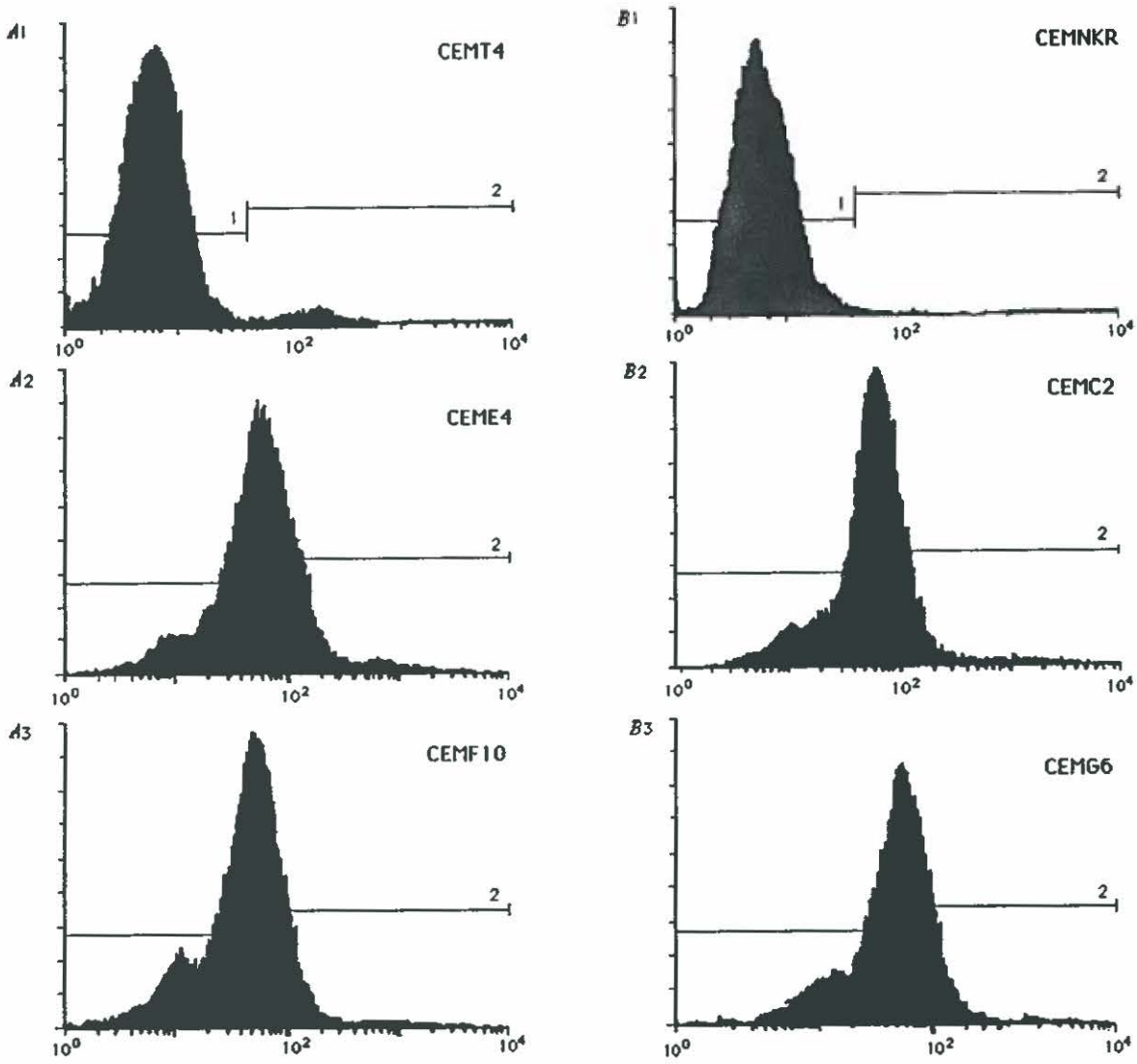
1-3.1 Analyse par cytométrie de flux (FACS)

L'expression des antigènes viraux, à la surface des cellules clonées résistantes à la G418, a été testée par cytométrie de flux, en utilisant comme source d'anticorps anti-VIH-1 un "pool" de sérums de 5 individus séropositifs. Le sérum anti-VIH-1 ne réagit pas avec les cellules CEM-T4 et CEM.NKR non transfectées ou transfectées avec le plasmide contrôle pDOLHIVenvR. Tel qu'illustré par les profils d'immunofluorescence (fig. 8), et tel que déterminé par le cytomètre, les populations cellulaires des clones CEME4 et CEMF10 (issues des cellules CEM-T4) expriment à leur surface les antigènes du VIH-1 dans des proportions de 82% (fig. 8-A2) et 50% (fig. 8-A3). Les populations cellulaires des clones CEMC2 et CEMG6 (issues des cellules CEM.NKR) expriment les antigènes de surface dans des proportions de 56% (fig. 8-B2) et 75% respectivement (fig. 8-B3). Le pourcentage de cellules exprimant les antigènes viraux de surface correspond au pourcentage de cellules dont l'intensité de fluorescence est supérieur à celle des cellules contrôles. Les cellules CEM-T4 et CEM.NKR non transfectées ou transfectées avec le plasmide contrôle utilisées comme contrôles négatifs n'expriment aucun antigène VIH-1 (fig. 8-A1 et 8-B1).

Figure 8: **Analyse par cytométrie de flux du niveau d'expression des antigènes du VIH-1 à la surface des cellules transfectées.**

Un million de cellules ont été marquées à l'aide d'un pool de sérums anti-VIH-1 plus FITC-GAHIgG (IgG anti humain de chèvre conjugué à la fluorescine) puis analysées pour leur immunofluorescence. Le pool de sérums anti-VIH-1 ne réagit pas avec les cellules CEM-T4 (**A1**) et CEM.NKR (**B1**) utilisées i) comme contrôles négatifs pour l'expression des antigènes de surface du VIH-1, ii) comme contrôles pour déterminer le bruit de fond dû à l'autofluorescence de cellules et à la fixation non-spécifiques des réactifs (sérum anti-VIH-1 plus FITC-GAHIgG). Le niveau de fluorescence accompagné d'un déplacement des populations cellulaires (vers la droite du curseur par rapport aux cellules contrôles) présentés dans les histogrammes **A2**, **A3**, **B2** et **B3** correspondent à la fixation spécifique, par les anticorps anti-VIH-1, des antigènes viraux exprimés à la surface des cellules des clones CEME4 et CEMF10 (issues des cellules CEM-T4) et des clones CEMC2 et CEMG6 (issues des cellules CEM.NKR). Le pourcentage de cellules exprimant les antigènes viraux de surface variait d'un clone à un autre. Ainsi et tel que déterminé par le cytomètre, les cellules CEME4 et CEMF10 exprimaient les antigènes de surface dans proportions variant de 50% à 82%, alors que les cellules CEMC2 et CEMG6 exprimaient ces antigènes dans des proportions variant de 56% à 75%.

Les histogrammes obtenus après incubation des cellules CEM-T4 et CEM.NKR, non-transfectées ou transfectées par le plasmide contrôle pDOLHIVenvR, en présence de sérum de donneur séronégatif, ressemblent aux histogrammes en **A1** et en **B1**.


A1
CEMT4
1
2
10^0
10^2
10^4
B1
CEMNKR
1
2
10^0
10^2
10^4
A2
CEME4
2
10^0
10^2
10^4
B2
CEMC2
2
10^0
10^2
10^4
A3
CEMF10
2
10^0
10^2
10^4
B3
CEMG6
2
10^0
10^2
10^4

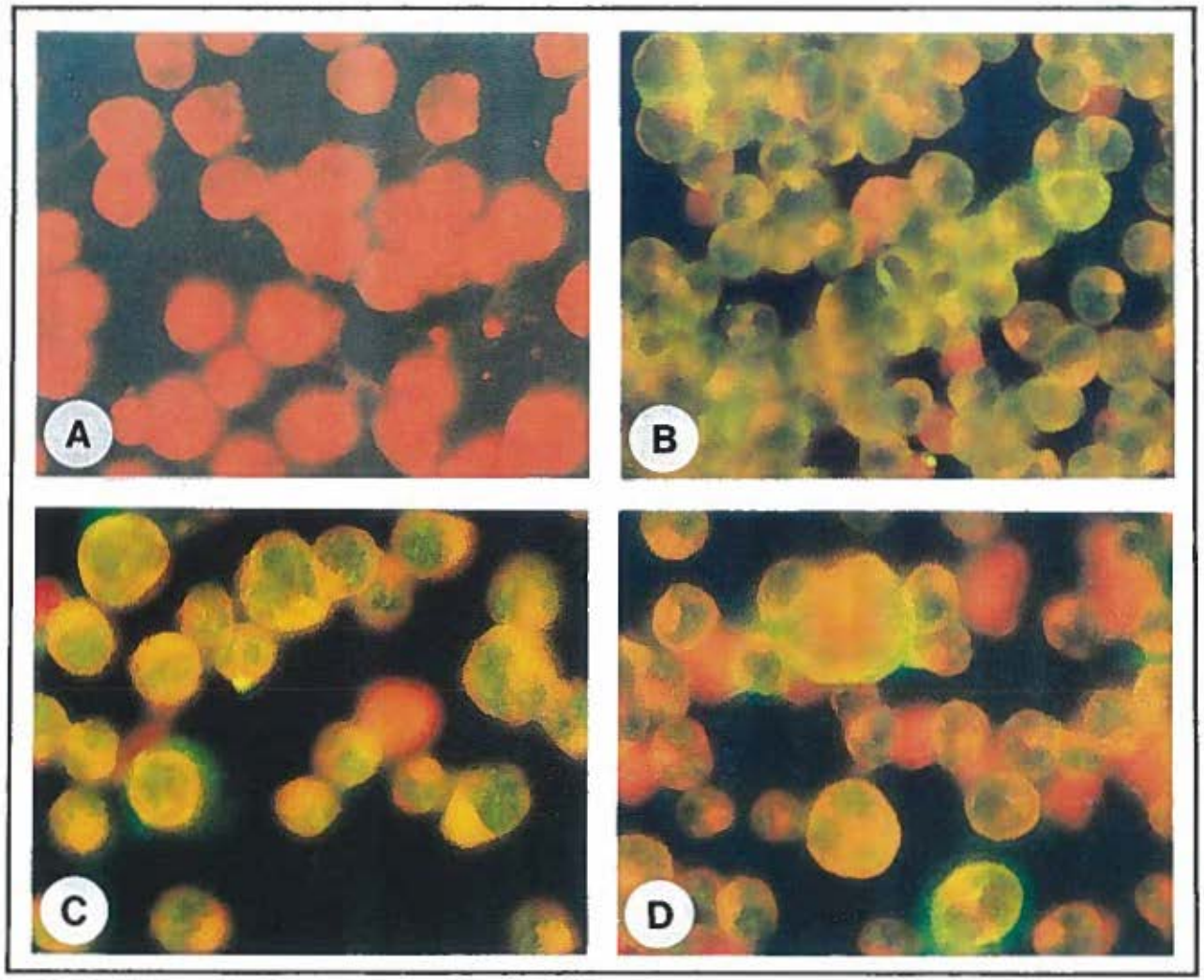
1-3.2 Immunofluorescence en microscopie

La technique d'immunofluorescence en microscopie a été utilisée pour établir le nombre de cellules exprimant les antigènes VIH-1, ainsi que la localisation dans les cellules de ces antigènes. Plus que 90% des cellules issues du clone CEMG6 étaient positives pour les antigènes du VIH-1 (fig. 9B, C, D). Les antigènes du VIH-1 étaient présents à la périphérie du cytoplasme et à la surface des membranes cellulaires. En cytométrie de flux, seulement 75% (fig. 8-B3) de cette même population cellulaire exprimaient les antigènes viraux à leur surface. Cette différence dans le niveau de détection de l'expression des antigènes viraux de surface pourrait être due à la formation de complexes gp160-récepteur CD4 dans le cytoplasme. Les cellules CEM-T4 et CEM.NKR non-transfectées ou transfectées avec le plasmide contrôle n'ont montré aucune expression d'antigènes viraux (fig. 9-A).

L'analyse par immunofluorescence indirecte nous a permis de montrer l'expression de la gp120 à la surface des cellules transfectées, mais aussi la présence probable de la gp160 complexé au récepteur CD4 dans le cytoplasme de ces cellules. Ces deux résultats ont été confirmés par radioimmunoprécipitation.

Figure 9: Immunofluorescence en microscopie.

Immunofluorescence des cellules CEMG6 clonées exprimant les antigènes viraux de surface, sélectionnées comme cellules cibles pour les tests ADCC. Les cellules, en culture dans des plateaux de 24 puits, ont été fixées à l'acétone sur des lames de microscope puis incubées en présence d'un pool de sérums anti-VIH-1 d'individus séropositifs. La fixation des anticorps anti-VIH-1 spécifiques, a été détectée à l'aide de FITC-GAHIgG (IgG anti-humain de chèvre conjugués à la fluoresceine). Les anticorps anti-VIH-1 n'ont pas réagit avec les cellules CEM.NKR transfectées avec le plasmide pDOLHIVenvR (contrôle), utilisées comme contrôle négatif (**A**). Alors que les antigènes du VIH-1 étaient présents à la périphérie du cytoplasme et à la surface des membranes des cellules CEMG6 (**B, C et D**) respectivement à 30, 45 et 60 jours post-transfection.


A
B
C
D

1-3.3 Radioimmunoprécipitation (RIA)

Marquage des glycoprotéines membranaires à l'iode radioactif: Le marquage des glycoprotéines membranaires à l'iode radioactif ^{125}I suivie d'une immunoprécipitation en présence d'un "pool" de sérums de patients séropositifs a montré l'expression de la gp120 à la surface des cellules des clones, CEME4, CEMG6 et CEMC2 (fig. 10-A). Nous n'étions cependant pas capables de détecter la gp41. L'absence de la gp41 pourrait tout simplement être due à la limite de détection de la technique RIA. Les cellules contrôles CEM.NKR n'ont montré aucune expression d'antigènes viraux.

Co-immunoprécipitation des antigènes gp160-récepteur CD4: La co-immunoprécipitation des récepteurs CD4 cellulaires et de la gp160, à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-CD4, OKT4 (fig. 10-B), a confirmé l'expression des antigènes viraux, par les cellules des clones CEMG6, CEMC2 et CEME4 et la formation des complexes gp160-CD4 à l'intérieur des cellules. L'immunoprécipitation de ces complexes (gp160-CD4) a également confirmé l'intégrité fonctionnelle des glycoprotéines recombinantes, vu qu'elles sont capables de fixer le récepteur CD4.

L'analyse par RIA n'a révélé aucune présence des antigènes gp120/160 dans les surnageants de cultures de cellules. De même, nous n'étions pas capables de détecter la gp41, ni dans les cellules ni dans les surnageants des cultures de cellules.

Figure 10: Radioimmunoprécipitation

A: Expression de la gp120 à la surface des cellules transfectées.

Les protéines membranaires de 5 x 10^6 cellules ont été préalablement marquées à l'iode radioactif ^{125}I en utilisant l'Iodo-gen. Les immunoprécipitations ont été effectuées à partir des lysats cellulaires à l'aide d'un pool de sérums de patients séropositifs puis analysées par SDS-PAGE. **Puits 1, 2 et 3:** clones cellulaires CEME4, CEMG6 et CEMC2 exprimant les antigènes du VIH-1 (gp120 indiquée par la flèche du haut). **Puits 4**: cellules CEM.NKR utilisées comme contrôle négatif pour l'expression des antigènes du VIH-1.

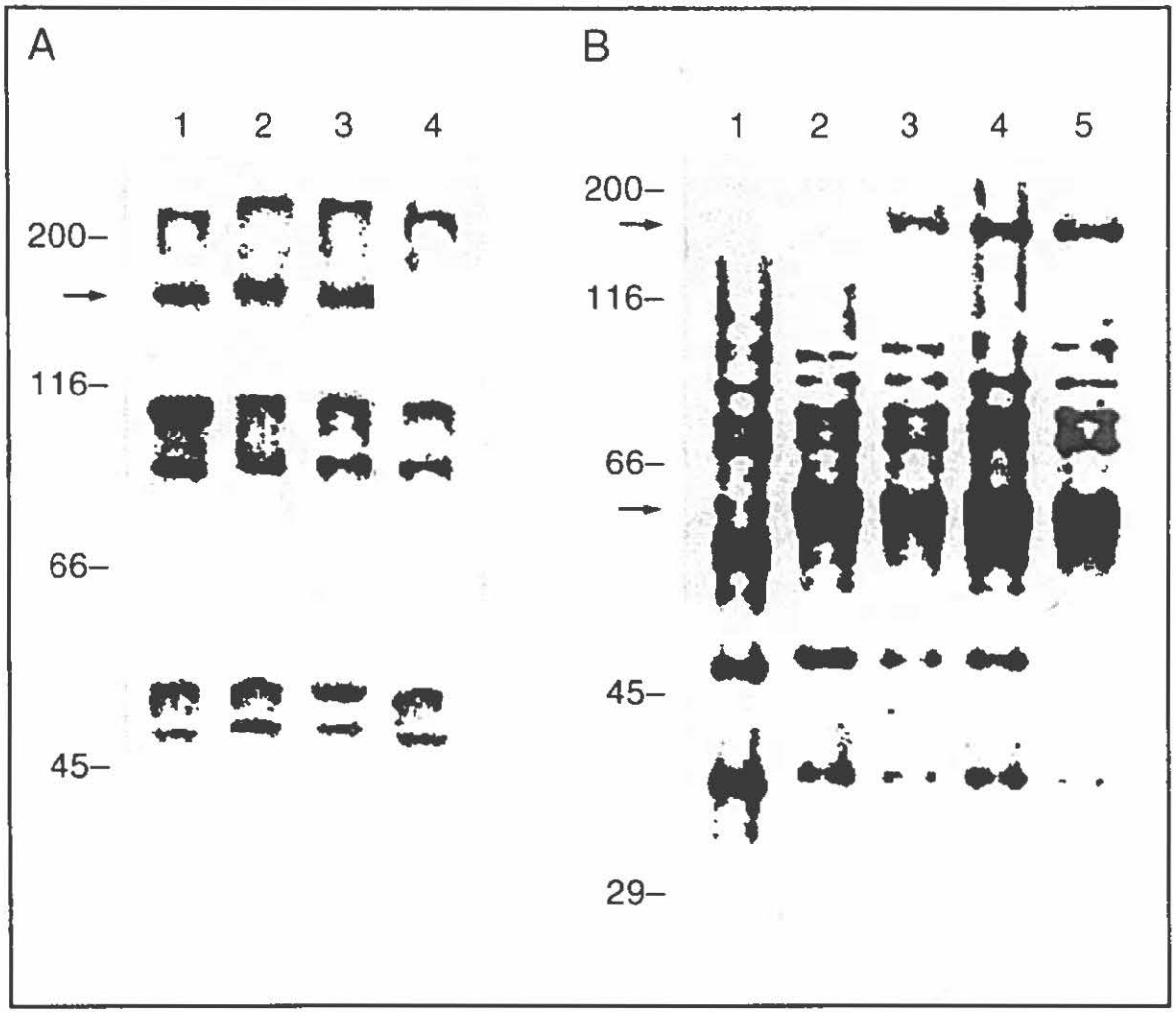
B: Co-immunoprécipitation du récepteur CD4 et de la gp160 virale.

La co-immunoprécipitation a été effectuée après marquage métabolique de 6 x 10^6 cellules en présence de la méthionine ^{35}S, à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-CD4, OKT4. La protéine CD4 cellulaire et la protéine gp160 virale ainsi précipité, ont été analysées par SDS-PAGE.

Puits 1: cellules CEM.NKR utilisées comme contrôle négatif pour l'expression des antigènes viraux et comme contrôle positif pour l'expression des récepteurs CD4.

Puits 2, 3 et 4: clones cellulaires CEMT4, CEMG6 et CEMC2 montrant l'expression de la glycoprotéine précurseur de l'enveloppe du VIH-1, la gp160 (indiquée par la flèche du haut) ainsi que les antigènes CD4 (flèche du bas).

Puits 5: cellules Raji utilisées comme contrôle négatif pour l'expression des antigènes du VIH-1 et pour l'expression des récepteurs CD4.


A
1
2
3
4
200–
116–
66–
45–
B
1
2
3
4
5
200–
116–
66–
45–
29–

1-3.4 Culture cellulaire, formation de syncitia

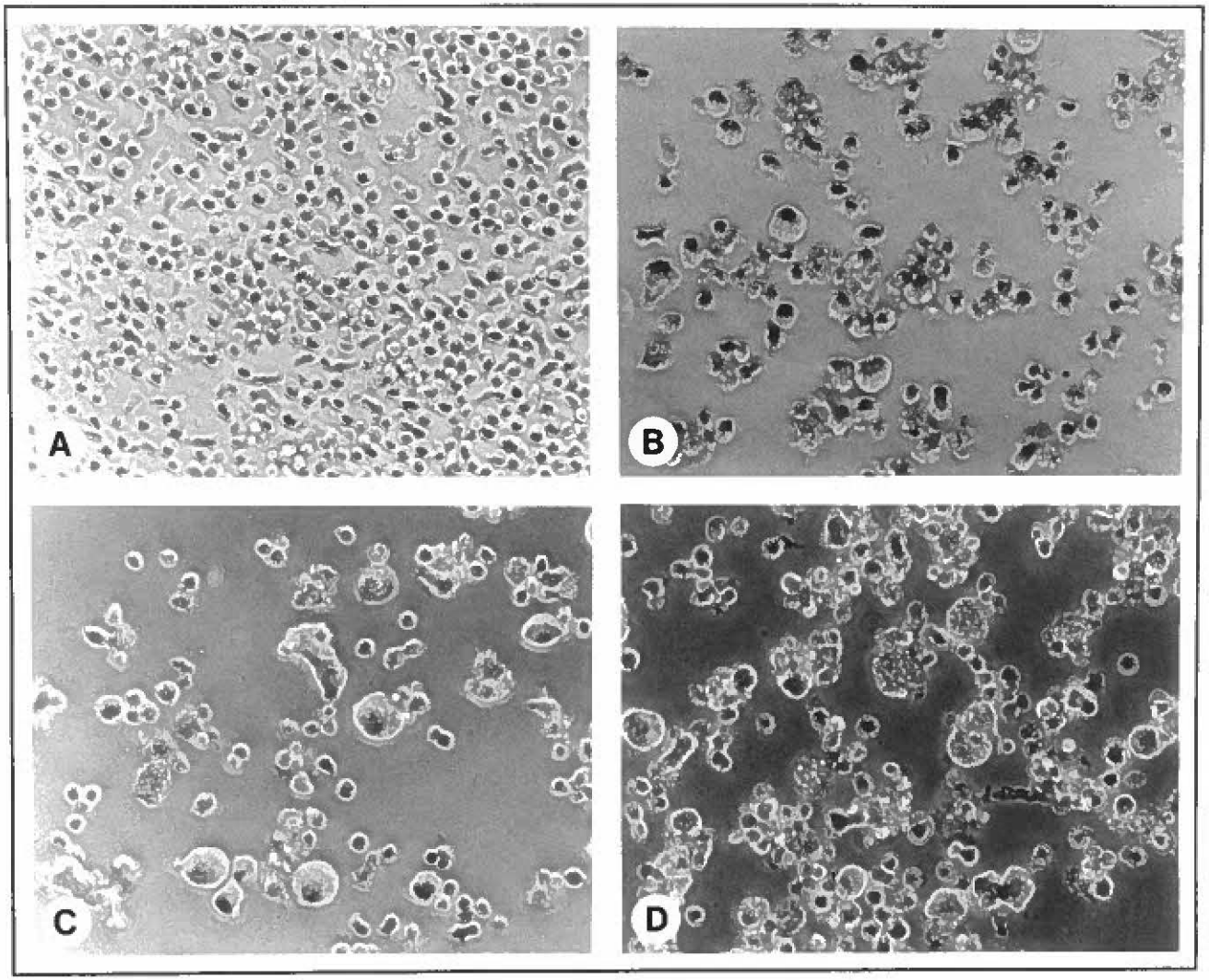
In vitro, et peut-être *in vivo*, les cellules transfectées ou infectées exprimant les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH-1 à leur surface sont capables de former des cellules géantes multinucléées (syncitia) avec des cellules (infectées ou non) exprimant les récepteurs CD4 à leur surface. La capacité d'induire la formation de syncitia compte en partie dans la cytopathologie du VIH-1 (déplétion des cellules CD4).

Les examens en microscopie photonique à 48h d'intervalles ont montré qu'en conditions normales de culture (1 x 10^6 cellules/ml dans des flacons de culture F-25), les cellules transfectées formaient peu ou pas de syncitia (<3%). Les mêmes observations ont été faites lors des co-cultures des cellules CEMG6 (5 x 10^5 cellules/ml) et des cellules-T Jurkat $CD4^+$ (5 x 10^5 cellules/ml) ou lors des co-cultures des cellules CEMG6 et les PBMC (5 x 10^5 cellules/ml) de donneurs normaux. Cependant, quand les cellules exprimant la gp120/160 à leur surface étaient maintenues en culture dans des plateaux à 24 puits à des concentrations élevées (2 x 10^6 cellules/ml). avec le temps, une plus grande proportion de cellules (<10%) pouvait induire la formation de syncitia (fig. 11). Ceci pourrait s'expliquer par une plus grande accessibilité d'antigènes de surface libres (gp120/160 et récepteur CD4). Les examens en microscope ont également montré l'absence de changements au niveau de la cinétique de croissance des cellules exprimant les antigènes du VIH-1 par rapport aux cellules non-transfectées ou transfectées avec le plasmide contrôle.

Figure 11: Formation de syncitia dans les cellules transfectées exprimant les antigènes de surface du VIH-1.

En conditions normales de culture (1 x 10^6 cellules/ml), les cellules transfectées formaient peu ou pas de syncitia. Cependant, en culture dans des plateaux de 24 puits à des concentrations élevées (2 x 10^6 cellules/ml), des syncitia commencaient à apparaître parmi les cellules.

Par exemple, les cellules CEMG6 en conditions normales de culture **(A)** ne formaient pas de syncitia, alors qu'en culture dans des plateaux 24 puits (2 x 10^6 cellules/ml), des syncitia commençaient à apparaître, au jour 15 **(B)**, 20 **(C)** et 25 **(D)** après le début de la culture. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase.


A
B
C
D

2- Caractérisation immunobiologique des cellules exprimant les antigènes de surface du VIH-1

Le deuxième volet de notre premier objectif consistait à évaluer le potentiel des cellules exprimant la gp120/160, comme cellules cibles dans les tests ADCC. Les cellules clonées, sélectionnées comme cellules cibles pour les tests ADCC, devraient montrer: d'une part, une résistance significative à la lyse spontanée par les cellules effectrices de donneurs séronégatifs et d'autre part, une susceptibilité significative et spécifique à la lyse par ces mêmes cellules effectrices (par le mécanisme ADCC), en présence de sérums de patients séropositifs.

2-1 Susceptibilité à la lyse spontanée par les cellules effectrices (PBMC) en absence d'anticorps anti-VIH-1

L'activité ADCC peut être facilement masquée par la lyse "anticorps indépendant" des cellules cibles par les cellules effectrices (PBMC). Nous avons testé cette susceptibilité à la lyse par les PBMC, des trois lignées cellulaires, CEM-T4, CEM.NKR, et K562 ainsi que les cellules (clones) CEMG6 et CEMC2 sélectionnés comme cellules cibles dans les tests ADCC. Les cellules CEM-T4 se sont avérées presque aussi susceptibles à la lyse par les PBMC que les cellules K562 utilisées comme cibles standards pour la lyse NK/K (fig. 12-A). Le pourcentage de lyse spécifique était de l'ordre de 54,3±4,8 pour les cellules K562 par rapport à 32,4±8,1 pour les cellules CEM-T4, alors que les clones CEMG6 et CEMC2 exprimant la gp120/160 à leur surface ont preservé leur résistance à la lyse spontanée par les cellules effectrices de donneurs normaux. La différence entre le pourcentage moyen de la lyse de ces clones et de la lyse des cellules CEM.NKR non-transfectées n'était pas significative ($p>0,05$) (fig. 12-A). Le pourcentage de lyse des cellules CEMG6 était de l'ordre de 9,4±3,1 par rapport à 6,9±3,8 pour les cellules CEM.NKR non-transfectées.

2-2 Susceptibilité à la lyse spécifique par les cellules effectrices en présence d'anticorps anti-VIH-1 (ADCC indirecte)

Pour évaluer leur susceptibilité à la lyse par le mécanisme ADCC, les cellules des clones CEMG6 et CEMC2 ont été marquées avec du ^{51}Cr, puis utilisées comme cibles dans un test ADCC (section 3.3 de Matériel et Méthodes), soit en présence de sérum d'individu séronégatif, soit en présence de différentes dilutions d'un "pool" de sérums de patients séropositifs. Tel qu'illustré dans la figure 12-B, une lyse spécifique significative ($p \leq 0,05$) a été observée quand les cellules cibles ont été incubées en présence d'un "pool" de sérum de patients séropositifs (à la dilution 10^{-3}). Le pourcentage de lyse était de l'ordre de 55,2±5,2 pour les cellules CEMG6 et de l'ordre de 48,1±4,8 pour les cellules CEMC2, alors qu'aucune lyse significative n'a été observée en présence de sérum d'individu séronégatif ($p>0,05$) (un pourcentage de lyse 9,8±3,4 pour les cellules CEMG6 et de 8,3±3,7 pour les cellules CEMC2).

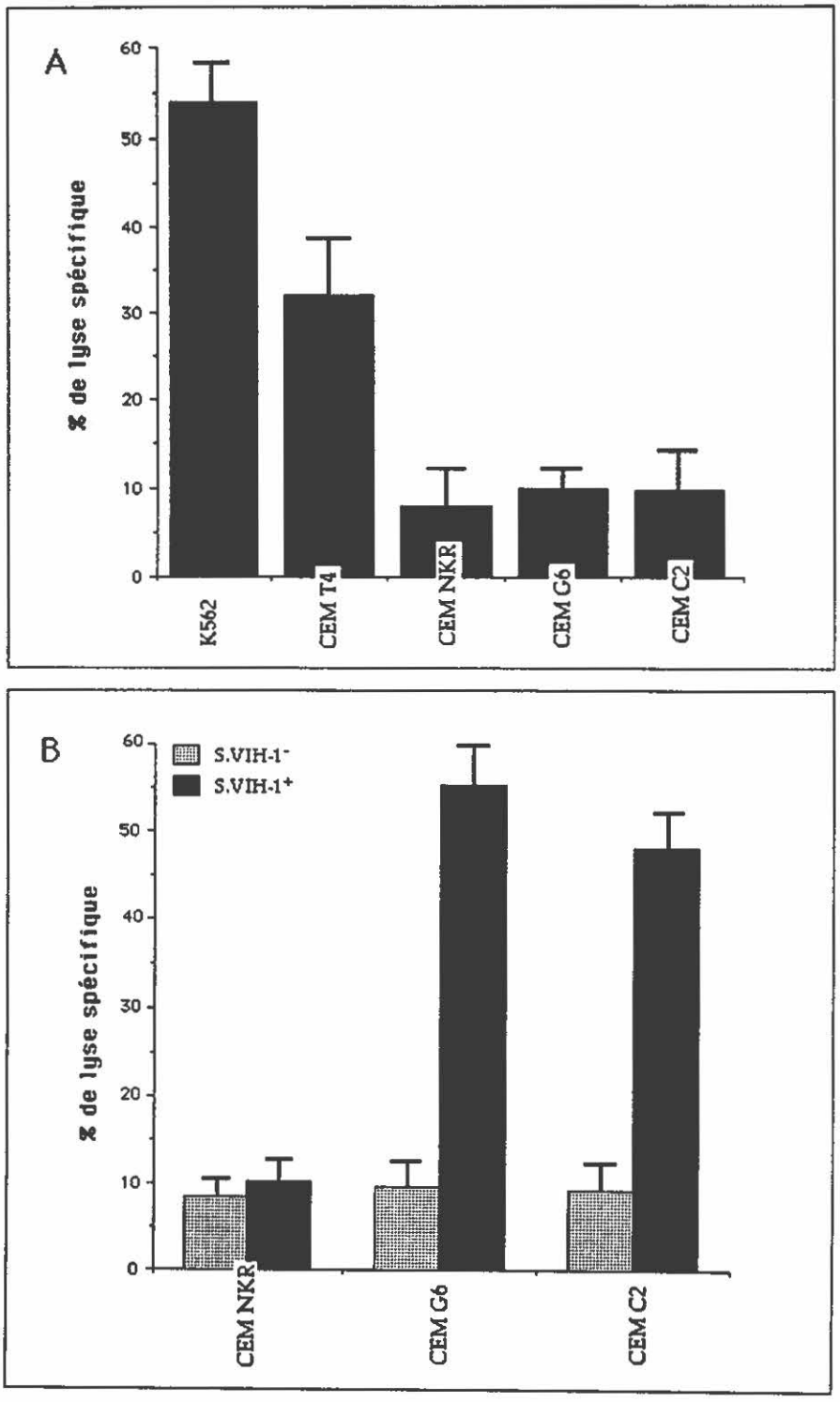
Le ratio effecteurs-cibles utilisé dans les tests ADCC était de 50:1, ce ratio donnait le meilleur rendement "lyse spécifique/bruit de fond" et a été choisi lors d'expériences préliminaires utilisant différents ratio effecteurs:cibles (20:1, 50:1 et 100:1), en présence de dilutions décimales du "pool" de sérums d'individus séropositifs.

La caractérisation immunobiologique des cellules CEMG6 et CEMC2, qui terminait notre premier objectif, nous a permis d'arrêter notre choix sur les cellules CEMG6 comme cellules cibles pour évaluer l'activité ADCC dans les sérums de patients à différents stades de l'infection. En effet, les cellules CEMG6 dont une proportion de 75% exprimaient les antigènes viraux de surface (gp120/160) ont gardé une résistance à la lyse spontanée par les cellules effectrices (PBMC), comparable à celle des cellules CEM.NKR non-transfectées, en plus de présenter une grande susceptibilité à la lyse spécifique par le mécanisme ADCC en présence d'anticorps anti-VIH-1.

Figure 12: Caractérisation immunobiologique des cellules exprimant les antigènes de surface du VIH-1 comme cellules cibles dans les tests ADCC.

A: Susceptibilité à la lyse spontanée par les cellules effectrices (PBMC) de donneurs séronégatifs en absence d'anticorps anti-VIH-1. Les cellules CEM-T4 se sont avérées aussi susceptibles à la lyse par les PBMC que les cellules K562 utilisées comme cibles standards pour la lyse NK. Les clones cellulaires CEMG6 et CEMC2 exprimant la gp120/160 ont gardé leur résistance à la lyse spontanée par les cellules effectrices de donneurs normaux. La différence entre le pourcentage moyen de la lyse de ces clones et de la lyse des cellules CEM.NKR non-transfectées n'est pas significative ($p>0,05$).

B: Susceptibilité à la lyse par les cellules effectrices (PBMC) de donneurs séronégatifs, des cellules CEMC2 et CEMG6, en présence d'anticorps anti-VIH-1 (lyse par le mécanisme de l'ADCC). Une lyse spécifique significative ($p\leq0,05$) a été observée quand les cellules cibles CEMG6 et CEMC2 ont incubées en présence d'un pool de sérums de patients séropositifs. Aucune lyse significative n'a été observée en présence de sérum de donneur séronégatif ($p>0,05$).


A
% de lyse spécifique
60
50
40
30
20
10
0
K562
CEM T4
CEM NKR
CEM G6
CEM C2
B
S.VIH-1⁻
S.VIH-1⁺
% de lyse spécifique
60
50
40
30
20
10
0
CEM NKR
CEM G6
CEM C2

3- Évaluation des titres des anticorps ADCC dans les sérums de patients à différents stades de l'infection au VIH-1

Notre deuxième objectif était d'évaluer l'activité ADCC dans les sérums de patients d'une cohorte croisée couvrant les différents stades de l'infection au VIH-1

Les cellules CEMG6 ont été utilisées comme cellules cibles pour déterminer les titres d'anticorps ADCC spécifiques au VIH-1 dans 33 sérums de patients à différents stades de l'infection (11 au stade II, 10 au stade III et 12 au stade IV). Les dilutions en série des sérums ont été effectuées dans du milieu de culture et un volume de 50 µl a été utilisé par test ADCC en présence de 10^4 cellules cibles marquées au ^{51}Cr et 10^5 PBMC de donneurs séronégatif (section 3.3 de Matériel et Méthodes). Le titre d'anticorps ADCC présent dans chaque sérum correspond à la plus grande dilution de ce sérum capable de diriger une lyse spécifique 5% supérieure à la lyse des cellules contrôles en présence de ce même sérum. Alors que le niveau d'activité ADCC, pour chaque sérum, a été exprimé sous forme de moyenne des pourcentages de lyse spécifique (± la déviation standard) à la dilution 10^{-3}.

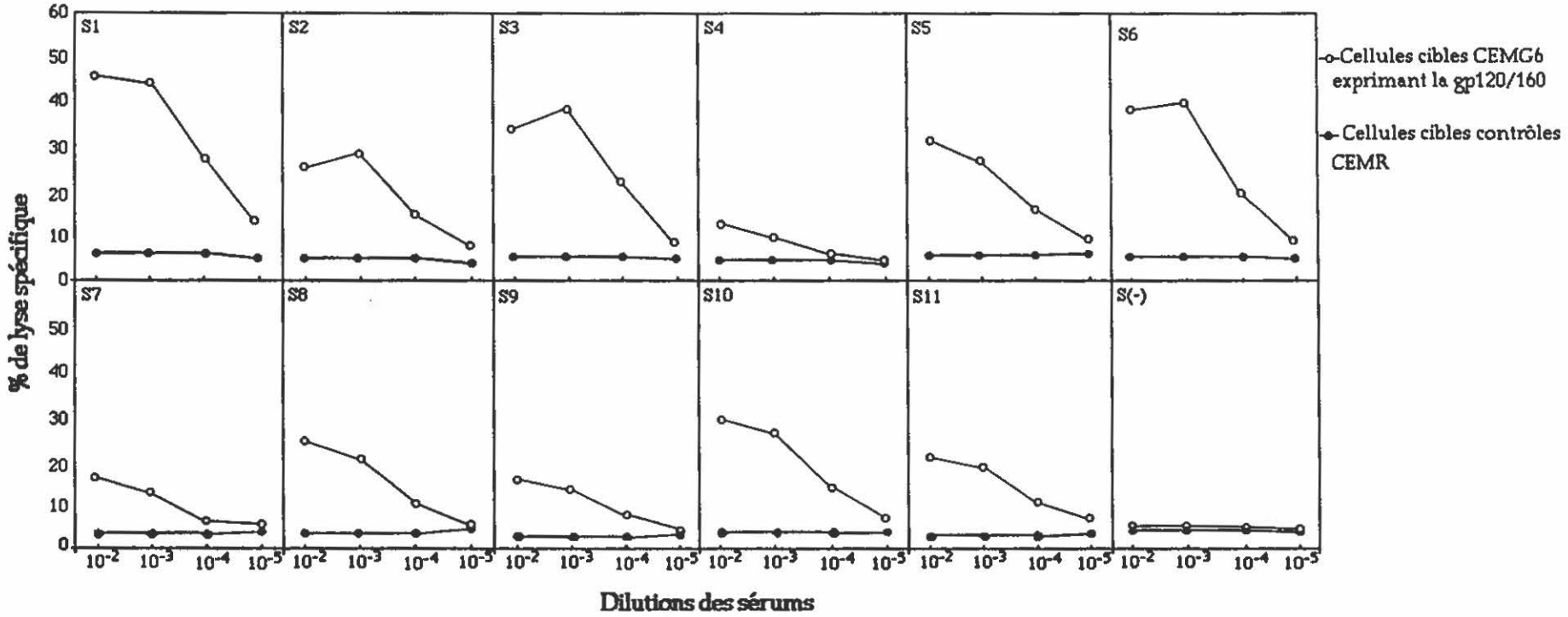
3-1 Titres d'anticorps ADCC présents dans les sérums de patients au stade II de l'infection (séropositifs asymptomatiques)

Lors des tests visant à déterminer les titres d'anticorps ADCC anti-VIH-1 dans les sérums des individus au stade II de l'infection, nous avons mis en évidence la présence de différentes activités lytiques sous-optimales "prozone" à la dilution 10^{-2}. Il s'agit particulièrement des sérums S2, S3 et S6 (fig. 13). L'origine du phénomène de la réactivité "prozone" n'est pas bien connu et il ne semble pas être relié à la densité des antigènes à la surface des cellules cibles. Les mêmes cellules cibles avec la même densité d'antigènes ont été utilisées dans tout les tests ADCC. Ce phénomène déjà rapporté par plusieurs auteurs pourrait être dû i) à la présence dans les sérums de faibles quantités de substance

inhibitrices capables d'interagir avec les récepteurs Fc ii) à la présence d'anticorps bloquants et/ou iii) à la formation de complexes immuns ou d'agrégats d'immunoglobulines. Cependant, et à l'exception de cette activité lytique sous optimale présente dans les sérums S2, S3 et S6 à la dilution 10^{-2}, le pourcentage de la lyse spécifique diminue avec la dilution des sérums. Donc, en écartant la dilution 10^{-2}, l'activité ADCC maximale a été obtenue à la dilution 10^{-3} des sérums. Ce sont les pourcentages de lyse obtenus avec cette dilution (10^{-3}) qui ont été utilisés pour exprimer les niveaux d'activité ADCC (tableau 4).

Les résultats des tests ADCC ont montré et ce pour la première fois, que 100% des sérums d'individus séropositifs asymptomatiques possédaient des anticorps capables de diriger un ADCC anti-VIH-1 significatif. Les niveaux d'activités ADCC variaient de 9,9±0,4 (sérum S4) à 44,3±2,8 (sérum S6) avec une moyenne pour l'ensemble des sérums au stade II, de l'ordre de 25,7±11,5 (tableau 4). En plus la majorité de ces sérums possédaient des titres d'anticorps ADCC supérieur à 10^4 (82% des sérums) (fig. 13, tableau 4). Parmi ces sérums, 1 seul (sérum S1) avait un titre $>10^5$ sans pour autant atteindre un niveau $\geq 10^6$. En fait, à la dilution 10^{-6} la différence entre la lyse spécifique des cellules cibles et celle des cellules contrôles n'était plus significative.

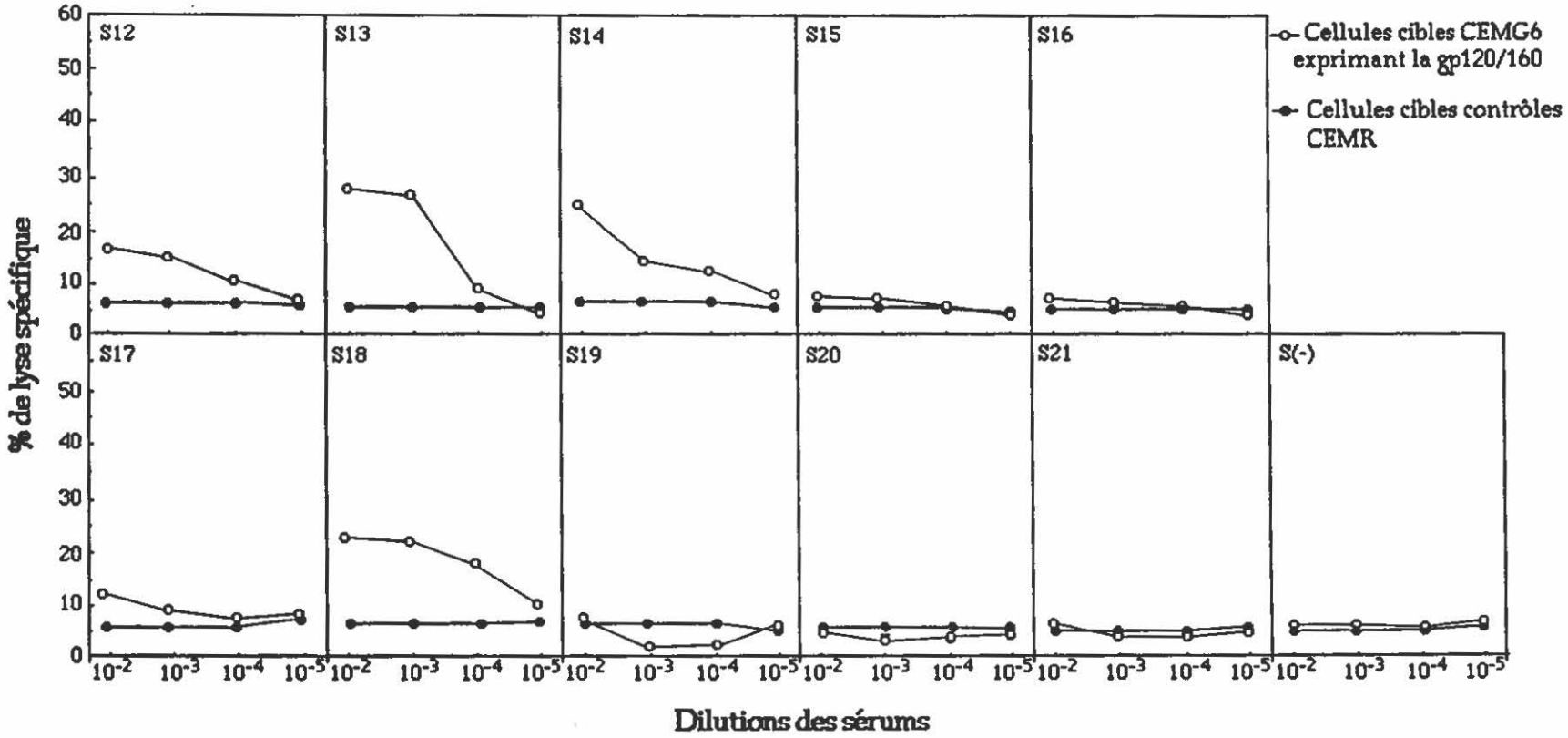
Figure 13: Titres d'anticorps ADCC présents dans les sérums de 11 patients (S1 à S11) au stade II de l'infection au VIH-1 (séropositifs asymptomatiques), en utilisant comme cellules cibles, les cellules CEMG6. Chacun des points des courbes de titrage correspond à la valeur moyenne de 3 tests ADCC. Le titre d'anticorps ADCC correspond à la plus grande dilution du sérum capable de diriger une lyse spécifique 5% supérieure à la lyse des cellules contrôles en présence de ce même sérum. À l'exception de l'activité lytique sous-optimale présente dans les sérums S2, S3 et S6 à la dilution 10^{-2}, le pourcentage de la lyse spécifique diminue avec la dilution des sérums, 100% des sérums de patients au stade II de l'infection montraient des anticorps ADCC anti VIH-1.


S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
S10
S11
S(-)
% de lyse spécifique
Dilutions des sérums
Cellules cibles CEMG6 exprimant la gp120/160
Cellules cibles contrôles CEMR

3-2 Titres d'anticorps ADCC présents dans les sérums de patients au stade III de l'infection

Contrairement au stade II de l'infection où 100% des sérums montraient des titres d'anticorps ADCC $\geq 10^3$ et dont 82% avaient des titres $>10^4$, seulement les sérums de 4 individus (sur 10) au stade III de l'infection avaient des titres d'anticorps ADCC $>10^3$ et uniquement 2 de ces sérums (S14 et S18) montraient des titres légèrement supérieur à 10^4 (fig. 14, tableau 4), alors que les sérums de 5 patients (sur 10) au stade III n'avaient aucun titre d'anticorps ADCC. Pour ces sérums, aucune différence significative n'a été observée entre le pourcentage de lyse des cellules cibles et celui des cellules contrôles (fig. 14). Le niveau moyen de l'activité ADCC pour le stade III était de l'ordre de 10,3±8,9 comparativement à un niveau ADCC de l'ordre de 25,7±11,5 pour le stade II de l'infection (tableau 4).

Figure 14: Titres d'anticorps ADCC présents dans les sérums des 10 patients (S12 à S21) au stade III de l'infection au VIH-1 en utilisant comme cellules cibles, les cellules CEMG6. Chacun des points des courbes de titrage correspond à la valeur moyenne de 3 tests ADCC. Le titre d'anticorps ADCC correspond à la plus grande dilution du sérum capable de diriger une lyse spécifique 5% supérieure à la lyse des cellules contrôles en présence de ce même sérum. Uniquement les sérums de 5 patients (sur 10) au stade III de l'infection avaient des anticorps ADCC anti-VIH-1.


S12
S13
S14
S15
S16
S17
S18
S19
S20
S21
S(-)
Cellules cibles CEMG6 exprimant la gp120/160
Cellules cibles contrôles CEMR
% de lyse spécifique
Dilutions des sérums

3-3 Titres d'anticorps ADCC présents dans les sérums de patients au stade IV de l'infection

Au stade IV de l'infection, l'absence d'anticorps ADCC était plus prononcée que dans le stade III. Ainsi, 9 sérums sur 12 n'avaient aucun titre d'anticorps ADCC (fig. 15). Fait surprenant, les trois autres sérums (S25, S31 et S33) ayant montré une activité ADCC significative avaient des titres d'anticorps ADCC $\geq 10^3$. Le niveau moyen de l'activité ADCC pour l'ensemble des sérums de patients au stade IV était de l'ordre de 6,4±8,1 comparativement à 10,3±8,9 au stade III et 25,7±11,5 au stade II (tableau 4).

L'aboutissement de notre deuxième objectif de recherche nous a révélé que la réponse ADCC, qui semble intacte durant le stade asymptomatique, est lourdement altérée durant les stades avancés de l'infection (stades III et IV). Ceci suggère une possible implication de l'activité ADCC dans le maintien de l'état asymptomatique, en particulier depuis que son déclin (ADCC) coïncide avec la progression de l'infection et la déplétion du nombre de cellules CD4 (tableau 4 et fig. 16). La déplétion des cellules CD4 est caractéristique de l'altération de la fonction des cellules-T et des perturbations du système immunitaire probablement responsable de la progression de l'infection vers le stade SIDA.

Figure 15: Titres d'anticorps ADCC présents dans les sérums des 12 patients (S22 à S33) au stade IV de l'infection au VIH-1 en utilisant comme cellules cibles, les cellules CEMG6. Chacun des points des courbes de titrage correspond à la valeur moyenne de 3 tests ADCC. Le titre d'anticorps ADCC correspond à la plus grande dilution du sérum capable de diriger une lyse spécifique 5% supérieure à la lyse des cellules contrôles en présence de ce même sérum. Uniquement les sérums de 3 patients (sur 12) au stade IV de l'infection avaient des anticorps ADCC anti-VIH-1.

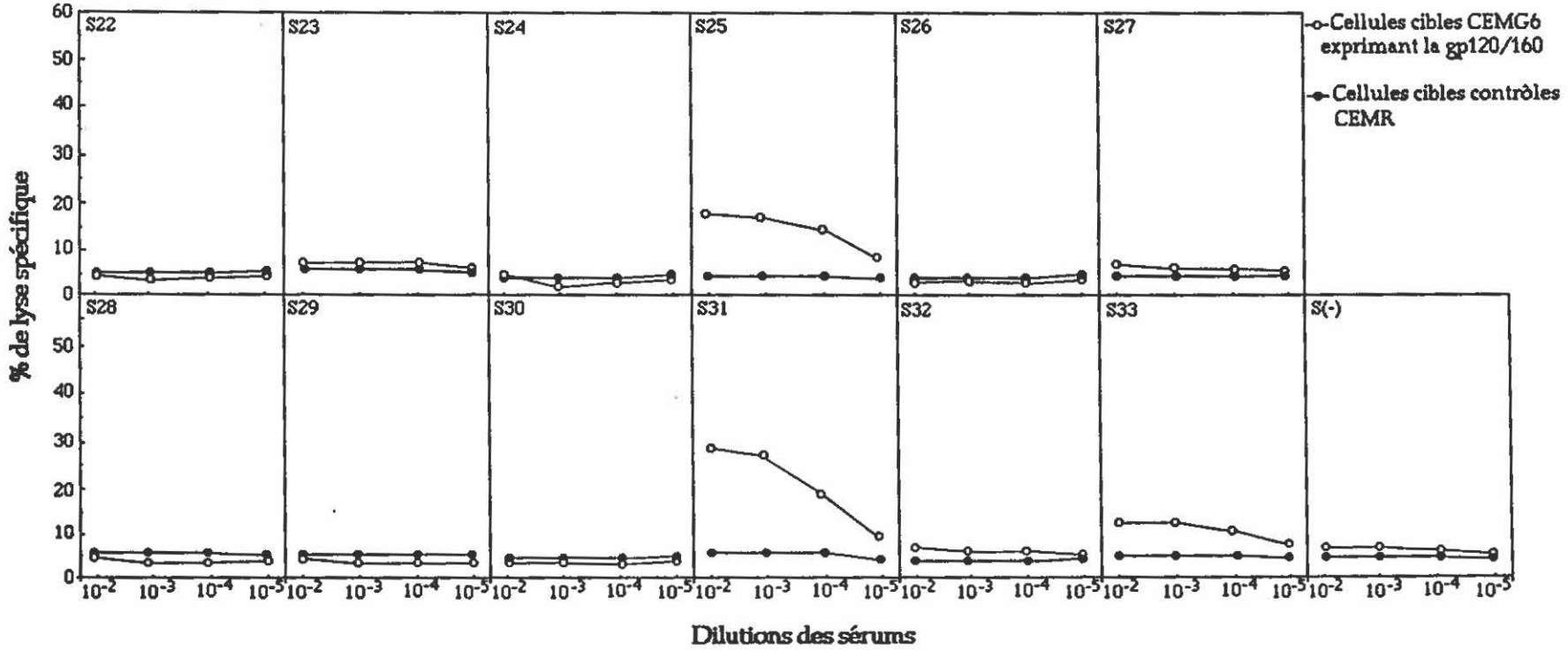

S22
S23
S24
S25
S26
S27
S28
S29
S30
S31
S32
S33
S(-)
% de lyse spécifique
Dilutions des sérums
Cellules cibles CEMG6 exprimant la gp120/160
Cellules cibles contrôles CEMR

Tableau 4: Tableau récapitulatif montrant, pour chacun des échantillons cliniques, le compte de cellules CD4, l'activité ADCC (± la déviation standard) à la dilution 10^{-3} des sérums, et les titres d'anticorps ADCC déduit à partir des courbes de titrages présentées dans les **figures 13, 14 et 15.**

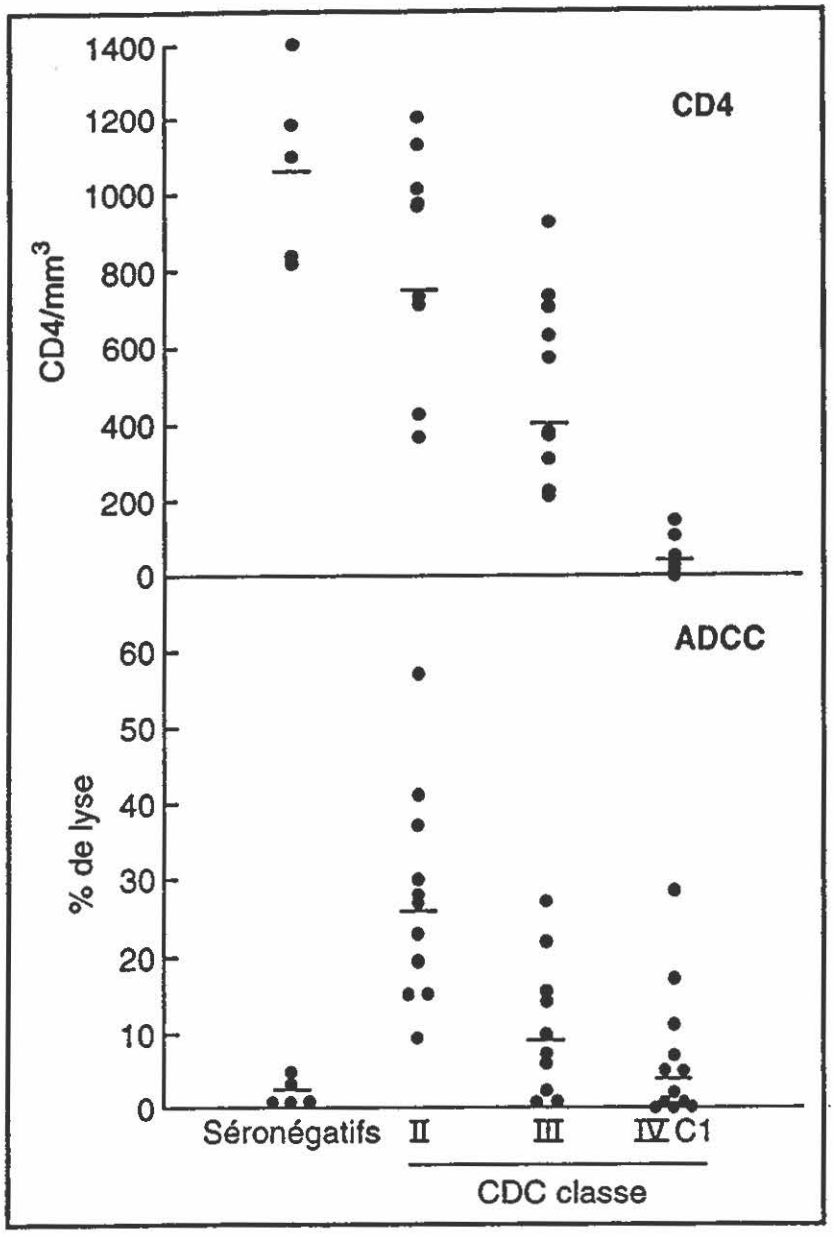
Sérum	Cellules CD4 (mm^3)	ActivitéADCC (% ± D.S)	Titres d'anticorps ADCC	Classe CDC
C1	1400	1.1 ± 0.7	nég.	Séronégatif
C2	1180	1.0 ± 0.2	nég.	Séronégatif
C3	840	4.2 ± 0.2	nég.	Séronégatif
C4	820	2.5 ± 0.4	nég.	Séronégatif
C5	1100	1.5 ± 0.4	nég.	Séronégatif
Moyenne	**1026 ± 240**	**2.0 ± 1.3**		
1	1010	44.3 ± 2.8	$>10^5$	II
2	980	28.6 ± 2.0	$\leq 10^5$	II
3	430	38.1 ± 2.1	$>10^4$	II
4	640	9.9 ± 0.4	$\leq 10^3$	II
5	1050	27.0 ± 2.5	$>10^4$	II
6	1220	40.2 ± 2.5	$>10^4$	II
7	700	13.9 ± 0.7	$>10^3$	II
8	710	21.4 ± 2.0	$\geq 10^4$	II
9	380	13.8 ± 0.9	$\leq 10^4$	II
10	975	26.3 ± 1.9	$>10^4$	II
11	700	18.8 ± 1.3	$>10^4$	II
Moyenne	**799 ± 267**	**25.7 ± 11.5**		
12	700	15.2 ± 1.0	$\leq 10^4$	III
13	926	26.3 ± 1.1	$\geq 10^3$	III
14	735	14.6 ± 0.5	$\geq 10^4$	III
15	210	5.1 ± 0.6	nég.	III
16	220	5.8 ± 0.4	nég.	III
17	390	8.0 ± 0.3	$\geq 10^2$	III
18	400	22.4 ± 0.9	$>10^4$	III
19	360	1.1 ± 0.1	nég.	III
20	620	1.7 ± 0.2	nég.	III
21	595	3.1 ± 0.2	nég.	III
Moyenne	**515 ± 236**	**10.3 ± 8.9**		
22	21	1.6 ± 0.5	nég.	IV C1 AZT
23	25	4.7 ± 0.2	nég.	IV C1 DDI
24	7	1.2 ± 0.2	nég.	IV C1 DDI Rétinite
25	148	17.9 ± 0.5	$>10^4$	IV C1 AZT Rétinite
26	28	1.3 ± 0.2	nég.	IV C1 DDI Rétinite
27	100	4.7 ± 0.2	nég.	IV C1 DDI Rétinite
28	1	1.1 ± 0.4	nég.	IV C1 DDI Rétinite
29	2	1.7 ± 0.1	nég.	IV C1 DDI
30	7	2.3 ± 0.2	nég.	IV C1 DDI CMV
31	50	27.8 ± 0.9	$>10^4$	IV C1 AZT
32	28	6.1 ± 0.2	nég.	IV D AZT SIDA-SK
33	30	11.3 ± 0.5	$\geq 10^3$	IV C1 AZT
Moyenne	**37.25 ± 44**	**6.4 ± 8.1**		

3-4 Niveaux d'activité ADCC à différents stades de l'infection en rapport avec le compte de cellules CD4

La figure 16 indique clairement un déclin de l'activité ADCC et du nombre de cellules CD4 avec la progression de l'infection. Le niveau ADCC à différents stades de l'infection (25,7±11,5 au stade II, 10,3±8,9 au stade III et 6,4±8,1 au stade VI) semble être directement proportionnelle au déclin du nombre moyen des cellules CD4 (799±267 au stade II, 515±236 au stade III et 37±44 au stade VI). Il est cependant difficile d'établir une relation directe, de cause à effet, entre le déclin de l'ADCC et celui des cellules CD4. En effet plusieurs individus ayant une numération CD4 élevée ou normale (tableau 6) ne montraient aucune réponse ADCC (le cas par exemple des patients P19, P20 et P21) ou une faible réponse (le cas du patient P4). Contrairement à d'autres patients (exemple des patients P25 et P31) dont le compte CD4 était faible ou très faible, mais qui montraient une réponse ADCC significative. Cependant, et à l'exception de ces quelques contre-exemples, il nous parait légitime de considérer, d'un premier point de vue, un rôle éventuel de la réponse ADCC, sûrement avec l'aide d'autres composantes du système immunitaire, dans le maintien de l'état asymptomatique et du compte normal de cellules CD4 en circulation. Cette contribution de l'activité ADCC pourrait avoir lieu lorsque les cellules productrices de virus sont éliminées de la circulation, limitant ainsi la dissémination des virus à d'autres cellules dont les CD4.

Figure 16: Relation entre l'activité ADCC et le compte des cellules CD4.

Cette figure montre, d'un point de vu général, le déclin du niveau d'activité ADCC en rapport avec la déplétion des cellules CD4 durant les stades avancés de l'infection au VIH-1. Chaque point dans le graphique représente la valeur moyenne de trois tests ADCC, utilisant un même sérum à la dilution 10^{-3} avec un ratio effecteur/cible de 50:1. La médiane (en tiret) représente la moyenne du compte CD4 et de l'activité ADCC pour l'ensemble des patients à un stade donné de l'infection.


CD4
ADCC
CD4/mm3
% de lyse
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
60
50
40
30
20
10
0
Séronégatifs
II
III
IV C1
CDC classe

4- Étude de la diversité génétique virale à différents stades de l'infection

L'altération de la réponse ADCC peut-être due soit simplement à l'absence d'anticorps suite à l'altération du système immunitaire, soit à l'absence de la capacité des anticorps à diriger une activité ADCC, suite à des changements (mutations) dirigés par les antigènes viraux cibles, en réponse aux pressions sélectives exercées par la réponse immunitaire. Cette hypothèse de travail a constitué le troisième objectif de cette recherche qui consistait en la caractérisation génétique des populations des "quasi-espèces" provirales présentes chez les 33 patients, et dont les sérums ont été utilisés pour déterminer les titres d'anticorps ADCC. Nous avons donc pu étudier les relations entre la diversité génétique virale et l'activité ADCC. Pour ce faire, et afin d'éliminer le risque d'une sélection *in vitro* de variants intrapatients mineurs, les études de la diversité génétique virale ont été effectuées directement sur les cellules de patients, sans passer par la culture cellulaire.

4-1 Amplification enzymatique des régions du gène de l'enveloppe renfermant les séquences des épitopes ADCC

Les cellules isolées à partir du sang des individus de la cohorte (section 4.1.3 de Matériel et Méthodes) ont été utilisées directement pour l'amplification par "nested-PCR", de trois fragments du gène *env* renfermant les séquences de quatre épitopes ADCC identifiés jusqu'à date. Le premier fragment (région V3), renfermant deux épitopes ADCC, d'une taille d'environ 340 pb couvrait une partie de la région conservée C2, la région variable V3 et une partie de l'extrémité 5' de la région conservée C4 de la gp120 (fig. 2). Le deuxième fragment (région C4) d'environ 246 pb, renfermant un épitope ADCC, couvrait la majeure partie de la région conservée C4 de la gp120, sans son extrémité 5' (fig. 2) et le troisième fragment d'environ 373 pb, au niveau de la gp41 (fig. 3), couvrait l'extrémité 3' de la région conservée C5 ainsi que l'extrémité 5' de la région conservée C6.

L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose, après coloration au bromure d'éthidium, des produits amplifiés par PCR n'a montré aucun polymorphisme de taille (fig. 17-A1). Tous les fragments PCR semblaient avoir plus au moins la même taille. Cependant, l'analyse par élecrophorèse sur gel de polyacrylamide en utilisant un Balayeur de gènes "GeneScanner" et des amorces fluorescentes a montré la présence, en particulier parmi les fragments PCR correspondant à la région V3, d'un certain polymorphisme de taille (fig. 17-A2).

Une concordance a été observée entre le nombre et la taille des bandes, mesurées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, et le nombre et la taille des séquences des clones générés, après clonage et séquençage du même produit PCR. Les différences de taille entre les fragments à l'intérieur d'un même produit PCR ou entre deux produits PCR différents n'a jamais dépassé 6 pb. De même, l'uniformité de taille des bandes des régions C4 (fig. 17-B) et C5 (fig. 17-C) concordait avec les séquences des clones dont les tailles différaient peu ou pas (séctions 4.2 et 4.3 de résultats). En effet, les séquences de la région C4 ont montré peu de polymorphisme (une délétion de 3 pb par rapport à la séquence consensus), alors que les séquences de la région C5 n'ont montré aucun polymorphisme de taille.

L'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, du polymorphisme de taille des bandes PCR nous a permis de souligner un fait très important qui était, la présence à première vue, d'un niveau de polymorphisme et probablement d'une diversité génétique virale qui ne semblent pas être en relation avec la stade de l'infection. Cependant, les fragments de même taille (absence de polymorphisme) peuvent différer par la position d'espaces vides "gaps" et par le nombre et la position de substitutions et/ou délétions de nucléotides.

Les fragments PCR amplifiés à l'aide d'amorces non-fluorescentes ont été purifiés à partir du gel d'agarose puis utilisés dans les réactions de clonage et de séquençage.

Figure 17: Électrophorégrammes obtenus après migration sur gel d'agarose 1% **(A)** et sur gel de polyacrylamide 6% **(A2, B et C)**, des fragments d'ADN amplifiés par "nested-PCR" des régions V3 **(A1 et A2)**, C4 **(B)** et C5 **(C)** de la gp120/41. L'amplification des fragments d'ADN proviral a été effectuée directement à partir de l'ADN cellulaire de PBMC, des 33 patients à différents stades de l'infection au VIH-1.

Pour l'analyse sur gel de polyacrylamide, les amorces utilisées dans les réactions de "nested-PCR" ont été couplées à des fluorochromes, FAM (jaune), ROX (rouge) et JOE (bleu). Les données ont été collectées par le séquenceur d'ADN, modèle 373A d'Applied Biosystems (Gene Scanner Collection V1.1; ABI 672 Data Collection Software).

L'analyse sur gel de polyacrylamide a montré un polymorphisme de taille parmi les séquences amplifiées à l'intérieur de chacun des échantillons cliniques **(A2)**. Ce polymorphisme n'était pas visible sur gel d'agarose **(A1)**. Les régions C4 **(B)** et C5 **(C)** ont montré peu ou pas de polymorphisme de taille.

M en **(A1)**: marqueur de tailles en pb.

M en **(A2, B et C)**: marqueur de tailles de 1 paire de base.

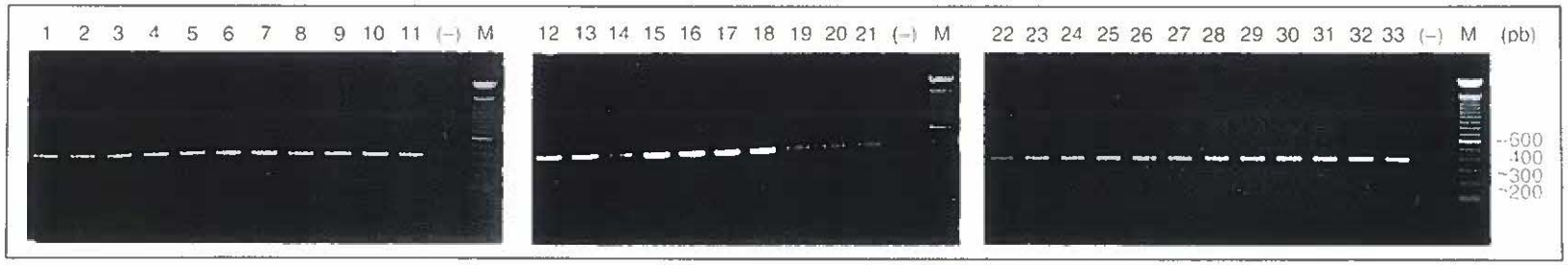
(-) contrôle négatif d'amplification (ADN cellulaire de donneurs séronégatifs)

Puits 1-11: patients au stade II de l'infection.

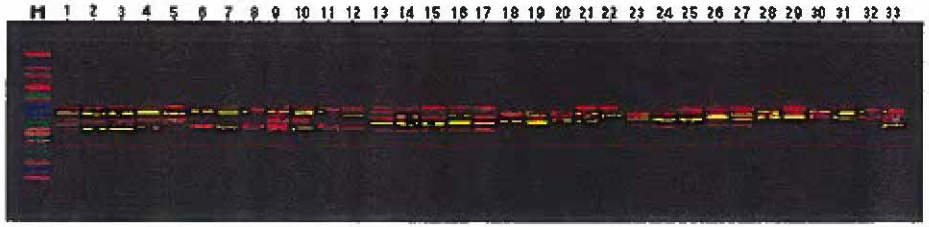
Puits 12-21: patients au stade III de l'infection.

Puits 22-33: patients au stade IV de l'infection.

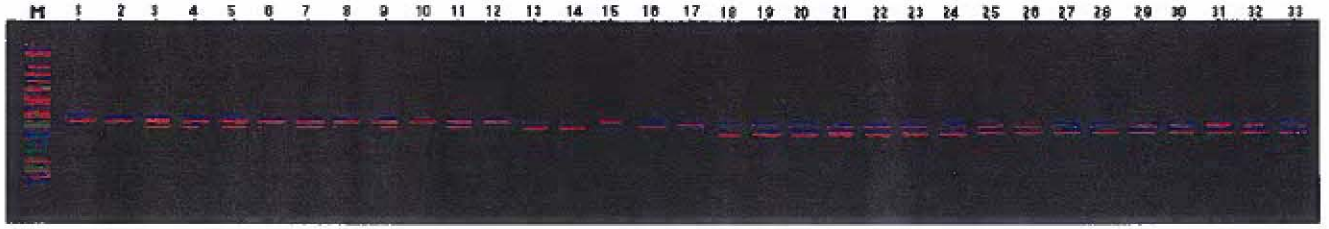
A1


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 (–) M
12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 (–) M
22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 (–) M (pb)
~600
~400
~300
~200

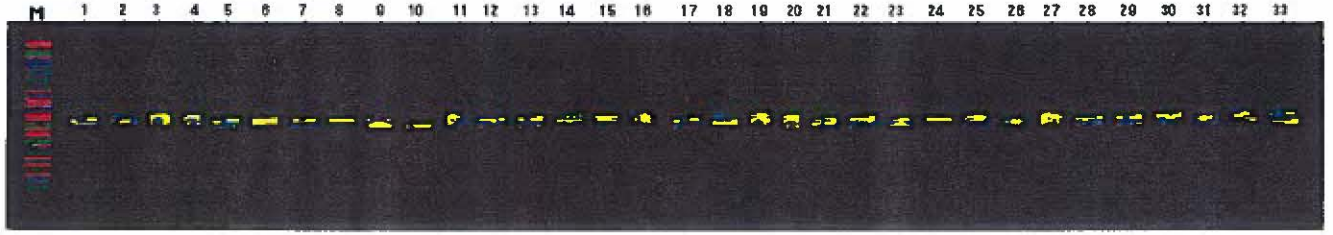
A2


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33

B


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33

C


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33

4-2 Vérification de la diversité génétique interpatients : séquençage direct des produits PCR

Dans le but de déterminer les séquences prédominantes des régions V3, C4 et C5 des isolats viraux intégrés dans l'ADN cellulaire des patients de la cohorte, les fragments d'ADN amplifiés par PCR ont été séquencés sans clonage. La majorité des fragments d'ADN amplifiés par PCR ont donné des séquences très lisibles. Les ambiguïtés, à certaines positions, dues probablement à la présence simultanée de plusieurs "quasi-espèces", ont été résolues en séquençant plus d'une fois le même produit, et en utilisant le programme SeqEd pour éditer les séquences à partir de leur chromatogrammes. Les résultats des analyses, en groupe des séquences nucléotidiques obtenues à partir des cellules infectées, sont présentés dans les figures 18, 19, et 20. Le consensus généré à partir des alignements des séquences en acides aminés est reliée à la séquence de la souche VIH-1 MN (représentante des souches isolées en Europe et en Amérique du Nord).

Ces analyses ont montré que chaque patient avait une séquence V3, une séquence C4 et une séquence C5 qui lui était unique, mettant ainsi en lumière l'absence d'un même provirus chez deux patients différents. Ces résultats expliqueraient, au moins en partie, le fait qu'à l'intérieur d'un même stade de l'infection, une réponse immunitaire comme l'ADCC pourrait différer grandement d'un patient à un autre, vu qu'elle est appelée à contrôler, chez chacun des patients, une population de virus différente qui lui est particulière.

L'analyse des divergences entre les séquences de la région V3 (fig. 18), d'environ 35 acides aminés délimitée par deux résidus cystéines, a montré, en moyenne de pourcentage, une variabilité interpatient de 12,2±2,1 au stade II de l'infection, de 12,5±2,0 au stade III et de 12,4±2,0 au stade IV (tableau 5). D'autre part, la divergence interpatients au niveau des séquences de la région C4 (fig. 19) et de la région C5 (fig. 20) n'a jamais atteint 9% (entre 5,3% à 8,6%) (tableau 5). Ces résultats nous ont confirmé un fait déjà

bien établi, à savoir que la boucle V3 et les régions avoisinantes sont appelées, en réponse à des pressions immunitaires sélectives, à changer ou à évoluer plus souvent que les régions relativement conservées, comme les régions C4 et C5. Cette vitesse de changement différentielle des séquences de différentes portions d'un même provirus, serait due principalement à la présence de régions virales fonctionnelles, qui seraient les cibles majeures de la réponse immunitaire. En effet la boucle V3 renferme, entre autres, le domaine principal de neutralisation, l'épitope de neutralisation spécifique au type, l'épitope principal des cellules T-auxiliaires, des épitopes ADCC, en plus de l'épitope majeur de la réponse CTL (fig. 18)

Cependant, le fait le plus important qui nous a été fourni par ces analyses a été sûrement celui montrant une diversité génétique virale (interpatient) durant le stade asymptomatique, très similaire à celle rencontrée durant les stades avancés de la maladie (stade III et IV). L'autre fait important est l'absence de corrélation entre la diversité génétique virale, le déclin de l'activité ADCC (ainsi que les titres d'anticorps ADCC) et le compte des cellules CD4, durant les stades III et IV de l'infection.

Il reste, par contre, à étudier la diversité génétique intrapatient, car comme nous l'avions mentionné plutôt, l'activité ADCC pourrait varier grandement d'un patient à un autre et ce à l'intérieur d'un même stade. Cette variation de l'activité ADCC pourrait être influencée par l'étendue de la diversité génétique des "quasi-espèces" à l'intérieur de chaque patient. Afin de répondre à cet objectif, nous avons dû déterminer les séquences des "quasi-espèces" après clonage des fragments d'ADN amplifiés par PCR.

Figure 18: Séquençage direct des produits PCR: diversité interpatients (région V3 de la gp120).

Alignement multiple des séquences, en acides aminés de la boucle V3 et régions avoisinantes, des quasi-espèces prédominantes isolées chez les 33 patients à différents stades de l'infection. La séquence consensus a été déduite à partir de la fréquence des différents résidus amino-acides à chaque position dans l'alignement. La similarité entre le consensus et les différentes séquences dans l'alignement est indiquée par des points (·). La présence de tiret (–) indique l'insertion d'un espace pour maintenir l'alignement.

L'analyse des séquences des quasi-espèces prédominantes a montré que chaque patient de cette cohorte avait une séquence V3 qui lui était unique, mettant en lumière l'absence d'un même provirus chez deux patients différents. La variabilité génétique interpatients (de la boucle V3) était, en moyenne, de 12,2±2,1% au stade II de l'infection, de 12,5±2,0% au stade III et de 12,4±2,0% au stade IV (Tableau 5).

Les boîtes en rouge et en vert délimitent les séquences des épitopes ADCC cartographiés dans cette région. Les résidus (C) sont les deux résidus cystéines impliqués dans la formation de la boucle V3 par pont disulfure, alors que les séquences délimitées en bleu représentent les principaux régions fonctionnelles de cette portion de la gp120: domaine principal de neutralisation (DPN), épitope de neutralisation (spécifique au type), un épitope CTL et un épitope pour les cellules T- auxiliaires.

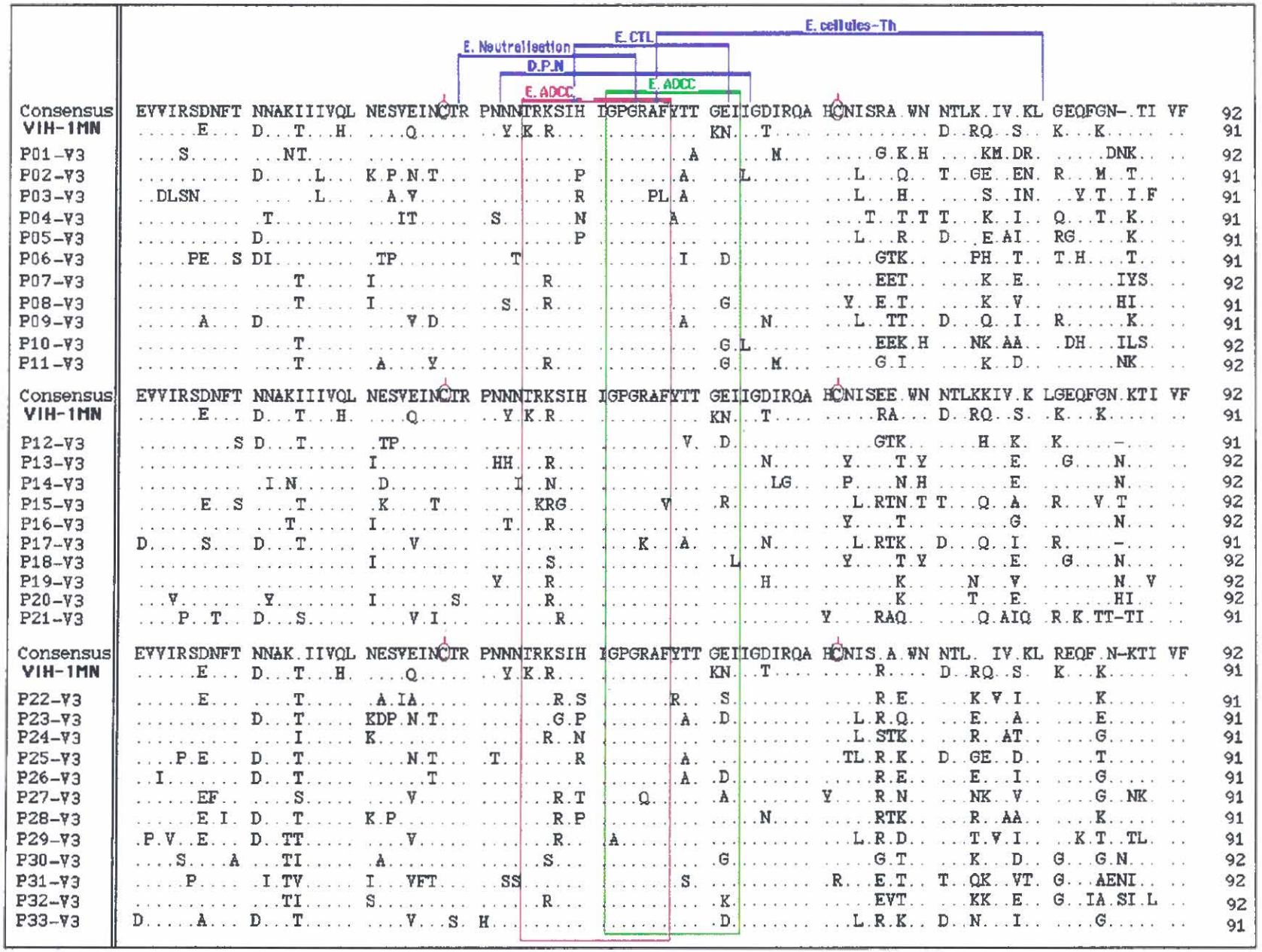
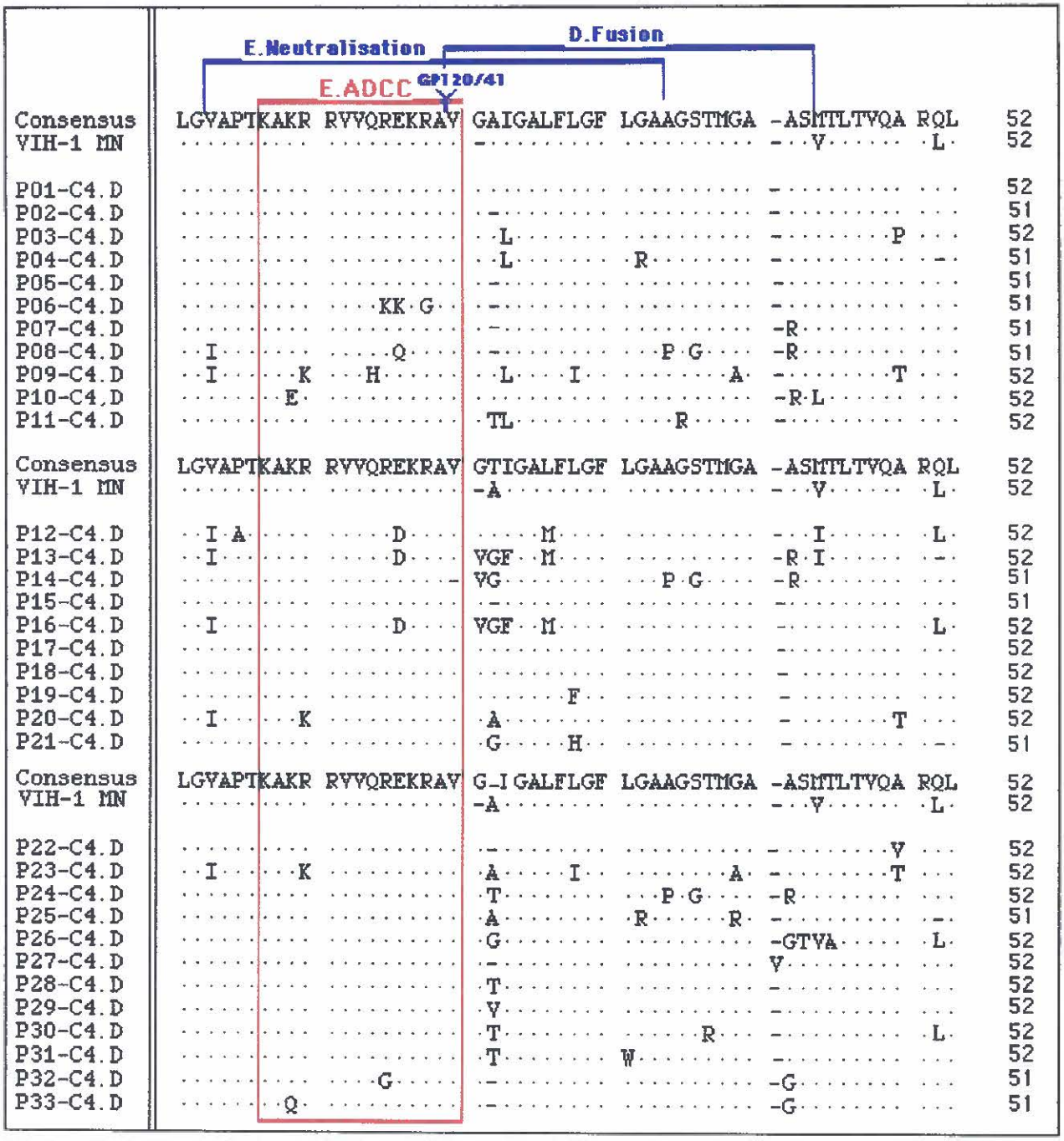

E. Neutralisation
E. CTL
E. cellules-Th
D.P.N
E. ADCC
E. ADCC

Figure 19: Séquençage direct des produits PCR: diversité interpatients (région C4 de la gp120/41).

Alignement multiple des séquences, en acides aminés de la région C4 (gp120/41), des quasi-espèces prédominantes, isolées chez les 33 patients à différents stades de l'infection. La séquence consensus a été déduite à partir de la fréquence des différents résidus amino-acides à chaque position dans l'alignement. La similarité entre le consensus et les différentes séquences dans l'alignement est indiquée par des points (·). La présence de tirets (–) indique l'insertion d'un espace pour maintenir l'alignement. La variabilité génétique interpatients (épitope ADCC et régions avoisinantes, un fragment d'environ 35 a.a) était, en moyenne, de 7,4±2,2% au stade II de l'infection, de 8,6±1,7% au stade III et de 6,5±1,5% au stade IV (tableau 5)

La boîte en rouge délimite la séquence de l'épitope ADCC cartographié dans cette région, alors que les lignes en bleu délimitent les différentes régions fonctionnelles telles que l'épitope de neutralisation et le domaine de fusion. Les séquences du site de clivage du précurseur gp160 en gp120/41, et celles de l'épitope ADCC au niveau de la région C4 sont relativement mieux conservées que les séquences de l'épitope de neutralisation.



Consensus	LGVAPTKAKR RVVQREKRAV GAIGALFLGF LGAAGSTMGA -ASMTLTVQA RQL	52
VIH-1 MN	·····-····· ····-····· -·····-····· ····-····· --·V····-· ·L·	52
P01-C4.D	·····-····· ····-····· ·····-····· ····-····· -·····-····· ···	52
P02-C4.D	·····-····· ····-····· ·-····-····· ····-····· -·····-····· ···	51
P03-C4.D	·····-····· ····-····· ·L····-····· ····-····· -·····-····P ···	52
P04-C4.D	·····-····· ····-····· ·L····-···R ····-····· -·····-····· ·-·	51
P05-C4.D	·····-····· ····-····· ·-····-····· ····-····· -·····-····· ···	51
P06-C4.D	·····-····· ···KK·G·· ·-····-····· ····-····· -·····-····· ···	51
P07-C4.D	·····-····· ····-····· ·-····-····· ····-····· -R····-····· ···	51
P08-C4.D	··I·····-····· ····Q··· ·-····-····· ···P·G··· -R····-····· ···	51
P09-C4.D	··I·····-··K ···H····· ·L····I····· ····A··· -·····-····T ···	52
P10-C4.D	·····-E·····-····· ····-····· ····-····· -R·L····-····· ···	52
P11-C4.D	·····-····· ····-····· ·TL····-····· ····R··· -·····-····· ···	52
Consensus	LGVAPTKAKR RVVQREKRAV GTIGALFLGF LGAAGSTMGA -ASMTLTVQA RQL	52
VIH-1 MN	·····-····· ····-····· -A····-····· ····-····· --·V····-· ·L·	52
P12-C4.D	··I·A···-····· ····D···· ·····M····· ····-····· ---I····-· ·L·	52
P13-C4.D	··I·····-····· ····D···· VGF··M····· ····-····· -R·I····-· ·-·	52
P14-C4.D	·····-·····- ····-····· VG····-····· ···P·G···· -R····-····· ···	51
P15-C4.D	·····-····· ····-····· -·····-····· ····-····· -·····-····· ···	51
P16-C4.D	··I·····-····· ····D···· VGF··M····· ····-····· -·····-····· ·L·	52
P17-C4.D	·····-····· ····-····· ·····-····· ····-····· -·····-····· ···	52
P18-C4.D	·····-····· ····-····· ·····-····· ····-····· -·····-····· ···	52
P19-C4.D	·····-····· ····-····· ·····F····· ····-····· -·····-····· ···	52
P20-C4.D	··I·····-···K ····-····· A····-····· ····-····· -·····-····T ···	52
P21-C4.D	·····-····· ····-····· G····H····· ····-····· -·····-····· ·-·	51
Consensus	LGVAPTKAKR RVVQREKRAV G_I GALFLGF LGAAGSTMGA -ASMTLTVQA RQL	52
VIH-1 MN	·····-····· ····-····· -A····-····· ····-····· --·V····-· ·L·	52
P22-C4.D	·····-····· ····-····· ·-····-····· ····-····· -·····-····V ···	52
P23-C4.D	··I·····-···K ····-····· A····-···I ····-····A· -·····-····T ···	52
P24-C4.D	·····-····· ····-····· T····-····· ···P·G···· -R····-····· ···	52
P25-C4.D	·····-····· ····-····· A····-····· ·R·····R· -·····-····· ·-·	51
P26-C4.D	·····-····· ····-····· G····-····· ····-····· -GTVA····-· ·L·	52
P27-C4.D	·····-····· ····-····· -····-····· ····-····· V·····-····· ···	52
P28-C4.D	·····-····· ····-····· T····-····· ····-····· -·····-····· ···	52
P29-C4.D	·····-····· ····-····· V····-····· ····-····· -·····-····· ···	52
P30-C4.D	·····-····· ····-····· T····-····· ·····R··· -·····-····· ·L·	52
P31-C4.D	·····-····· ····-····· T····-····· W····-····· -·····-····· ···	52
P32-C4.D	·····-····· ···G····· -·····-····· ····-····· -G····-····· ···	51
P33-C4.D	·····-···Q·····-····· -·····-····· ····-····· -G····-····· ···	51

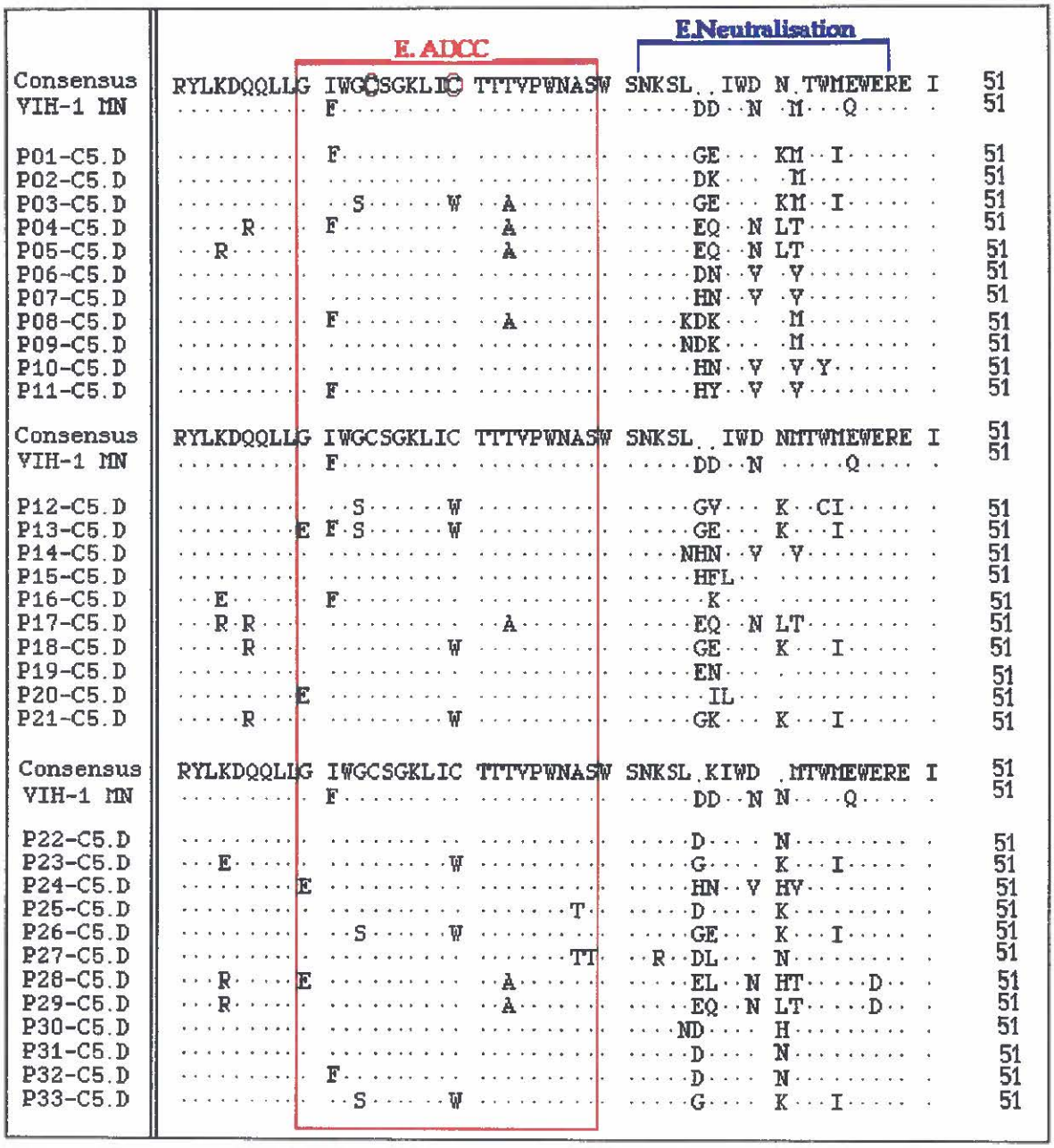
Figure 20: Séquençage direct des produits PCR: diversité interpatients (région C5 de la gp41).

Alignement multiple des séquences, en acides aminés de la région C5 (gp41), des quasi-espèces prédominantes, isolées chez les 33 patients à différents stades de l'infection. La séquence consensus a été déduite à partir de la fréquence des différents résidus amino-acides à chaque position dans l'alignement. La similarité entre le consensus et les différentes séquences dans l'alignement est indiquée par des points (·).

La boîte en rouge délimite la séquence de l'épitope ADCC cartographié dans la gp41. La variabilité génétique interpatients (épitope ADCC et région avoisinantes, un fragment de 35 a.a), était, en moyenne, de 5,3±1,9% au stade II de l'infection, de 6,9±1,2% au stade III et de 6,2±1,4% au stade IV (tableau 5)

Cette séquence renferme deux résidus cystéines «encerclés en rouge» pouvant former une boucle par pont disulfure qui pourrait être le site de reconnaissance des anticorps dirigeant l'ADCC. La substitution du second résidu cystéine par un résidu tryptophane (W) dans de nombreuses quasi-espèces pourrait détruire la structure en boucle et par conséquent le site de reconnaissance des anticorps ADCC.

Les séquences de l'épitope ADCC sont relativement bien conservées par rapport à celles de l'épitope de neutralisation délimitées en bleu.


E. ADCC
E.Neutralisation
Consensus RYLKDQQLLG IWGCSGKLIC TTTVPWNASW SNKSL..IWD N.TWMEWERE I 51
VIH-1 MN ..........F.....................DD..N..M...Q..... 51
P01-C5.D ..........F.....................GE...KM..I..... 51
P02-C5.D ..........................DK...M..... 51
P03-C5.D ...S.....W..A.....GE...KM..I..... 51
P04-C5.D .....R...F.....A.....EQ..N LT..... 51
P05-C5.D ...R.....A.....EQ..N LT..... 51
P06-C5.D ..........DN..V..V..... 51
P07-C5.D ..........HN..V..V..... 51
P08-C5.D ..........F.....A.....KDK...M..... 51
P09-C5.D ..........NDK...M..... 51
P10-C5.D ..........HN..V..V.Y..... 51
P11-C5.D ..........F.....HY..V..V..... 51
Consensus RYLKDQQLLG IWGCSGKLIC TTTVPWNASW SNKSL..IWD NMTWMEWERE I 51
VIH-1 MN ..........F.....DD..N.....Q..... 51
P12-C5.D ...S.....W.....GV...K..CI..... 51
P13-C5.D .....E.F.S.....W.....GE...K...I..... 51
P14-C5.D ..........NHN..V..V..... 51
P15-C5.D ....HFL..... 51
P16-C5.D ...E.....F.....K..... 51
P17-C5.D ...R.R.....A.....EQ..N LT..... 51
P18-C5.D .....R.....W.....GE...K...I..... 51
P19-C5.D ....EN..... 51
P20-C5.D .....E.....IL..... 51
P21-C5.D .....R.....W.....GK...K...I..... 51
Consensus RYLKDQQLLG IWGCSGKLIC TTTVPWNASW SNKSL.KIWD .MTWMEWERE I 51
VIH-1 MN ..........F.....DD..N N....Q..... 51
P22-C5.D ..........D....N..... 51
P23-C5.D ...E.....W.....G....K...I..... 51
P24-C5.D .....E.....HN..V HV..... 51
P25-C5.D ..........T.....D....K..... 51
P26-C5.D ...S.....W.....GE...K...I..... 51
P27-C5.D ..........TT..R..DL...N..... 51
P28-C5.D ...R.....E.....A.....EL..N HT.....D.. 51
P29-C5.D ...R.....A.....EQ..N LT.....D.. 51
P30-C5.D ..........ND....H..... 51
P31-C5.D ..........D....N..... 51
P32-C5.D ..........F.....D....N..... 51
P33-C5.D ...S.....W.....G....K...I..... 51

4-3 Diversité génétique intrapatient: séquençage des "quasi-espèces" isolées chez les individus à différents stades de l'infection.

Les alignements multiples des séquences, en acides aminés des trois régions du gène *env*, des "quasi-espèces" provirales isolées chez les individus à différents stade de l'infection, sont présentées dans les figures 21, 22, et 23 (région V3), figures 24, 25, et 26 (région C4) et figures 27, 28, et 29 (région C5). Les séquences nucléotidiques correspondant à ces trois régions sont présentées en **Annexe B** (fig. 39 à 47).

La grande variabilité des séquences accompagnée de peu de polymorphisme de taille ont été les faits dominants des premières analyses des séquences des régions du gène de l'enveloppe. Ces analyses ont également confirmé l'absence d'un même provirus chez deux patients différents, indiquant ainsi que chacun des patients infectés au VIH-1 possède *in vivo,* une population de "quasi-espèces" qui lui est particulière. Cependant, nous avons noté la présence de plusieurs séquences provirales identiques chez un même patient. Le nombre de séquences différentes de la région V3 (114 séquences différentes) (fig. 21, 22, et 23), est très supérieur à celui des séquences de la région C4 (88 séquences différentes) (fig. 24, 25, et 26) et à celui des séquences de la région C5 (87 séquences différentes) (fig. 27, 28, et 29). Ces résultats suggèrent que ce sont les régions variables comme la boucle V3, sous des contraintes fonctionnelles, qui "décident" du nombre et peut-être de la nature (phénotype) des quasi-éspèces rencontrées chez un patient donné.

Les taux de variabilité rapportés dans cette étude concernent particulièrement trois régions qui renferment les séquences des épitopes ADCC: i) la boucle V3 d'environ 35 a.a, ii) une région d'environ 35 a.a à l'intérieur du domaine C4 et iii) une région de 35 a.a à l'intérieur du domaine C5.

Les séquences des régions virales V3, C4 et C5 ont montré un taux de variabilité intrapatient respectivement de 6,1±3,9%, 1,8±1,7%, et de 2,0±1,9% au stade II; de

6,4±1,7%, 2,9±2,0%, et de 3,3±2,3% au stade III; et de 8,8±4,7%, 4,0±1,7%, et de 2,7±1,4% au stade IV. Le taux de variabilité intrapatient des régions V3, C4 et C5 était moins important que le taux de variabilité interpatient qui était respectivement de 12,2±2,1%, 7,4±2,2%, et 5,3±1,9% au stade II; de 12,5±2,0%, 8,6±1,7%, et de 6,9±1,2% au stade III; et de 12,4±2,0%, 6,5±1,5% et de 6,2±1,4% au stade IV. Ces variations sont dues à des événements de substitutions et/ou de délétions-insertions de nucléotides (Annexe B; figures 39 à 47), tel qu'indiqué par l'introduction d'un certain nombre d'espaces vides (gaps) dans les alignements. La région C5 de la gp41 n'a montré aucun polymorphisme de taille.

Malgré ce haut niveau de variabilité, seules 9 substitutions inactivantes ont été détectées (sur environ 150 000 pb séquencées). Toutes les mutations inactivantes ont eu lieu par introduction de codons "stop" parmi les séquences de la région V3. Ceci donnait une fréquence de substitution inactivante, de l'ordre de 1 dans 17 Kpb, beaucoup moins importante que celle déjà rapportée par d'autres auteurs. En effet, Meyerhans *et al.* (1989) ont rapporté une fréquence de mutations inactivantes de 5×10^{-4} par nucléotide, à peu près 10 fois supérieure à la fréquence de 6×10^{-5} mutations par nucléotide que nous avons observé dans cette étude.

Simmonds *et al.* (1990a) ont déjà montré que le nombre de copies de provirus VIH-1 dans les PBMC en circulation était proche de un. En tenant compte du fait que la complémentation fonctionnelle est quasiment impossible à l'intérieur d'une cellule infectée, il est très peu probable d'avoir des proportions élevées de provirus défectifs vu qu'ils seraient continuellement exposés à une très forte sélection pour qu'ils soient fonctionnels. Les résultats que nous avons présentés dans ce travail ont montré que même dans une des régions les plus variables (V3) du génome du VIH-1, la fréquence des mutations inactivantes reste très faible, indiquant la présence d'une forte sélection pour le maintien du cadre de lecture ouvert.

La puissance de cette sélection favorisant l'existence (ou la viabilité) des séquences d'acides aminés est indiquée par un ratio de substitutions synonymes/substitutions non-synonymes très bas pour les séquences de la région variable V3. Les substitutions synonymes (Ks) ou mutations silencieuses correspondent aux changements de nucléotides à l'intérieur d'un codon (ADN), qui n'entraînent pas un changement de l'acide aminé correspondant, alors que les substitutions non-synonymes (Ka) ou mutations non-silencieuses correspondent aux changements de nucléotides à l'intérieur d'un codon, qui se traduisent par un changement de l'acide aminé correspondant. Donc, plus le ratio Ks/Ka est faible et plus le taux de mutations non-silencieuses est important, indiquant que les séquences de la région concernée sont soumises à des pressions sélectives qui les obligent à muter continuellement.

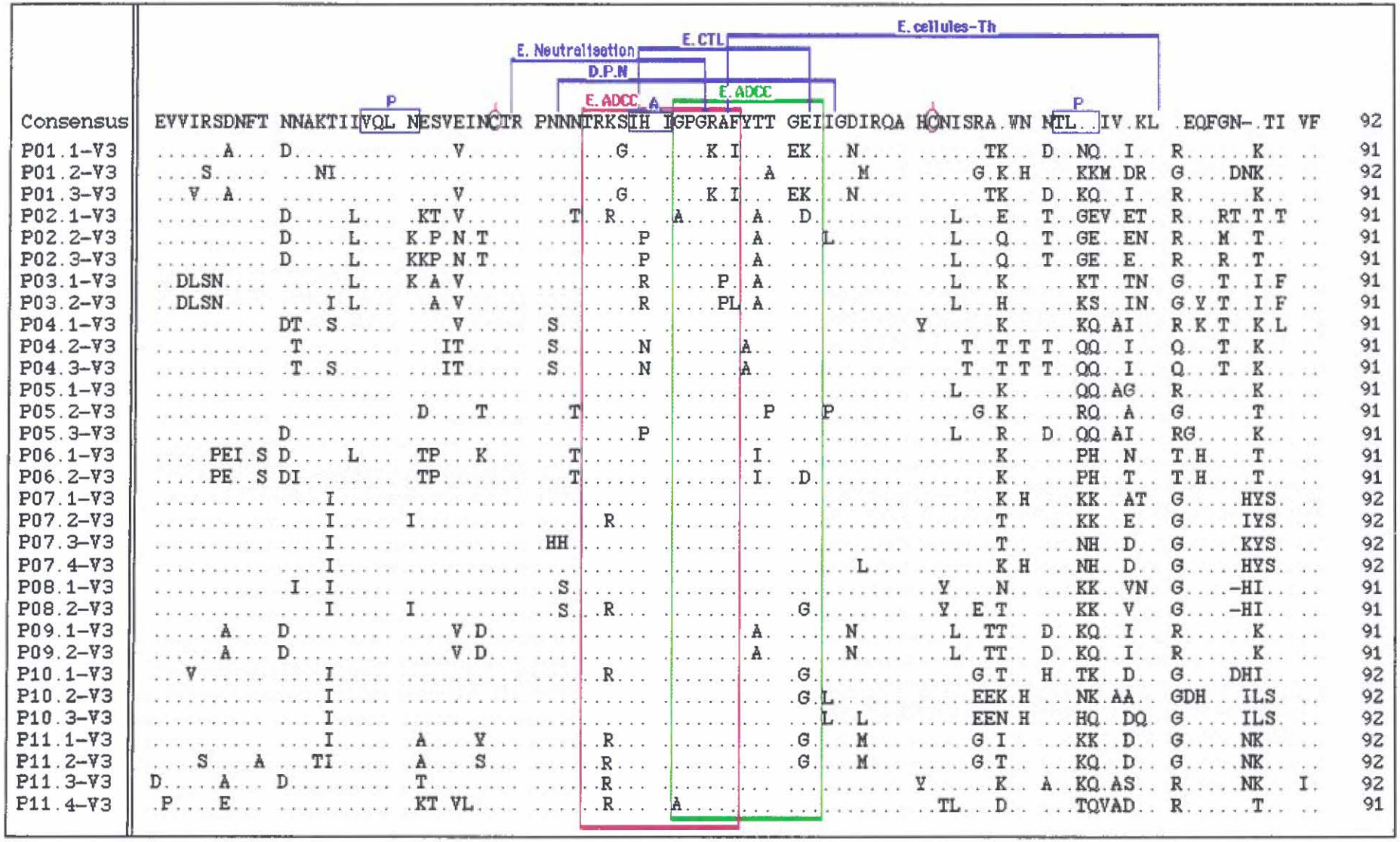
Le ratio de substitutions synonymes/substitutions non-synonymes (Ks/Ka) a été déterminé pour chaque population de "quasi-espèces" isolés chez chacun des patients, en les comparant à la séquence prédominante présente chez ce même patient (obtenue par séquençage direct). Le ratio Ks/Ka pour le séquences V3 variait de 0,9 à 1,2 peu importe le stade de l'infection, alors que le ratio Ks/Ka pour les séquences C4 et C5 n'a jamais passé en dessous de 6,4. Ces ratio indiquent que les séquences de la région V3, sous des contraintes fonctionnelles significatives, évoluent rapidement comparé aux régions C4 et C5 qui demeurent relativement bien conservées, peut-être en absence de contraintes sélectives rigoureuses. Un ratio Ks/Ka proche de 1 pour les séquences V3 indique qu'en moyenne la survie d'une mutation de remplacement est pratiquement aussi probable que la survie d'une mutation silencieuse. Ceci est assez impressionnant, en particulier si on le compare avec un ratio Ks/Ka de 5,28 déterminé pour 42 gènes eucaryotiques (Li *et al.*, 1985).

Figure 21: Diversité génétique intrapatient (région V3) durant le stade II de l'infection (séronégatifs asymptomatiques).

Alignement multiple des séquences, en acides aminés de la boucle V3 et des régions avoisinantes, de 31 clones (quasi-espèces) différents isolés à partir des PBMC de 11 patients au stade II de l'infection. La séquence consensus a été déduite à partir de la fréquence des différents résidus amino-acides à chaque position dans l'alignement. La similarité entre le consensus et les différentes séquences dans l'alignement est indiquée par des points (·). La présence de tirets (–) indique l'insertion d'un espace pour maintenir l'alignement.

L'analyse des séquences a confirmé l'absence d'un même provirus chez deux patients différents, indiquant ainsi que chacun des patients infectés au VIH-1 possède *in vivo* une population de quasi-espèces qui lui est particulière. La moyenne de la variabilité génétique intrapatient durant le stade asymptomatique (boucle V3) était de l'ordre de 6,1±3,9% (allant de 0,0% à 15,2%).

Les boîtes en rouges et en vert délimitent les séquences des épitopes ADCC cartographiés dans cette région. Les résidus (C) sont les deux cystéines impliqués dans la formation de la boucle V3 par pont disulfure. Les séquences délimitées en bleu représentent les principales régions fonctionnelles de cette portion de la gp120: domaine principal de neutralisation (DPN), épitope de neutralisation (spécifique au type), un épitope CTL et un épitope pour les cellules T-auxiliaires. P: indique les séquences impliquées dans la maturation des glycoprotéines de l'enveloppe. A: indique les séquences impliquées dans l'interaction de la gp120 au récepteur CD4.



Consensus	EVVIRSDNFT NNAKTIIVQL NESVEINCTR PNNNTRKSIH IGPGRAFYTT GEIIGDIRQA HCNISRA.WN NTL..IV.KL .EQFGN-.TI VF	92
P01.1-V3	.....A... D.....V..... .....G.. ...K.I... EK..N..... .....TK.. D..NQ..I.. R.....K.. ..	91
P01.2-V3	....S..... ...NI..... ....A ....M... .....G.K.H ...KKM.DR. G....DNK.. ..	92
P01.3-V3	...V..A... ....V..... .....G.. ...K.I... EK..N..... .....TK.. D..KQ..I.. R.....K.. ..	91
P02.1-V3	..... D....L... .KT.V..... ...T.R... .A.....A. .D..... .....L...E.. T..GEV.ET. R...RT.T.T ..	91
P02.2-V3	..... D....L... K.P.N.T... ....P ....A. ...L..... .....L...Q.. T..GE..EN. R...M..T.. ..	91
P02.3-V3	..... D....L... KKP.N.T... ....P ....A. ....L...Q.. T..GE..E.. R...R..T.. ..	91
P03.1-V3	..DLSN.... .....L... K.A.V..... ....R ....P..A. ....L...K.. ...KT..TN. G...T..I.F ..	91
P03.2-V3	..DLSN.... ....I.L... ..A.V..... ....R ....PL.A. ....L...H.. ...KS..IN. G.V.T..I.F ..	91
P04.1-V3	..... DT..S..... ....V..... .S..... .... Y.....K.. ...KQ.AI.. R.K.T..K.L ..	91
P04.2-V3	..... .T..... ...IT..... S.....N ....A. ....T..T.T T..QQ..I.. Q...T..K.. ..	91
P04.3-V3	..... .T..S..... ...IT..... S.....N ....A. ....T..T.T T..QQ..I.. Q...T..K.. ..	91
P05.1-V3	....L...K.. ...QQ.AG.. R.....K.. ..	91
P05.2-V3	....D...T..... ...T..... ....P ...P..... .....G.K.. ...RQ..A.. G.....T.. ..	91
P05.3-V3	..... D..... ....P ....L...R.. D..QQ.AI.. RG....K.. ..	91
P06.1-V3	.....PEI.S D....L... .TP..K..... ...T..... ....I. ....K.. ...PH..N.. T.H...T.. ..	91
P06.2-V3	.....PE..S DI..... .TP..... ...T..... ....I..D ....K.. ...PH..T.. T.H...T.. ..	91
P07.1-V3	....I..... ....K.H ...KK..AT. G....HYS.. ..	92
P07.2-V3	....I.....I..... ....R... ....T.. ...KK..E.. G....IYS.. ..	92
P07.3-V3	....I..... ....HH ....T.. ...NH..D.. G....KYS.. ..	92
P07.4-V3	....I..... ....L... .....K.H ...NH..D.. G....HYS.. ..	92
P08.1-V3	..... .I..I..... ....S..... ....Y....N.. ...KK..VN. G....-HI.. ..	91
P08.2-V3	....I.....I..... .....S..R... ....G..... .....Y..E.T.. ...KK..V.. G....-HI.. ..	91
P09.1-V3	.....A... D..... .....V.D..... ....A. ....N..... .....L..TT.. D..KQ..I.. R.....K.. ..	91
P09.2-V3	.....A... D..... .....V.D..... ....A. ....N..... .....L..TT.. D..KQ..I.. R.....K.. ..	91
P10.1-V3	...V..... ....I..... ....R... ....G..... .....G.T.. H..TK..D.. G....DHI.. ..	92
P10.2-V3	....I..... ....G.L..... .....EEK.H ...NK.AA.. GDH...ILS.. ..	92
P10.3-V3	....I..... ....L..L..... .....EEN.H ...HQ..DQ. G.....ILS.. ..	92
P11.1-V3	....I.....A...Y..... ....R... ....G...M..... .....G.I.. ...KK..D.. G.....NK.. ..	92
P11.2-V3	....S...A ...TI.....A...S..... ....R... ....G...M..... .....G.T.. ...KQ..D.. G.....NK.. ..	92
P11.3-V3	D.....A... D.....T..... ....R... .... Y.....K.. A..KQ.AS.. R.....NK.. I.	92
P11.4-V3	.P....E... ....KT.VL..... ....R... .A..... ....TL...D.. ...TQVAD.. R.....T.. ..	91

Figure 22: Diversité génétique intrapatient (région V3) durant le stade III de l'infection.

Alignement des séquences, en acides aminés de la boucle V3 et des régions avoisinantes, de 34 clones différents isolés à partir des PBMC de 10 patients au stade III de l'infection au VIH-1. Les légendes sont identiques à celles de la **figure 21.**

Le consensus de 92 acides aminés déduit à partir des séquences des quasi-espèces isolées chez les patients au stade II de l'infection est de 93 acides aminés au stade III de l'infection. Ceci est dû au besoin d'insérer des espaces pour maintenir l'alignement suite à l'apparition de quasi-éspèces de tailles différentes. La moyenne de la variabilité génétique intrapatient (boucle V3) durant le stade III était de l'ordre de 6,4±1,8% (allant de 2,9% à 9,0%).

Les légendes des régions fonctionnelles présentes dans cette portion de la gp120 sont identiques à celles de la **figure 21.**

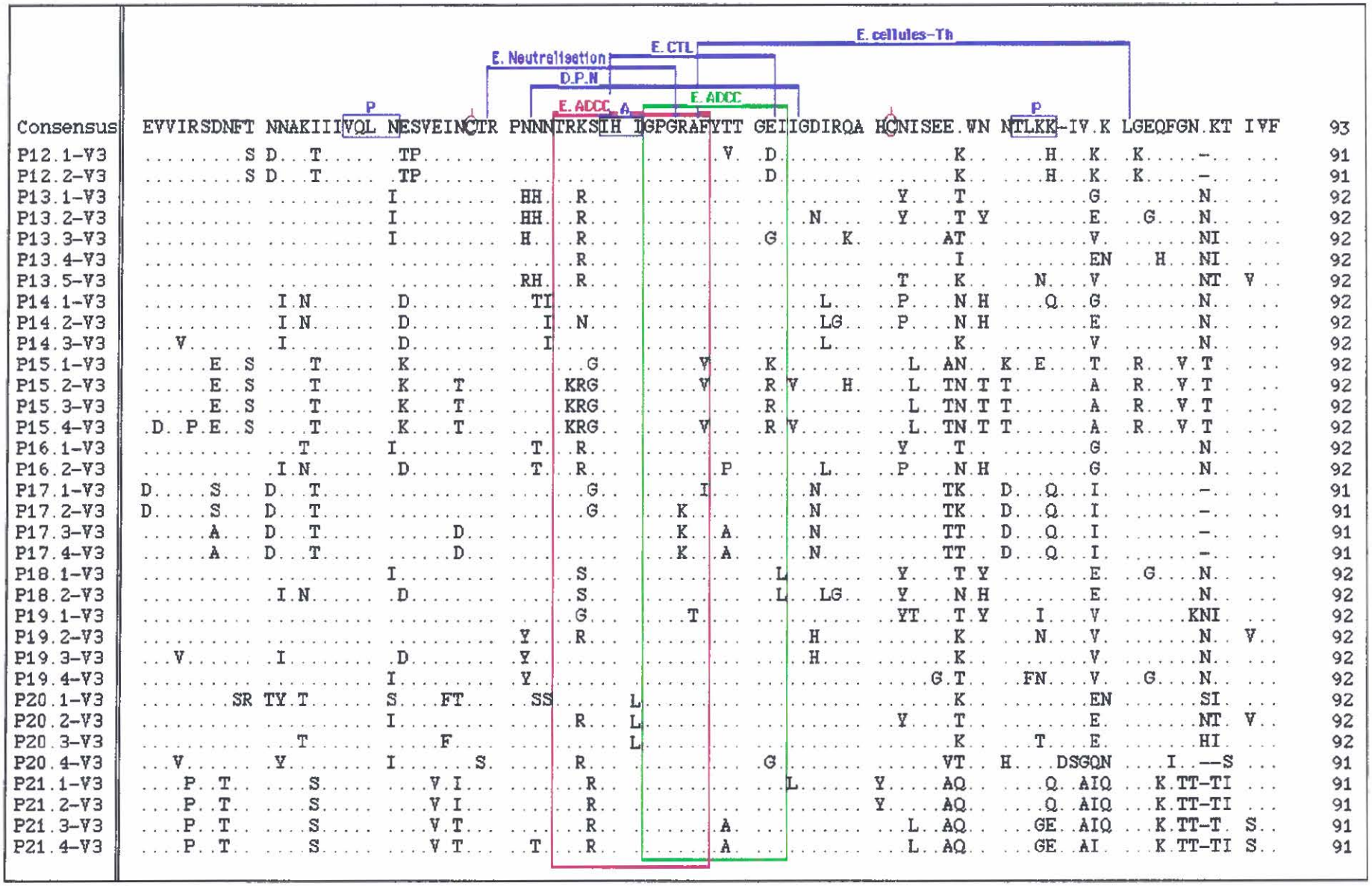

E. cellules-Th
E. CTL
E. Neutralisation
D.P.N
E. ADCC
E. ADCC
P
P
Consensus EVVIRSDNFT NNAKIIIVQL NESVEINCTR PNNNTRKSIH IGPGRAFYTT GEIIGDIRQA HCNISEE.WN NTLKK-IV.K LGEQFGN.KT IVF 93
P12.1-V3 91
P12.2-V3 91
P13.1-V3 92
P13.2-V3 92
P13.3-V3 92
P13.4-V3 92
P13.5-V3 92
P14.1-V3 92
P14.2-V3 92
P14.3-V3 92
P15.1-V3 92
P15.2-V3 92
P15.3-V3 92
P15.4-V3 92
P16.1-V3 92
P16.2-V3 92
P17.1-V3 91
P17.2-V3 91
P17.3-V3 91
P17.4-V3 91
P18.1-V3 92
P18.2-V3 92
P19.1-V3 92
P19.2-V3 92
P19.3-V3 92
P19.4-V3 92
P20.1-V3 92
P20.2-V3 92
P20.3-V3 92
P20.4-V3 91
P21.1-V3 91
P21.2-V3 91
P21.3-V3 91
P21.4-V3 91

Figure 23: Diversité génétique intrapatient (région V3) durant le stade IV de l'infection.

Alignement des séquences, en acides aminés de la boucle V3 et des régions avoisinantes, de 49 clones différents isolés à partir des PBMC de 12 patients au stade IV de l'infection au VIH-1. Les légendes sont identiques à celles de la **figure 21.**

La moyenne de la variabilité génétique intrapatient (boucle V3) durant le stade IV était de l'ordre de 8,8%±4,7% (allant de 2,9% à 19,0%).

Les légendes des régions fonctionnelles présentes dans cette portion de la gp120 sont identiques à celles de la **figure 21.**

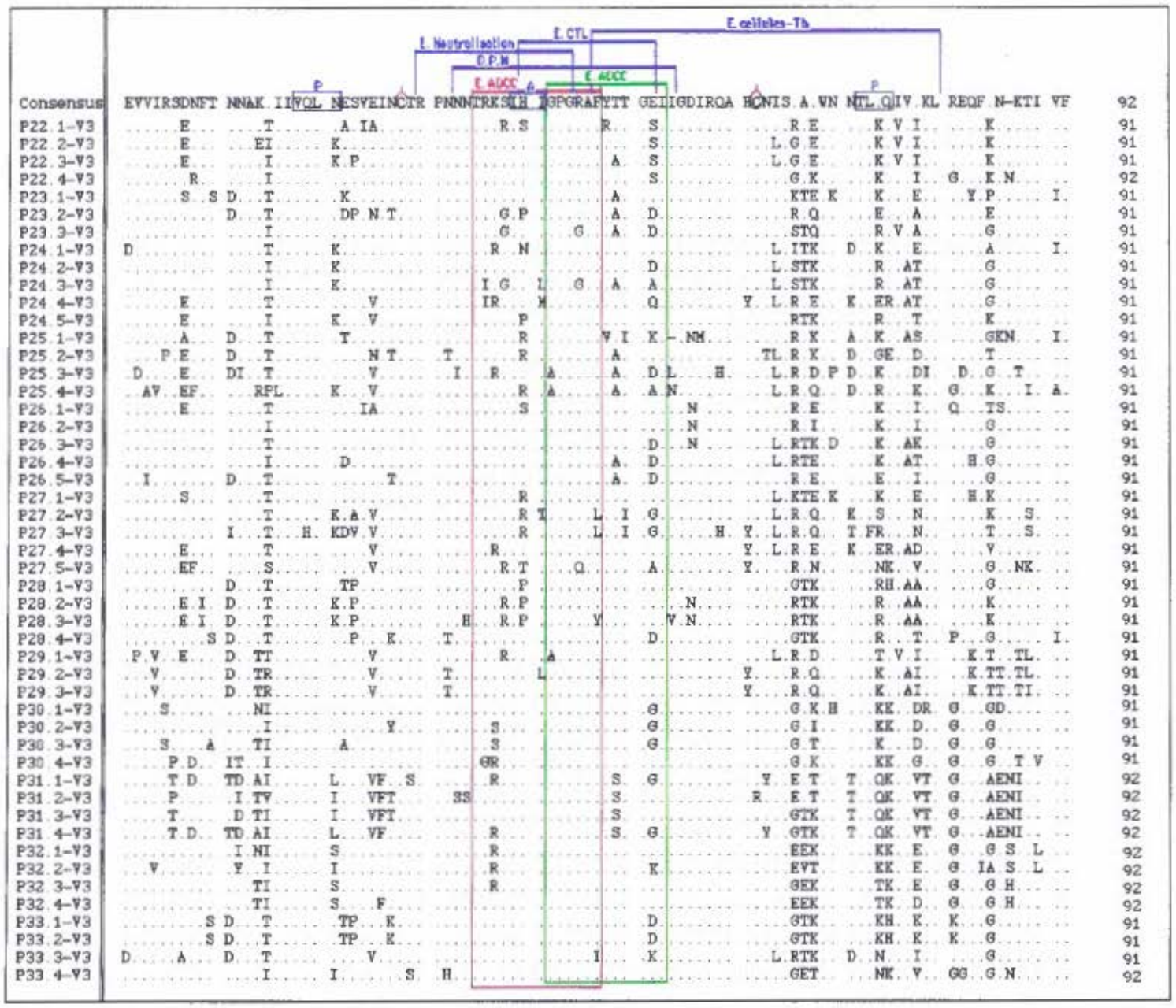

E. Neutralisation
E. CTL
E. cellules-Th
D.P.N.
E. ADCC
E. ADCC
P
P
Consensus
92

Figure 24: Diversité génétique intrapatient (région C4) durant le stade II de l'infection (séronégatifs asymptomatiques).

Alignement des séquences, en acides aminés de la région C4 (gp120/41), de 28 différentes quasi-éspèces isolées chez les 11 patients au stade II de l'infection. La séquence consensus a été déduite à partir de la fréquence des différents résidus amino-acides à chaque position dans l'alignement. La similarité entre le consensus et les différentes séquences dans l'alignement est indiquée par des points (·). La présence de tirets (–) indique l'insertion d'un espace pour maintenir l'alignement.

L'analyse de séquences a montré une variabilité intrapatient (épitope ADCC et régions avoisinantes, un fragment d'environ) de l'ordre de 1,8±1,7% (allant de 0,0% à 5,0%)

La boîte en rouge délimite la séquence de l'épitope ADCC cartographié dans cette région. Les lignes en bleu délimitent les différentes régions fonctionnelles telles que l'épitope de neutralisation et le domaine de fusion. F: indique les résidus amino-acides critiques pour le phénomène de fusion virus-cellule. A: indique les résidus impliqués dans l'association de la gp120 au récepteur CD4. Le site de clivage du précurseur gp160 en gp120/41 et les séquences de l'épitope ADCC demeurent relativement bien conservés parmi les quasi-espèces d'un même patient ou de patients différents.

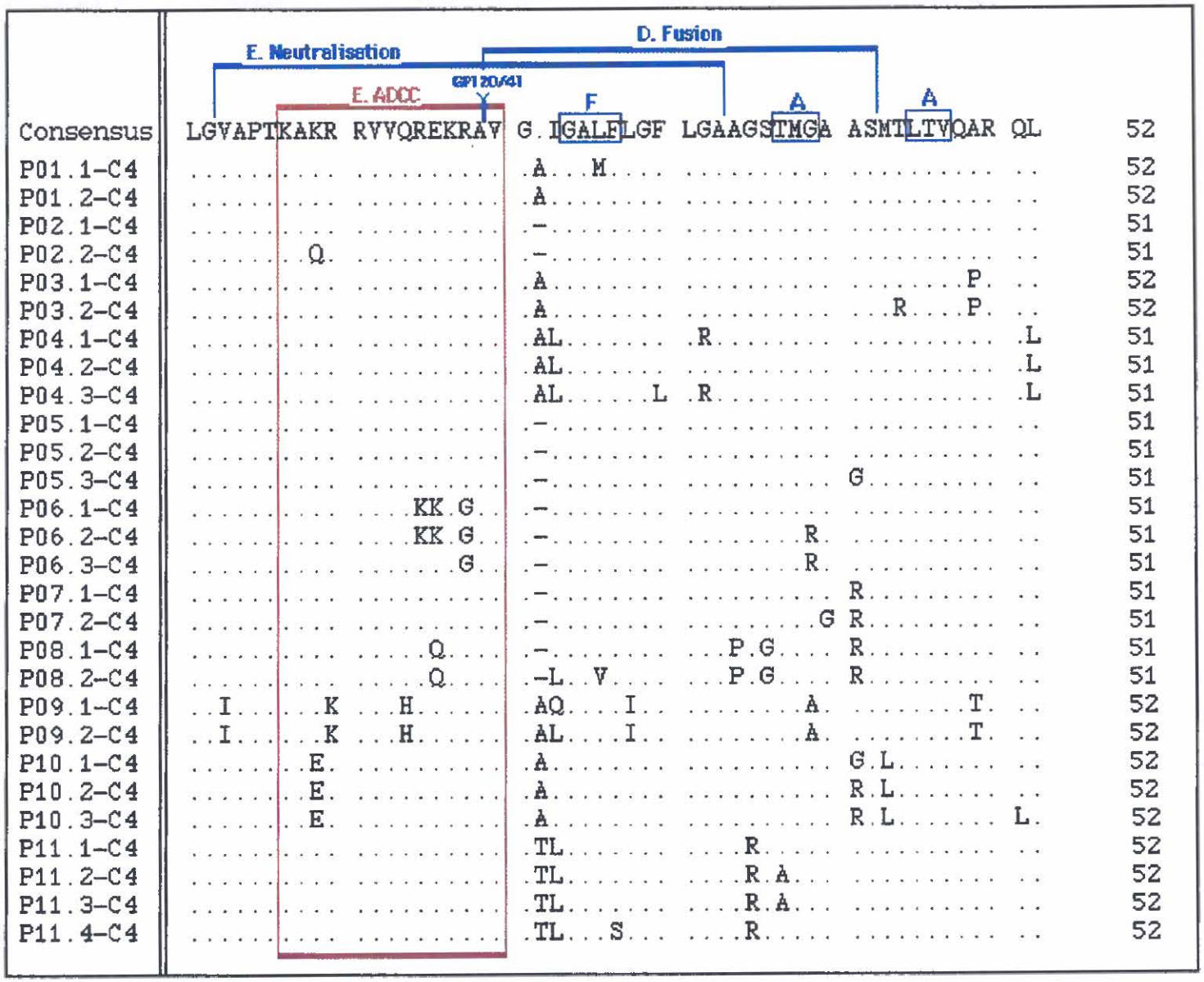

D. Fusion
E. Neutralisation
E. ADCC
gp120/41
F
A
A
Consensus LGVAPTKAKR RVVQREKRAV G IGALFLGF LGAAGSTMGA ASMTLTVQAR QL 52
P01.1-C4 . . . . . A . . M 52
P01.2-C4 . . . . . A 52
P02.1-C4 . . . . . - 51
P02.2-C4 . . . . . Q . . . . . - 51
P03.1-C4 . . . . . A . . . . P . . 52
P03.2-C4 . . . . . A . . . . R . . . . P . . 52
P04.1-C4 . . . . . AL . . . . . R . . . . L 51
P04.2-C4 . . . . . AL . . . . L 51
P04.3-C4 . . . . . AL . . . . . L . R . . . . L 51
P05.1-C4 . . . . . - 51
P05.2-C4 . . . . . - 51
P05.3-C4 . . . . . - . . . . G 51
P06.1-C4 . . . . . KK . G . . - 51
P06.2-C4 . . . . . KK . G . . - . . . . R 51
P06.3-C4 . . . . . G . . - . . . . R 51
P07.1-C4 . . . . . - . . . . R 51
P07.2-C4 . . . . . - . . . . G R 51
P08.1-C4 . . . . . Q . . . . - . . . . . P . G . . . . R 51
P08.2-C4 . . . . . Q . . . . -L . V . . . . P . G . . . . R 51
P09.1-C4 . I . . . . K . . H . . . . . AQ . . . I . . . . A . . . . T . . 52
P09.2-C4 . I . . . . K . . H . . . . . AL . . . I . . . . A . . . . T . . 52
P10.1-C4 . . . . . E . . . . . A . . . . G . L 52
P10.2-C4 . . . . . E . . . . . A . . . . R . L 52
P10.3-C4 . . . . . E . . . . . A . . . . R . L . . . . . L . 52
P11.1-C4 . . . . . TL . . . . . R 52
P11.2-C4 . . . . . TL . . . . . R . A 52
P11.3-C4 . . . . . TL . . . . . R . A 52
P11.4-C4 . . . . . TL . . . S . . . . R 52

Figure 25: Diversité génétique intrapatient (région C4) durant le stade III de l'infection.

Alignement des séquences, en acides aminés de la région C4 (gp120/41), de 27 différentes quasi-éspèces isolées chez les 10 patients au stade III de l'infection. La séquence consensus a été déduite à partir de la fréquence des différents résidus amino-acides à chaque position dans l'alignement. La similarité entre le consensus et les différentes séquences dans l'alignement est indiquée par des points (·). La présence de tirets (–) indique l'insertion d'un espace pour maintenir l'alignement.

L'analyse de séquences a montré une variabilité intrapatient (épitope ADCC et régions avoisinantes, un fragment d'environ 35 a.a) de l'ordre de 2,9±2,0% (allant de 0,0% à 5,0%)

Les légendes des différentes régions fonctionnelles présentes dans cette région sont identiques à celle de la **figure 24.**

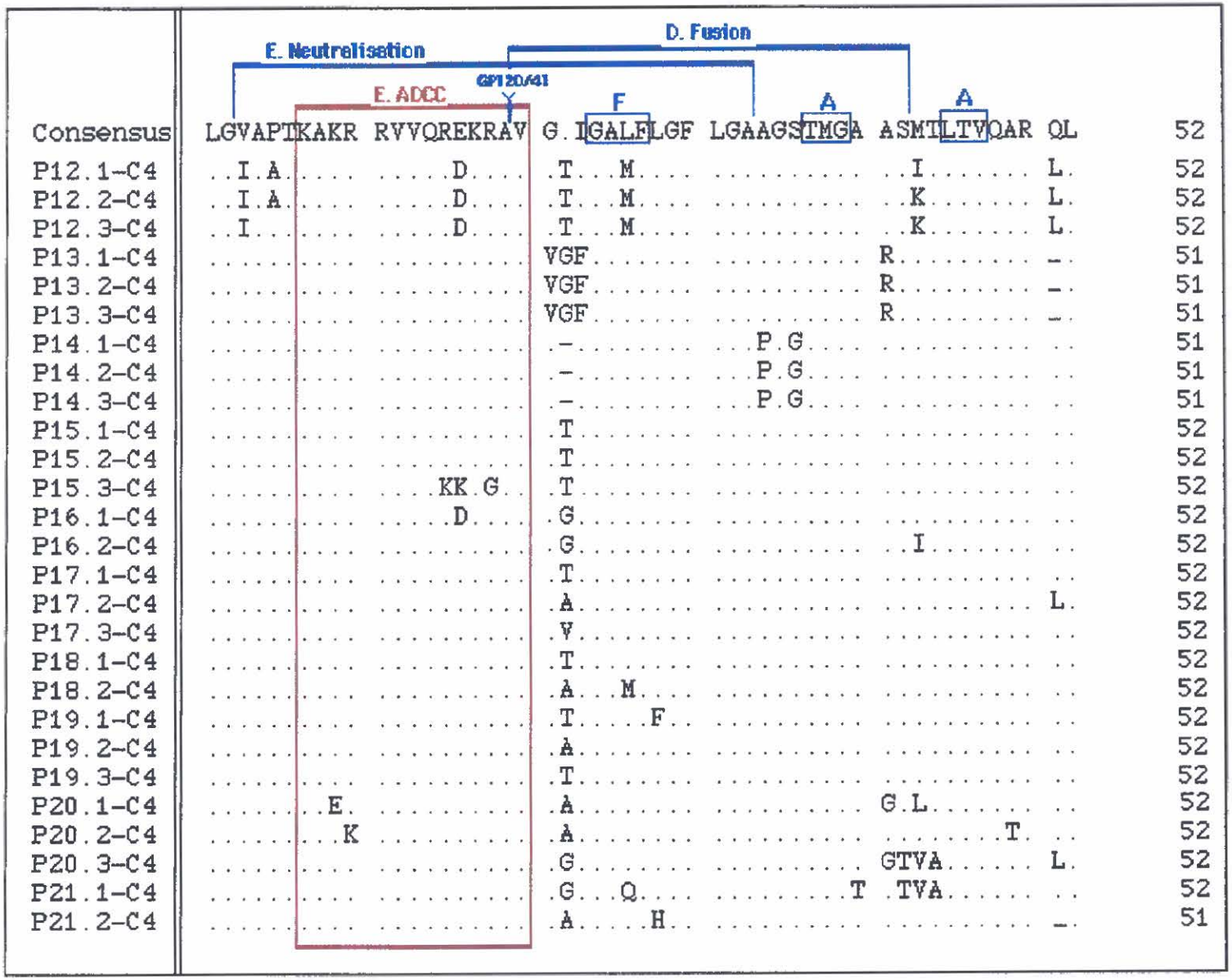

E. Neutralisation
D. Fusion
E. ADCC
GP120/41
F
A
A
Consensus LGVAPIKAKR RVVQREKRAV G.IGALFLGF LGAAGSTMGA ASMTLTVQAR QL 52
P12.1-C4 ..I.A..... .....D.... .T...M..... ....I..... L. 52
P12.2-C4 ..I.A..... .....D.... .T...M..... ....K..... L. 52
P12.3-C4 ..I..... .....D.... .T...M..... ....K..... L. 52
P13.1-C4 .... VGF..... .... R..... -. 51
P13.2-C4 .... VGF..... .... R..... -. 51
P13.3-C4 .... VGF..... .... R..... -. 51
P14.1-C4 ....-..... ...P.G.... 51
P14.2-C4 ....-..... ...P.G.... 51
P14.3-C4 ....-..... ...P.G.... 51
P15.1-C4 .... .T..... 52
P15.2-C4 .... .T..... 52
P15.3-C4 ....KK.G.. .T..... 52
P16.1-C4 ....D.... .G..... 52
P16.2-C4 .... .G..... ....I..... .. 52
P17.1-C4 .... .T..... 52
P17.2-C4 .... .A..... .... L. 52
P17.3-C4 .... .V..... 52
P18.1-C4 .... .T..... 52
P18.2-C4 .... .A...M.... 52
P19.1-C4 .... .T....F... 52
P19.2-C4 .... .A..... 52
P19.3-C4 .... .T..... 52
P20.1-C4 .....E.... ..... .A..... .... G.L..... .. 52
P20.2-C4 .....K.... ..... .A..... ....T.... .. 52
P20.3-C4 .... .G..... .... GTVA..... L. 52
P21.1-C4 .... .G...Q..... .....T .TVA..... .. 52
P21.2-C4 .... .A.....H.. .... -. 51

Figure 26: Diversité génétique intrapatient (région C4) durant le stade IV de l'infection.

Alignement des séquences, en acides aminés de la région C4 (gp120/41), de 33 différentes quasi-éspèces isolées chez les 12 patients au stade IV de l'infection. La séquence consensus a été déduite à partir de la fréquence des différents résidus amino-acides à chaque position dans l'alignement. La similarité entre le consensus et les différentes séquences dans l'alignement est indiquée par des points (·). La présence de tirets (–) indique l'insertion d'un espace pour maintenir l'alignement.

L'analyse des séquences a montré une variabilité intrapatient (épitope ADCC et régions avoisinantes, un fragment d'environ 35 a.a) de l'ordre de 4,0±1,8% (allant de 1,6% à 7,5%).

Les légendes des différentes régions fonctionnelles présentes dans cette région sont identiques à celle de la **figure 24.**

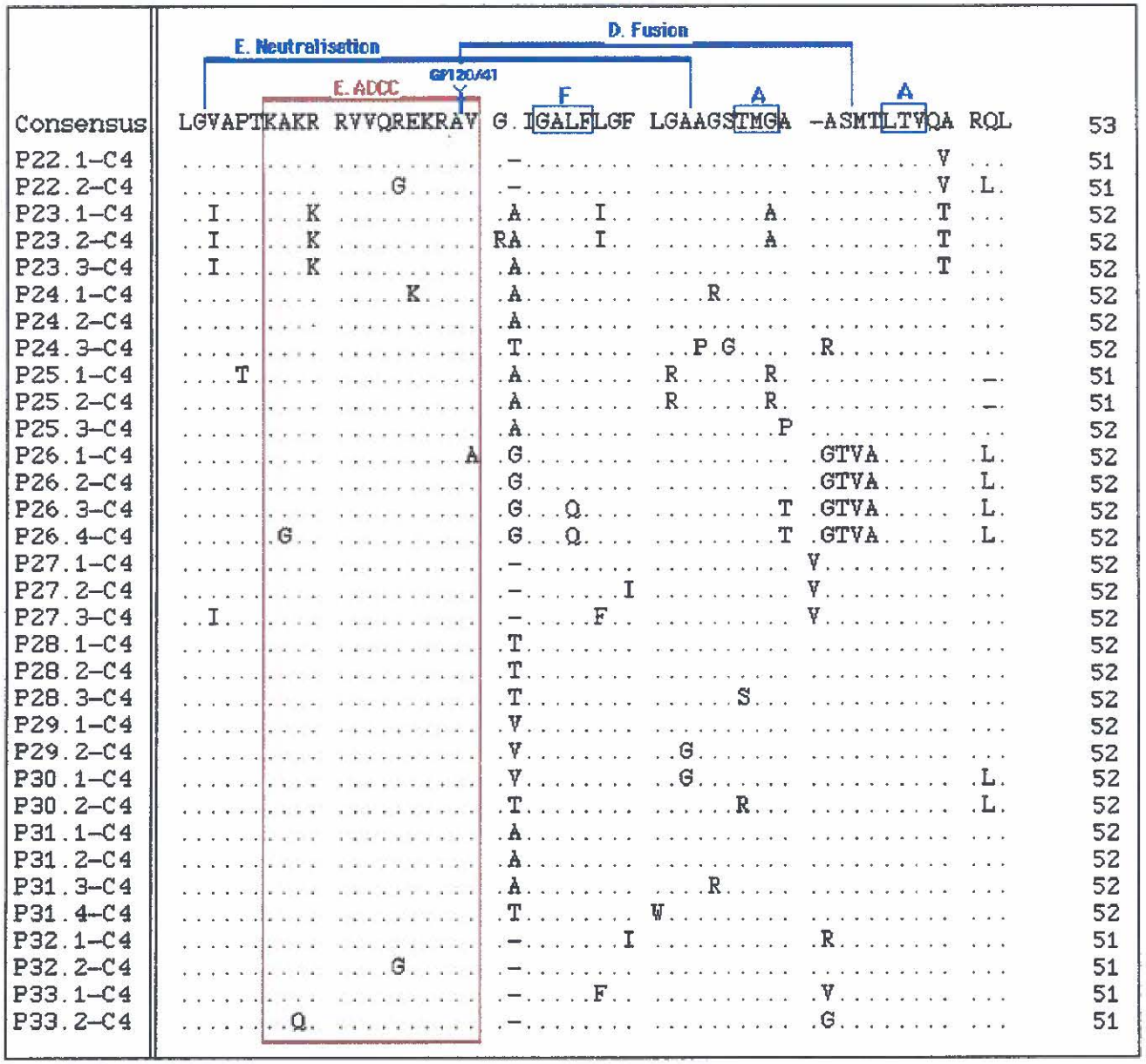

E. Neutralisation
D. Fusion
E. ADCC
GP120/41
F
A
A
Consensus LGVAPTKAKR RVVQREKRAV G.IGALFLGF LGAAGSTMGA -ASMTLTVQA RQL 53
P22.1-C4 51
P22.2-C4 51
P23.1-C4 52
P23.2-C4 52
P23.3-C4 52
P24.1-C4 52
P24.2-C4 52
P24.3-C4 52
P25.1-C4 51
P25.2-C4 51
P25.3-C4 52
P26.1-C4 52
P26.2-C4 52
P26.3-C4 52
P26.4-C4 52
P27.1-C4 52
P27.2-C4 52
P27.3-C4 52
P28.1-C4 52
P28.2-C4 52
P28.3-C4 52
P29.1-C4 52
P29.2-C4 52
P30.1-C4 52
P30.2-C4 52
P31.1-C4 52
P31.2-C4 52
P31.3-C4 52
P31.4-C4 52
P32.1-C4 51
P32.2-C4 51
P33.1-C4 51
P33.2-C4 51

Figure 27: Diversité génétique intrapatient (région C5) durant le stade II de l'infection (séronégatifs asymptomatiques).

Alignement multiple des séquences, en acides aminés de la région C5 (gp41), de 25 différentes quasi-éspèces isolées chez les 11 patients au stade II de l'infection. La séquence consensus a été déduite à partir de la fréquence des différents résidus amino-acides à chaque position dans l'alignement. La similarité entre le consensus et les différentes séquences dans l'alignement est indiquée par des points (•).

L'analyse des séquences a montré une variabilité intrapatient (épitope ADCC et régions avoisinantes, un fragment de 35 a.a) de l'ordre de 2,0±1,9% (allant de 0,0% à 5,0%)

La boîte en rouge délimite la séquence de l'épitope ADCC cartographié au niveau de la gp41. Cette séquence renferme deux résidus cystéines (encerclés en rouge) pouvant former une boucle par pont disulfure qui pourrait être le site de reconnaissance des anticorps dirigeant l'ADCC. La substitution du second résidu cystéine par un résidu tryptophane (W) dans de nombreuses quasi-espèces pourrait détruire la structure en boucle et par conséquent le site de reconnaissance des anticorps ADCC.

Les séquences de l'épitope ADCC sont relativement bien conservées par rapport à celles de l'épitope de neutralisation délimiter en bleu, parmi les quasi-espèces d'un même patient ou de patients différents.

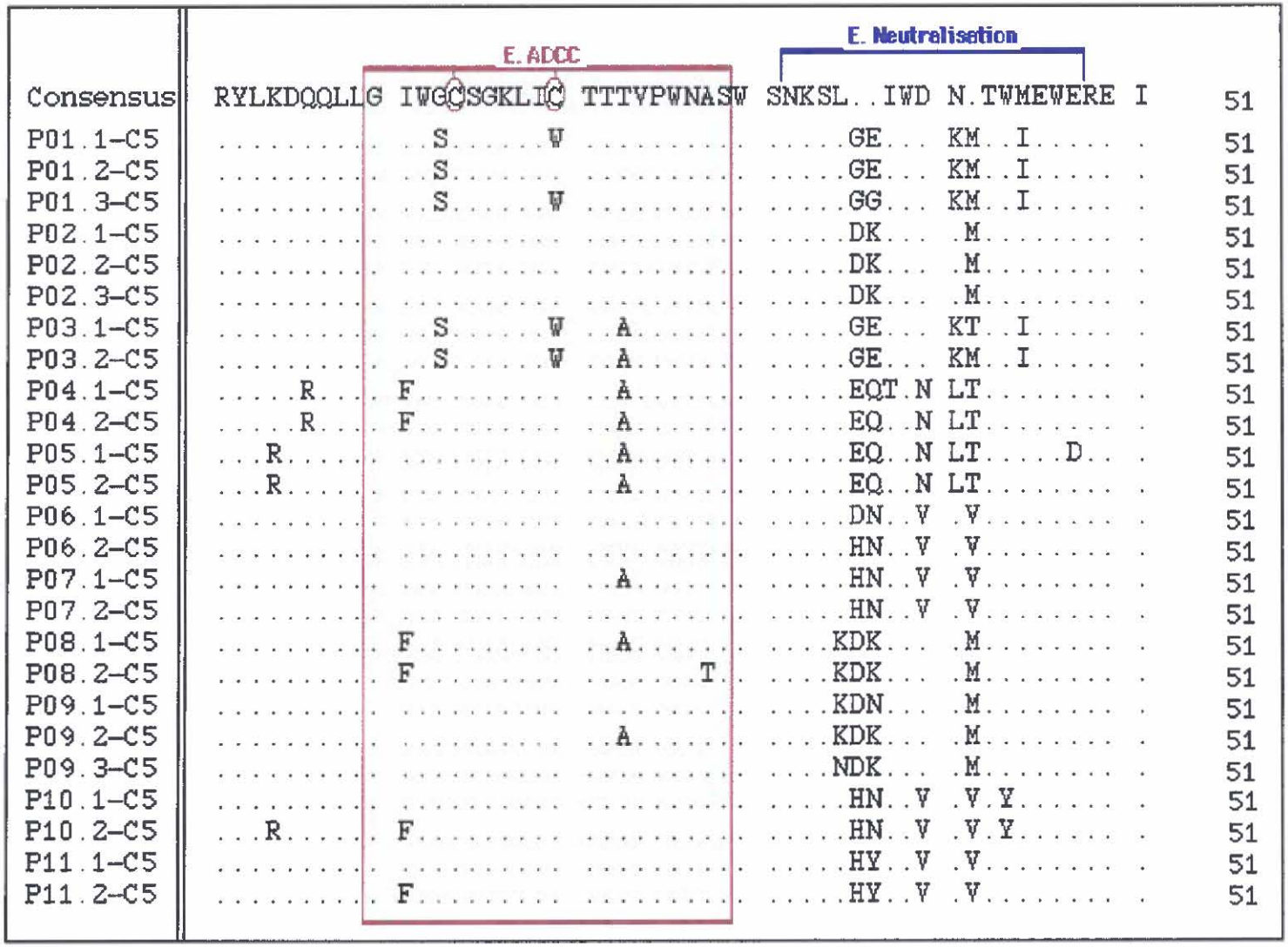

E. ADCC
E. Neutralisation
Consensus RYLKDQQLLG IWGCSGKLIC TTTVPWNASW SNKSL..IWD N.TWMEWERE I 51
P01.1-C5 .....S.....W.....GE...KM..I.....51
P01.2-C5 .....S.....GE...KM..I.....51
P01.3-C5 .....S.....W.....GG...KM..I.....51
P02.1-C5 .....DK....M.....51
P02.2-C5 .....DK....M.....51
P02.3-C5 .....DK....M.....51
P03.1-C5 .....S.....W..A.....GE...KT..I.....51
P03.2-C5 .....S.....W..A.....GE...KM..I.....51
P04.1-C5 .....R...F.....A.....EQT.N LT.....51
P04.2-C5 .....R...F.....A.....EQ..N LT.....51
P05.1-C5 ...R.....A.....EQ..N LT.....D..51
P05.2-C5 ...R.....A.....EQ..N LT.....51
P06.1-C5 .....DN..V .V.....51
P06.2-C5 .....HN..V .V.....51
P07.1-C5 .....A.....HN..V .V.....51
P07.2-C5 .....HN..V .V.....51
P08.1-C5 .....F.....A.....KDK....M.....51
P08.2-C5 .....F.....T.....KDK....M.....51
P09.1-C5 .....KDN....M.....51
P09.2-C5 .....A.....KDK....M.....51
P09.3-C5 .....NDK....M.....51
P10.1-C5 .....HN..V .V.Y.....51
P10.2-C5 ...R.....F.....HN..V .V.Y.....51
P11.1-C5 .....HY..V .V.....51
P11.2-C5 .....F.....HY..V .V.....51

Figure 28: Diversité génétique intrapatient (région C5) durant le stade III de l'infection.

Alignement multiple des séquences, en acides aminés de la région C5 (gp41), de 27 différentes quasi-éspèces isolées chez les 10 patients au stade III de l'infection.

L'analyse des séquences a montré une variabilité intrapatient (épitope ADCC et régions avoisinantes, un fragment de 35 a.a) de l'ordre de 3,3±2,3% (allant de 0,0% à 7,5%).

Les légendes des régions fonctionnelles présentes dans cette portion de la gp41 sont identiques à celles de la **figure 27.**

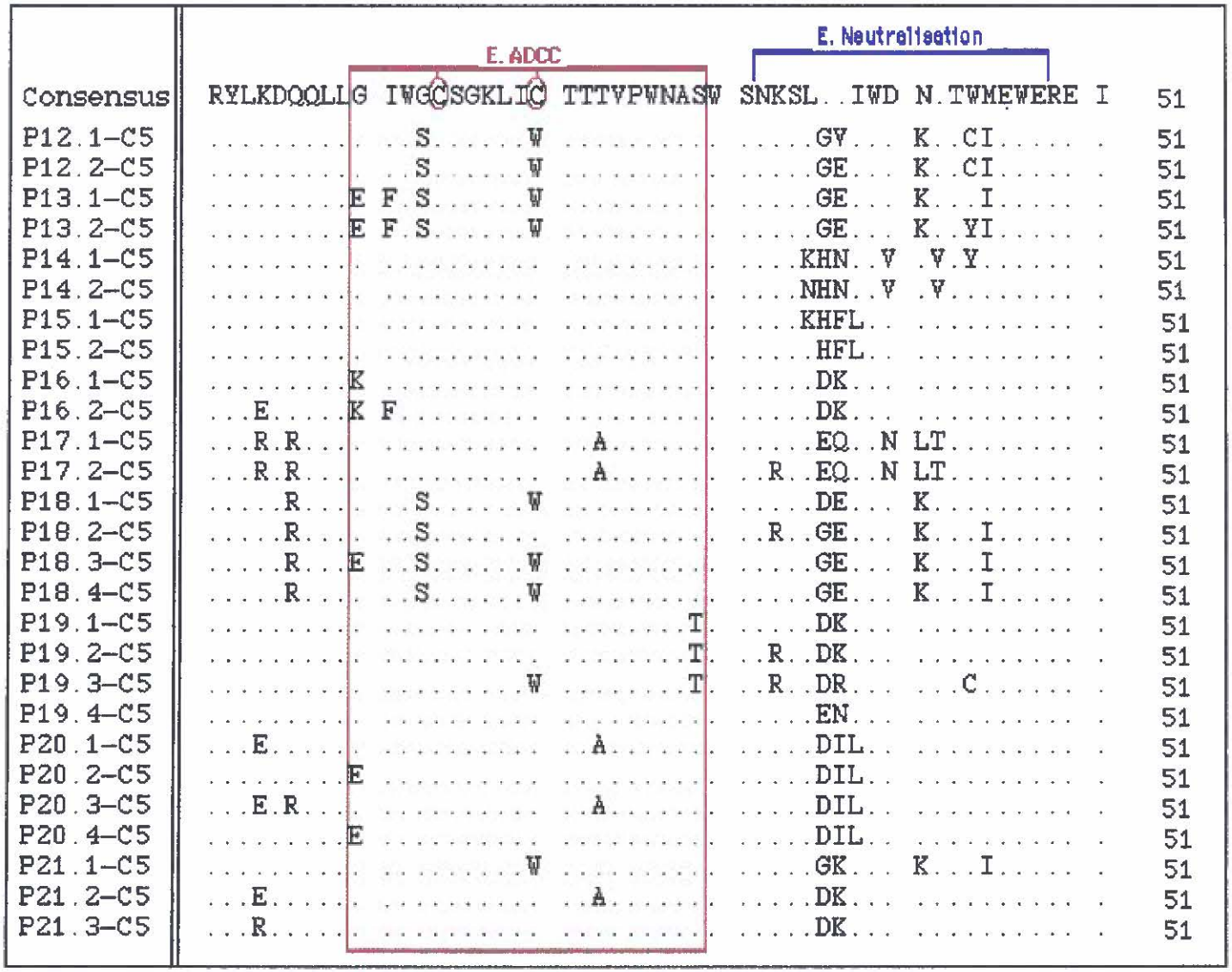
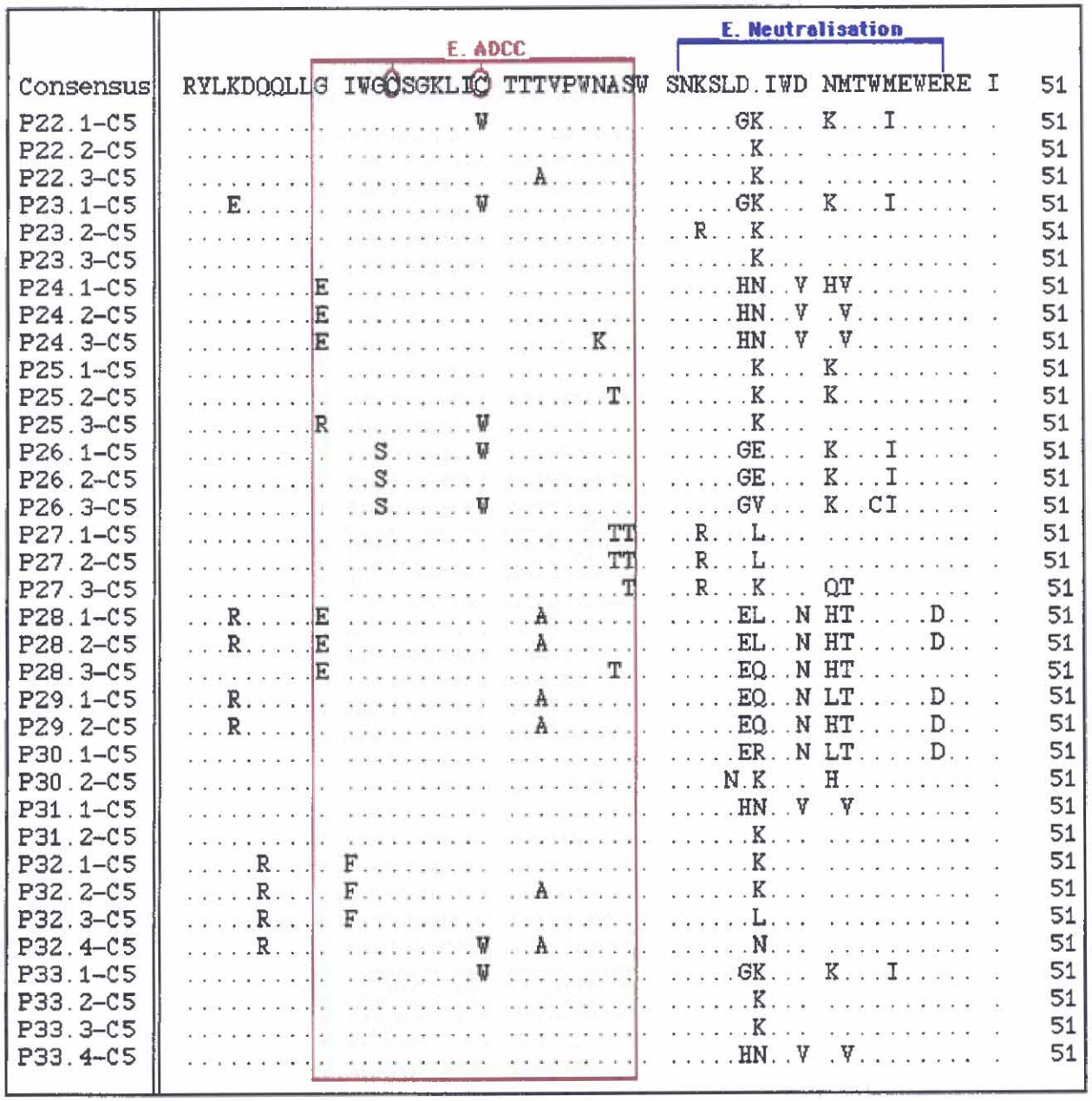

E. ADCC
E. Neutralisation
Consensus RYLKDQQLLG IWGCSGKLIC TTTVPWNASW SNKSL..IWD N.TWMEWERE I 51
P12.1-C5 .....S.....W.....GV...K..CI.....51
P12.2-C5 .....S.....W.....GE...K..CI.....51
P13.1-C5 .....EF.S.....W.....GE...K...I.....51
P13.2-C5 .....EF.S.....W.....GE...K..YI.....51
P14.1-C5 .....KHN..V..V.Y.....51
P14.2-C5 .....NHN..V..V.....51
P15.1-C5 .....KHFL.....51
P15.2-C5 .....HFL.....51
P16.1-C5 .....K.....DK.....51
P16.2-C5 ...E....KF.....DK.....51
P17.1-C5 ...R.R.....A.....EQ..N LT.....51
P17.2-C5 ...R.R.....A.....R..EQ..N LT.....51
P18.1-C5 .....R.....S.....W.....DE...K.....51
P18.2-C5 .....R.....S.....R..GE...K...I.....51
P18.3-C5 .....R...E..S.....W.....GE...K...I.....51
P18.4-C5 .....R.....S.....W.....GE...K...I.....51
P19.1-C5 .....T.....DK.....51
P19.2-C5 .....T..R..DK.....51
P19.3-C5 .....W.....T..R..DR.....C.....51
P19.4-C5 .....EN.....51
P20.1-C5 ...E.....A.....DIL.....51
P20.2-C5 .....E.....DIL.....51
P20.3-C5 ...E.R.....A.....DIL.....51
P20.4-C5 .....E.....DIL.....51
P21.1-C5 .....W.....GK...K...I.....51
P21.2-C5 ...E.....A.....DK.....51
P21.3-C5 ...R.....DK.....51

Figure 29: Diversité génétique intrapatient (région C5) durant le stade IV de l'infection.

Alignement multiple des séquences en acides aminés de la région C5 (gp41) de 35 différentes quasi-éspèces isolées chez les 12 patients au stade IV de l'infection.

L'analyse des séquences a montré une variabilité intrapatient (épitope ADCC et régions avoisinantes, un fragment de 35 a.a) de l'ordre de 2,7±1,4% (allant de 0,0% à 5,0%).

Les légendes des régions fonctionnelles présentes dans cette portion de la gp41 sont identiques à celles de la **figure 27.**


E. ADCC
E. Neutralisation
Consensus RYLKDQQLLG IWGCSGKLIC TTTVPWNASW SNKSLD.IWD NMTWMEWERE I 51
P22.1-C5 W GK K I 51
P22.2-C5 K 51
P22.3-C5 A K 51
P23.1-C5 E W GK K I 51
P23.2-C5 R K 51
P23.3-C5 K 51
P24.1-C5 E HN V HV 51
P24.2-C5 E HN V V 51
P24.3-C5 E K HN V V 51
P25.1-C5 K K 51
P25.2-C5 T K K 51
P25.3-C5 R W K 51
P26.1-C5 S W GE K I 51
P26.2-C5 S GE K I 51
P26.3-C5 S W GV K CI 51
P27.1-C5 TT R L 51
P27.2-C5 TT R L 51
P27.3-C5 T R K QT 51
P28.1-C5 R E A EL N HT D 51
P28.2-C5 R E A EL N HT D 51
P28.3-C5 E T EQ N HT 51
P29.1-C5 R A EQ N LT D 51
P29.2-C5 R A EQ N HT D 51
P30.1-C5 ER N LT D 51
P30.2-C5 N.K H 51
P31.1-C5 HN V V 51
P31.2-C5 K 51
P32.1-C5 R F K 51
P32.2-C5 R F A K 51
P32.3-C5 R F L 51
P32.4-C5 R W A N 51
P33.1-C5 W GK K I 51
P33.2-C5 K 51
P33.3-C5 K 51
P33.4-C5 HN V V 51

4-4 Relation entre le taux de variabilité des "quasi-espèces" et la réponse ADCC

Les résultats présentés dans le tableau 5, montrent les taux de variabilité intrapatients et interpatients des séquences des trois régions de l'enveloppe (des fragments d'environ 35 a.a renfermant les épitopes ADCC), ainsi que les niveaux d'activité ADCC à différents stades de l'infection. Ces taux de variabilité des séquences virales sont très similaires, et ce indépendamment du stade de l'infection, et ne semblent pas montrer une relation quelconque avec l'état du système immunitaire (baisse du nombre de cellules CD4 et de l'activité ADCC durant les stades III et IV de l'infection). En effet, si la moyenne des taux de variabilité des séquences (des épitopes ADCC) des "quasi-espèces" présentes chez les individus de cette cohorte est demeurée similaire à différents stades de l'infection (tableau 5), les moyennes de l'activité ADCC et du compte des cellules CD4 ont chuté dramatiquement pour passer de 25,7±11,5 (ADCC) et 799±267 (CD4) au stade II de l'infection à 10,3±8,9 et 515±236 au stade III et à 6,4±8,1 et 37,25±44 au stade IV (tableau 5). Ces résultats soulignent l'un des points les plus intéressants de cette recherche, qui tend a démontrer que le niveau de la diversité génétique virale (séquences des épitopes ADCC) ne semble pas être la cause directe de la chute de l'activité ADCC ni celle du nombre de cellules CD4. En fait, le système immunitaire, avec la réponse ADCC en tête, intacte et effective semble s'accommoder de la présence de virus divergents durant le stade asymptomatique.

L'énoncé selon lequel la diversité génétique virale n'est pas à l'origine du déclin de l'activité ADCC, a été en partie supporté par les résultats de la variabilité génétique des séquences C4 et C5 (tableau 5). En effet, les régions C4 et C5, qui renferment deux cibles potentielles pour les anticorps ADCC, sont demeurées relativement bien conservées durant tous les stades de l'infection, alors que l'activité ADCC a chuté dramatiquement. La variabilité génétique limitée des région C4 et C5 a également suggéré que les déterminants antigéniques majeurs pour l'activité ADCC pourraient se retrouver essentiellement au

niveau de la boucle V3, et par conséquent, les mutations dirigées par cette région seraient au commande du "devenir" de la réponse ADCC.

Tableau 5: Variabilité génétique intrapatient et interpatients des séquences des épitopes ADCC et des régions avoisinantes (environ 35 a.a) au niveau des régions V3, C4 et C5 du gène *env* du VIH-1.

Cette figure montre, chez chacun des patients de notre cohorte, le niveau de variabilité génétique provirale intrapatient et interpatients, en rapport avec le compte CD4 et le niveau d'activité ADCC.

Les résultats en rouge, correspondent aux patients dont la nature des séquences de leur quasi-espèces (certaines ou en totalité), prédisaient un phénotype inducteur de syncitia (SI). Le phénotype SI se retrouve principalement durant le stade IV de l'infection.

Les valeurs en bleu correspondent aux moyennes du nombre des cellules CD4, de l'activité ADCC et de la variabilité génétique intrapatient de l'ensemble des patients dans un même stade de l'infection.

Patient	Nbre CD4 (mm^3)	ADCC ± D.S.	Variabilité intrapatient			Variabilité interpatients		
			V3	C4	C5 (%)	V3	C4	C5 (%)
1	1010	44.3 ± 2.8	15,2	2,5	3,3	12,5	5,7	4,0
2	980	28.6 ± 2.0	9,5	2,5	0,0	11,1	5,2	3,4
3	430	38.1 ± 2.1	2,9	0,0	0,0	15,7	6,0	9,4
4	640	9.9 ± 0.4	5,7	3,3	2,5	14,5	5,7	7,7
5	1050	27.0 ± 2.5	7,6	0.0	0,0	9,1	6,0	6,5
6	1220	40.2 ± 2.5	2,9	3,3	0,0	13,7	9,7	4,0
7	700	13.9 ± 0.7	5,7	0,0	2,5	9,1	5,2	3,7
8	710	21.4 ± 2.0	5,7	5,0	5,0	13,4	10,2	6,5
9	380	13.8 ± 0.9	0,0	2,5	1,6	11,1	11,2	4,5
10	975	26.3 ± 1.9	7,6	0,0	5,0	11,1	7,5	4,0
11	700	18.8 ± 1.3	5,2	1,2	2,5	13,1	9,2	4,8
moyenne	799±267	25,7 ± 11,5	6,1±3,9	1,8±1,7	2,0±1,9	12,2 ±2,1	7,4±2,2	5,3±1,9
12	700	15.2 ± 1.0	2,9	1,6	2,5	12,0	7,7	6,5
13	926	26.3 ± 1.1	7,4	1,6	0,0	13,4	10,8	9,0
14	735	14.6 ± 0.5	5,7	0.0	0,0	15,4	11,1	6,9
15	210	5.1 ± 0.6	9,0	5,0	2,5	16,0	6,6	5,3
16	220	5.8 ± 0.4	5,7	0,0	5,0	10,0	10,5	7,5
17	390	8.0 ± 0.3	6,7	2,5	2,5	13,7	6,6	8,5
18	400	22.4 ± 0.9	5,7	5,0	3,3	10,8	6,6	6,3
19	360	1.1 ± 0.1	7,1	3,3	4,5	11,7	8,6	5,3
20	620	1.7 ± 0.2	8,6	5,0	5,4	10,2	9,7	6,6
21	595	3.1 ± 0.2	5,2	5,0	7,5	12,2	8,3	7,3
moyenne	515±236	10,3 ± 8,9	6,4±1,7	2,9±2,0	3,3± 2,3	12,5±2,0	8,6±1,7	6,9±1,2
22	21	1.6 ± 0.5	5,7	2,5	3,3	13,8	5,4	4,2
23	25	4.7 ± 0.2	5,7	2,5	5,0	11,4	10,0	7,3
24	7	1.2 ± 0.2	14,2	6,6	1,6	10,9	8,1	5,4
25	148	17.9 ± 0.5	19.0	5,0	5,0	12,3	7,0	5,7
26	28	1.3 ± 0.2	6,3	3,3	1,6	10,7	5,4	6,4
27	100	4.7 ± 0.2	13,4	4,1	1,6	15,0	5,0	7,8
28	1	1.1 ± 0.4	11,9	1,6	3,3	12,1	4,7	9,0
29	2	1.7 ± 0.1	7,6	2,5	0,0	11,4	5,4	6,1
30	7	2.3 ± 0.2	4,3	7,5	2,5	11,4	6,1	4,7
31	50	27.8 ± 0.9	8,1	3,3	2,5	17,3	6,5	4,5
32	28	6.1 ± 0.2	2,9	5,0	3,7	10,9	7,2	6,4
33	30	11.3 ± 0.5	6,7	5,0	3,3	12,6	7,2	6,9
moyenne	37,25±44	6,4 ± 8,1	8,8±4,7	4,0±1,7	2,7±1,4	12,4± 2,0	6,5±1,5	6,2±1,4

4-5 Relations évolutionnaires parmi les séquences du VIH-1

Dans le but d'évaluer la portée de la divergence évolutionnaire entre les séquences, nous avons estimé les distances entre les résidus amino-acides à partir du pourcentage d'identité des séquences en acides aminés. Les moyennes des distances entre les résidus amino-acides des séquences intrapatients et interpatients, ont été alors utilisées pour déterminer les relations phylogénétiques parmi les 114 séquences différentes de la région V3, les 88 séquences différentes de la région C4 et les 87 séquences différentes de la région C5. Un exemple d'arbres phylogénétiques "neighbor joining" représentant ces relations sont données dans la figure 30 (région V3), figure 31 (région C4) et figure 32 (région C5).

L'analyse de ces arbres phylogénétiques a montré que, malgré le fait que la plupart des ¨quasi-espèces¨ isolées chez un même patient ont tendance à se regrouper ensemble, plusieurs d'entre elles se trouvent dispersées de façon plus au moins aléatoire sur différentes branches des arbres phylogénétiques, et ce indépendamment du stade de l'infection, du compte CD4 ou du niveau de l'activité ADCC. Ceci semble indiquer que les ¨quasi-espèces¨ du VIH-1 présentes au début de l'infection (supposément les souches primaires, sous une forte pression sélective exercée par le système immunitaire de l'hôte) ne suivent pas une direction évolutionnaire précise, capable de les mener d'un état de ¨quasi-espèces¨ ¨sensibles¨ où les virus sont incapables d'échapper au contrôle d'un système immunitaire fonctionnel, à un état de "quasi-espèces" "muté ou mutant" où les virus sont plus adaptés à l'environnement hôte, et donc capables d'échapper à un système immunitaire affaibli.

L'absence de direction évolutionnaire évidente menant des ¨quasi-espèces¨ précoces, moins adaptées à l'environnement hôte, à des ¨quasi-espèces¨ tardives plus adaptées et probablement plus cytopathogéniques, peut s'expliquer par le fait que durant la progression de l'infection, les séquences du VIH-1 ne varient pas beaucoup, mais

subissent plutôt des mutations ponctuelles dirigées par les antigènes viraux en réponse aux pressions sélectives du système immunitaire. Ces mutations, qui sont nécessaires à la survie et à l'adaptation du virus à son environnement hôte, peuvent varier (par leur nature et leur localisation) d'un système immunitaire-hôte à un autre. Ainsi, les antigènes viraux dirigent des mutations, juste pour le besoin de survie du virus, du moins jusqu'à l'émergence d'une forme de virus mieux adaptée à l'environnement hôte. Cette forme de virus, mieux adaptée, n'aura plus besoin de diriger fréquemment de nouvelles mutations en réponse aux pressions sélectives de l'hôte (donc elle change moins). Ceci est en concordance avec nos résultats qui soulignaient un taux de variabilité des séquences des "quasi-espèces" intrapatient et interpatient très similaires, et ce peu importe le stade de l'infection.

L'étude de la relation entre la diversité génétique des "quasi-espèces" provirales et la réponse ADCC a montré que le taux de variabilité génétique (des épitopes ADCC) des "quasi-espèces" intrapatient et interpatient est demeuré similaire durant tous les stades de l'infection, et ne semble pas être en corrélation avec le déclin de l'activité ADCC ou le déclin des cellules CD4. Par contre, l'absence de corrélation entre le taux de variabilité et l'activité ADCC n'exclut pas l'émergence de "quasi-espèces" ayant dirigé des mutations spécifiques qui pourraient leur conférer une meilleure adaptation à leur environnement hôte et par conséquent la capacité de causer plus de dommage au système immunitaire-hôte.

Figure 30: Relations évolutionnaires parmi les séquences du VIH-1 (région V3).

Arbre phylogénétique consensus des séquences, en acides aminés de la région V3, des 114 quasi-espèces différentes isolées chez les 33 patients de notre cohorte croisée. Cet arbre phylogénétique a été construit selon la méthode "neighbor-joining" à l'aide du programme NEIGHBOR. La robustesse des arbres a été établie en faisant un "bootstrap" (sur 100 replicats) de multiples alignements à l'aide du programme SEGBOOT, et l'arbre consensus final a été construit en utilisant le programme CONSENSE. Tous les programmes utilisés pour les analyses phylogénétiques font partie de PHYLIP (Phylogeny Inference Package) (Felsenstein, 1989).

Les longueurs des branches de l'arbre phylogénétique est en concordance avec les distances génétiques relatives aux séquences de chacune des quasi-espèces.

La construction de cet arbre phylogénétique a montré que les quasi-espèces isolées chez chacun des patients ne semble pas diverger d'un point commun (ne se regroupent pas sur une même branche), et se retrouvent dispersées de façon plus au moins aléatoire sur les différentes branches formant cet arbre. Ceci pourrait être dû au fait que i) les quasi-espèces isolées chez un patient ont plus d'une séquence-ancêtre ou ii) le ou les séquences-ancêtres ne suivent pas une direction évolutionnaire précise qui permet le maintien de liens entre les quasi-espèces isolées chez le même patient.

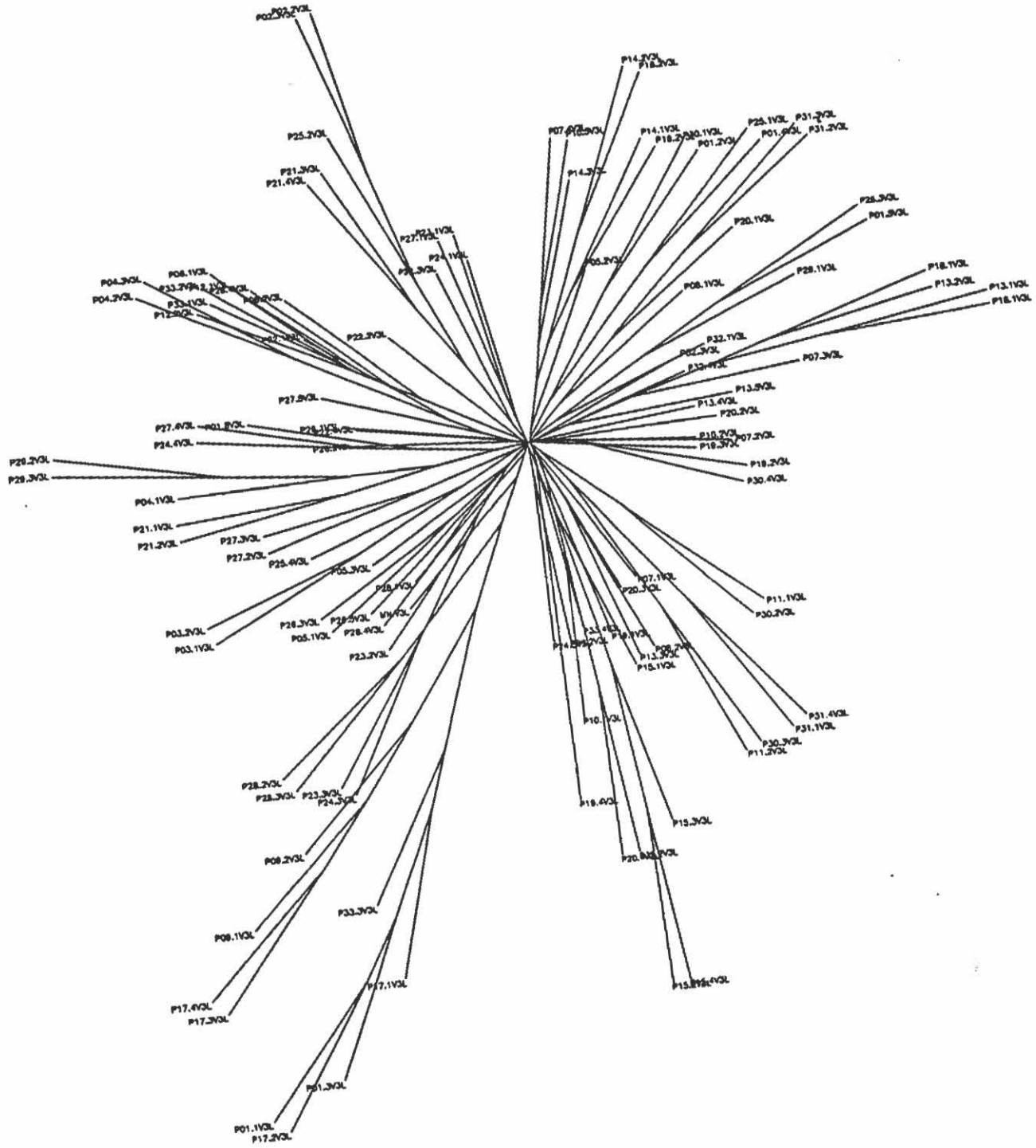

P02.2V3L
P14.2V3L
P25.2V3L
P21.3V3L
P21.4V3L
P25.1V3L
P31.2V3L
P14.1V3L
P01.2V3L
P20.1V3L
P28.3V3L
P01.3V3L
P08.1V3L
P28.1V3L
P18.1V3L
P13.2V3L
P13.1V3L
P18.1V3L
P32.1V3L
P07.3V3L
P13.5V3L
P13.4V3L
P20.2V3L
P18.2V3L
P30.4V3L
P04.3V3L
P04.2V3L
P22.2V3L
P27.5V3L
P27.4V3L
P24.4V3L
P29.2V3L
P29.3V3L
P04.1V3L
P21.1V3L
P21.2V3L
P27.3V3L
P27.2V3L
P25.4V3L
P03.2V3L
P03.1V3L
P23.2V3L
P11.1V3L
P30.2V3L
P31.4V3L
P31.1V3L
P30.3V3L
P11.2V3L
P28.2V3L
P28.3V3L
P23.3V3L
P24.3V3L
P08.2V3L
P08.1V3L
P33.3V3L
P17.4V3L
P17.3V3L
P17.1V3L
P01.3V3L
P01.1V3L
P17.2V3L
P15.3V3L

Figure 31: Relations phylogénétiques entre les séquences de la région C4.

L'étude des relations phylogénétiques entre les séquences de la région C4, relativement bien conservée, est représentée par un arbre phylogénétique "neighbor-joining". Cette étude a montré que, si les séquences des quasi-espèces isolées chez un même patient ont tendance a se regrouper ensemble, les quasi-espèces de plusieurs patients se retrouvent, quand même, dispersées sur les différentes branches de l'arbre phylogénétique. Ceci suggère i) la présence chez chacun des patients de plus d'une souches infectantes (ancêtre) ou ii) simplement l'absence de direction évolutionnaire chez le ou les souches infectantes tout au long de l'infection.

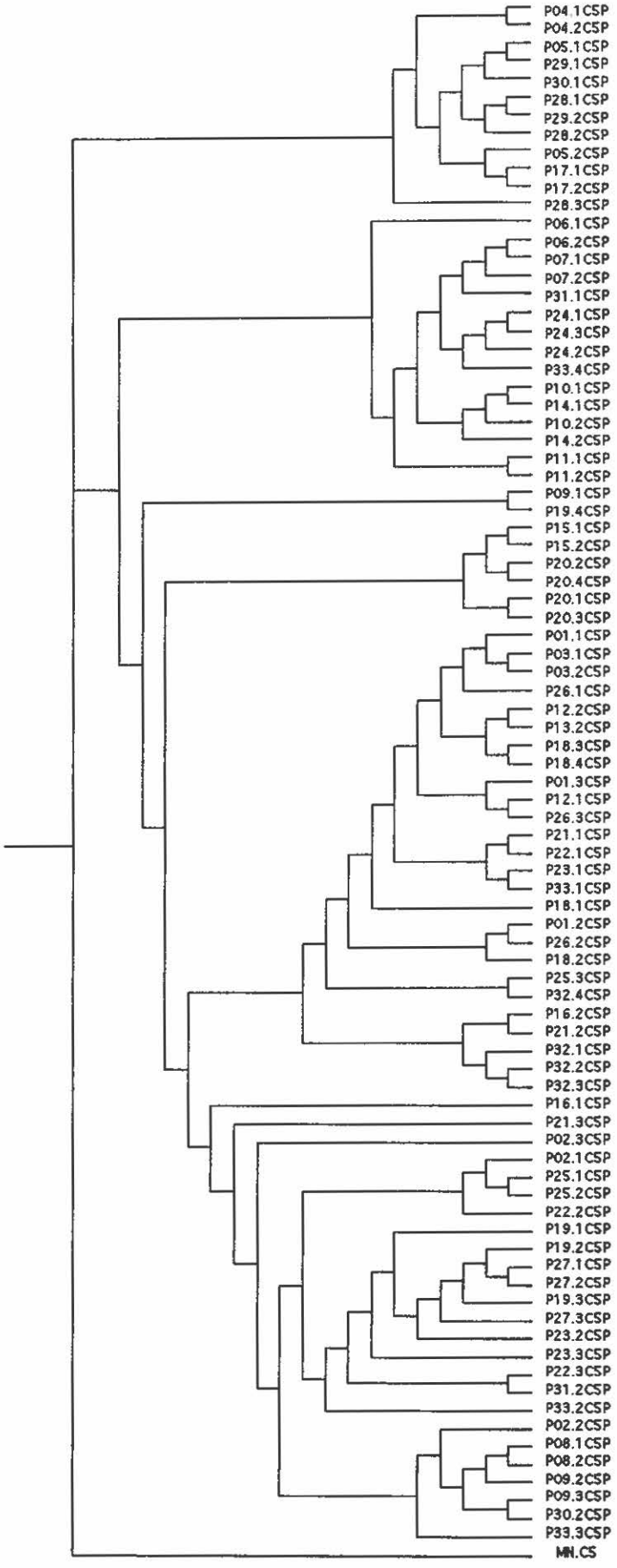
Les légendes décrivant la construction de l'arbre phylogénétique sont identiques à celle de la **figure 30.**


P25.3C4P
P17.2C4P
P12.1C4P
P12.2C4P
P12.3C4P
P13.1C4P
P13.2C4P
P16.1C4P
P16.2C4P
P13.3C4P
P20.3C4P
P26.1C4P
P26.2C4P
P21.1C4P
P26.3C4P
P26.4C4P
P04.2C4P
P04.1C4P
P25.1C4P
P25.2C4P
P04.3C4P
P03.1C4P
P03.2C4P
P09.1C4P
P09.2C4P
P23.1C4P
P23.2C4P
P20.2C4P
P23.3C4P
P24.2C4P
P19.2C4P
P31.1C4P
P31.2C4P
P21.2C4P
P01.1C4P
P18.2C4P
P06.1C4P
P06.2C4P
P15.3C4P
P06.3C4P
P22.1C4P
P22.2C4P
P32.2C4P
P01.2C4P
P05.3C4P
P10.1C4P
P20.1C4P
P10.2C4P
P10.3C4P
P07.1C4P
P07.2C4P
P32.1C4P
P08.1C4P
P08.2C4P
P14.1C4P
P14.2C4P
P14.3C4P
P24.3C4P
P19.1C4P
P27.3C4P
P33.1C4P
P27.2C4P
P27.1C4P
P02.1C4P
P05.1C4P
P05.2C4P
P02.2C4P
P17.3C4P
P29.2C4P
P30.1C4P
P29.1C4P
P17.1C4P
P11.1C4P
P11.2C4P
P11.3C4P
P11.4C4P
P24.1C4P
P31.3C4P
P15.1C4P
P19.3C4P
P28.1C4P
P15.2C4P
P31.4C4P
P28.2C4P
P18.1C4P
P28.3C4P
P30.2C4P
MN.C4

Figure 32: Relations phylogénétiques entre les séquences de la région C5.

L'étude des relations phylogénétiques entre les séquences de la région C5 est représentée, par un arbre phylogénétique "neighbor-joining". Cette étude nous a fourni les mêmes informations que celles présentées dans la **figure 31**. Ainsi, et même si les séquences des quasi-espèces isolées chez un même patient ont tendance a se regrouper ensemble, les quasi-espèces de plusieurs patients se retrouvent dispersées sur les différentes branches de l'arbre phylogénétique.

Les légendes décrivant la construction de l'arbre phylogénétique sont identiques à celle de la **figure 30.**


P04.1CSP
P04.2CSP
P05.1CSP
P29.1CSP
P30.1CSP
P28.1CSP
P29.2CSP
P28.2CSP
P05.2CSP
P17.1CSP
P17.2CSP
P28.3CSP
P06.1CSP
P06.2CSP
P07.1CSP
P07.2CSP
P31.1CSP
P24.1CSP
P24.3CSP
P24.2CSP
P33.4CSP
P10.1CSP
P14.1CSP
P10.2CSP
P14.2CSP
P11.1CSP
P11.2CSP
P09.1CSP
P19.4CSP
P15.1CSP
P15.2CSP
P20.2CSP
P20.4CSP
P20.1CSP
P20.3CSP
P01.1CSP
P03.1CSP
P03.2CSP
P26.1CSP
P12.2CSP
P13.2CSP
P18.3CSP
P18.4CSP
P01.3CSP
P12.1CSP
P26.3CSP
P21.1CSP
P22.1CSP
P23.1CSP
P33.1CSP
P18.1CSP
P01.2CSP
P26.2CSP
P18.2CSP
P25.3CSP
P32.4CSP
P16.2CSP
P21.2CSP
P32.1CSP
P32.2CSP
P32.3CSP
P16.1CSP
P21.3CSP
P02.3CSP
P02.1CSP
P25.1CSP
P25.2CSP
P22.2CSP
P19.1CSP
P19.2CSP
P27.1CSP
P27.2CSP
P19.3CSP
P27.3CSP
P23.2CSP
P23.3CSP
P22.3CSP
P31.2CSP
P33.2CSP
P02.2CSP
P08.1CSP
P08.2CSP
P09.2CSP
P09.3CSP
P30.2CSP
P33.3CSP
MN.CS

4-6 Localisation et conséquences des changements des séquences au niveau de la région V3

Il avait été bien établi que les "quasi-espèces" du VIH-1, isolées tôt durant le stade asymptomatique de l'infection, et celles isolées durant les stades avancés de l'infection présentent des phénotypes biologiques distincts (Cheng-Mayer *et al.*, 1988; Roos *et al.*, 1992; Tersmette *et al.*, 1988; Zhu *et al.*, 1993). Durant le stade précoce de l'infection, les "quasi-espèces" non-inductrices de syncitia (NSI), en culture cellulaire, prédominent. Ces "quasi-espèces" ont la capacité de se répliquer dans les macrophages primaires. Cependant, durant les stades avancés de l'infection, apparaissent des "quasi-espèces" inductrices de syncitia (SI), avec une vitesse de réplication plus élevée, et qui ont perdu généralement la capacité de se répliquer dans les macrophages (Connor et Ho, 1994; Schuitemaker *et al.*, 1992)

In vitro, les souches SI sont très cytopathogéniques, induisent plus rapidement la formation de syncitia et ont une vitesse de réplication élevée, alors que les souches NSI sont moins cytopathogéniques, induisent peu ou pas de syncitia et ont une vitesse de réplication plus lente. Les souches SI sont également qualifiées de souches "cellules-T tropique" à cause de leur grande susceptibilité à infecter les cellules-T, contrairement aux souches NSI qualifiées de souches "macrophages-tropique" qui montrent une plus grande susceptibilité pour les macrophages que pour les cellules-T.

Les souches de phénotype SI ont été associées à la perte accélérée des lymphocytes $CD4^+$ dans la circulation périphérique et à la progression de la maladie. Koot *et al.* (1993) ont rapporté que l'apparition dans le sang de souches SI peut prédire la progression vers le SIDA dans un intervalle de deux ans. De leur côté, Nielsen *et al.* (1993) et Roos *et al.* (1992) ont montré que la présence de souches SI, durant l'infection primaire, est en corrélation avec la progression rapide de la maladie. Fouchier *et al.* (1992) et deJong *et al.* (1992) ont montré que des changements spécifiques de résidus amino-acides au niveau de

la région variable V3 contrôlent le phénotype des souches de VIH-1 en culture.

Fouchier *et al.* (1992) ont montré que le phénotype SI dépend de la charge des deux résidus amino-acides à la position 11 et la position 25 à l'intérieur de la région V3. Ainsi la souche présente à le plus souvent un phénotype SI, si les deux résidus 11 et 25 à l'intérieur de la région V3 ont une charge positive, ou si l'une des deux positions est occupée par un acide aminé basique. Les souches NSI ont un acide aminé neutre, habituellement S (sérine) ou G (glycine) à la position 11 et un acide aminé chargé négativement, E (acide glutamique) ou D (acide aspartique) ou neutre, A (alanine) ou Q (glutamine) à la position 25 de la boucle V3. DeJong *et al.* (1992) ont été capables de produire des souches SI par mutagenèse dirigée en introduisant des acides aminés basiques aux positions 11 et 25 de la boucle V3 de souches NSI.

En se basant sur ces travaux, et tel que présenté dans la figure 36, la majorité des ¨quasi-espèces¨ provirales isolées chez les patients de notre cohorte seraient de phénotype NSI ¨macrophages-tropique¨. Les souches dotées d'un phénotype SI seraient, sauf chez le patient P01, absents durant le stade asymptomatique pour émerger chez certains patients (P15, P21, P22, P25, P27, P28, P29, P32 et P33) durant les stades III et IV de l'infection.

La plupart de nos séquences avaient des résidus amino-acides neutres S (serine) ou G (glycine) à la position 11 (106 sur 114 séquences) et des résidus chargés négativement E (acide glutamique) ou D(acide aspartique) ou des résidus neutres A (alanine), Q (glutamine), S (serine) ou G (glycine) à la position 25 (104 sur 114 séquences) de la boucle V3. La présence combinée de ces résidus à la position 11 et 25 de la boucle V3 prédit un phénotype NSI ¨macrophages-tropique¨ pour 104 des 114 séquences isolées chez les patients enrolés dans cette étude, soit chez 23 patients sur 33, alors que la présence d'acides aminés basiques R (arginine) à la position 11 et R (arginine) ou K (lysine) à la position 25 de la boucle V3, prédit un phénotype SI pour 9 ¨quasi-espèces¨ sur 114, soit chez 10 patients sur 33.

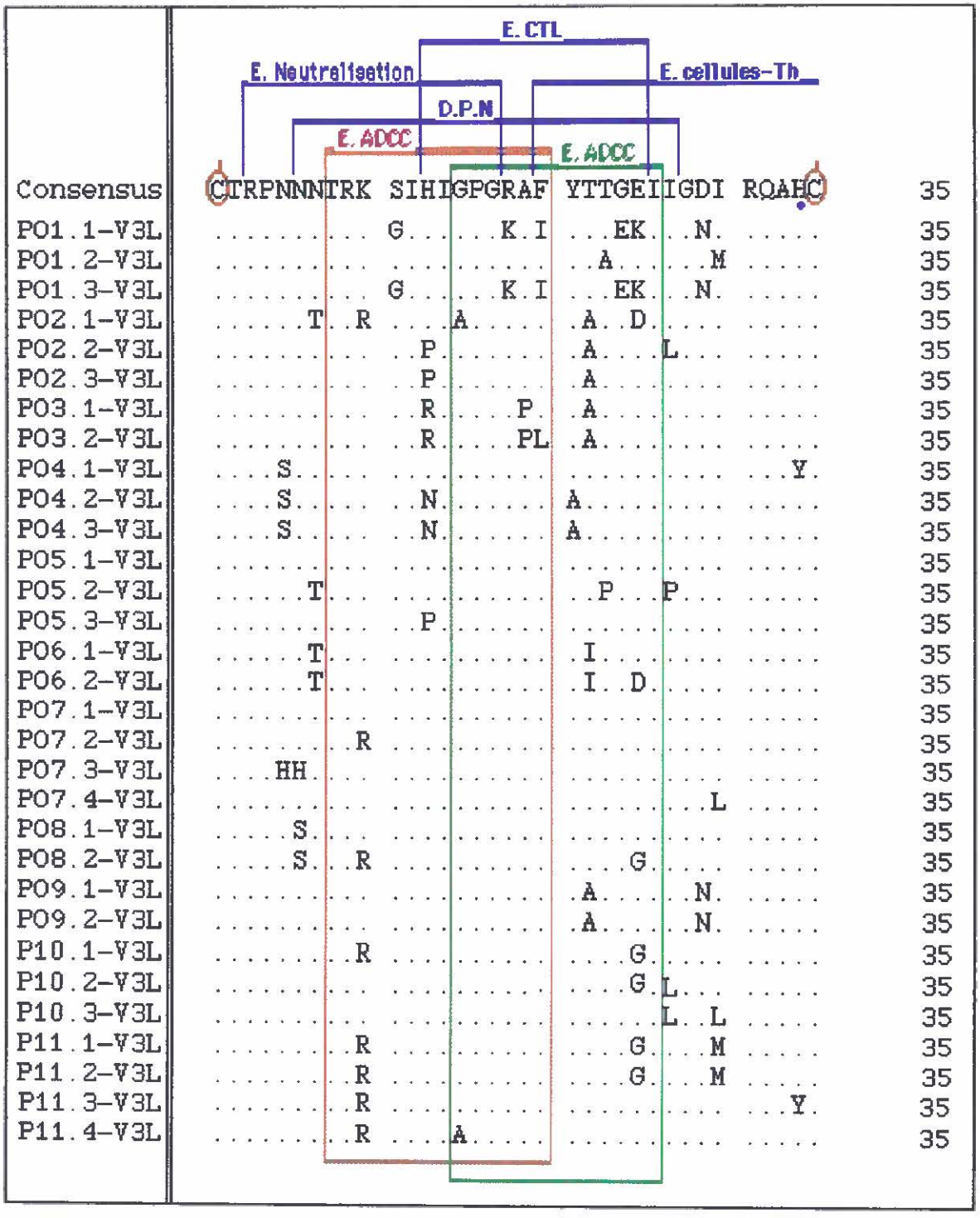
Il a déjà été montré que les souche SI, ou souches "tardives", ne sont pas reconnues par les différentes composantes du système immunitaire, et en particulier par les anticorps neutralisants (McKeating *et al.*, 1989). L'apparition de telle souches (SI) chez les patients au stades III et IV était généralement accompagnée d'une baisse importante des titres d'anticorps ADCC (tableau 5). Il est, cependant, très difficile d'attribuer la perte de l'activité ADCC à la seule apparition de souches SI. En effet, la majorité des patients au stade III et IV de l'infection, et, dont l'activité ADCC a été lourdement altérée, montraient des "quasi-espèces" dont les séquences prédisaient un phénotype NSI (tableau 5). L'apparition de telles souches (SI) n'est pas nécessairement accompagnée d'une diversité génétique plus importante (tableau 5).

L'apparition de souches SI avait été associée à la perte accélérée des cellules $CD4^+$ et à la progression de la maladie (Koot *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1993; et Roos *et al.*, 1992). Or nos résultats montrent que les individus infectés avec des souches dont les séquences semblent pointer vers un phénotype NSI peuvent également voir, avec le temps, la chute de leur cellules $CD4^+$ et la progression vers la maladie (c'est le cas de la majorité des patients au stade III et IV de l'infection). Ces observations sont supportées par les travaux de Richman et Bozzette, (1994) qui ont montré, chez des patients infectés exclusivement avec des souches NSI, un déclin du nombre de cellules CD4 et la progression de l'infection vers le SIDA.

Figure 33: Alignement multiple des séquences, en acides aminés, de la boucle V3 des différentes quasi-espèces isolées chez les 11 patients au stade II de l'infection. Ces séquences sont déduites à partir de celles présentées dans la **figure 21**. Les patients PO4, P05, P07, P08 et P10 possèdent des quasi-espèces (P04.1, P05.1, P07.1, PO7.3, P08.1, P10.2 et P10.3) dont les séquences des épitopes ADCC sont identiques mais dont les niveaux d'activités ADCC sont différents **(tableau 4)**.

Seul le patient P01 avait des quasi-espèces P01.1 et P01.3 dont la nature de leur séquences prédisaient un phénotype inducteur de syncitia (SI), avec un acide aminé basique, lysine (K) à la position 25 de la boucle V3.

Les légendes des différentes régions fonctionnelles de la V3 sont identiques à celles de la **figure 21.**

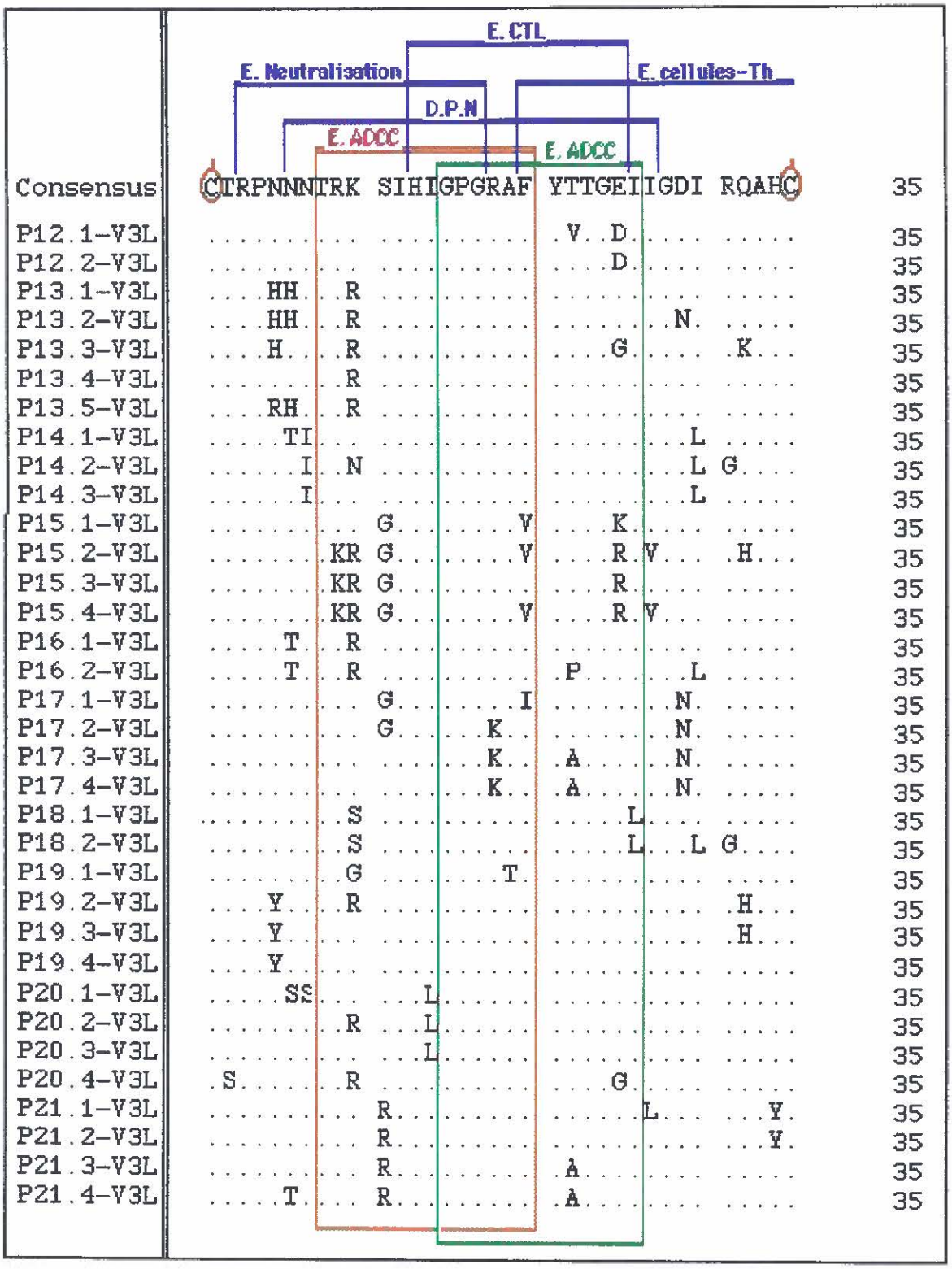


Consensus	CTRPNNNTRK SIHIGPGRAF YTTGEIIGDI RQAHC	35
P01.1-V3L	.....G.....K.I ...EK..N.....	35
P01.2-V3L	.....A.....M.....	35
P01.3-V3L	.....G.....K.I ...EK..N.....	35
P02.1-V3L	.....T..R ....A..... .A..D.....	35
P02.2-V3L	.....P..... .A....L.....	35
P02.3-V3L	.....P..... .A.....	35
P03.1-V3L	.....R.....P. .A.....	35
P03.2-V3L	.....R.....PL .A.....	35
P04.1-V3L	....S..... ....Y.	35
P04.2-V3L	....S.....N..... A.....	35
P04.3-V3L	....S.....N..... A.....	35
P05.1-V3L	....	35
P05.2-V3L	.....T..... .....P...P.....	35
P05.3-V3L	.....P.....	35
P06.1-V3L	.....T..... .....I.....	35
P06.2-V3L	.....T..... .....I..D.....	35
P07.1-V3L	....	35
P07.2-V3L	.....R.....	35
P07.3-V3L	....HH.....	35
P07.4-V3L	....L.....	35
P08.1-V3L	.....S.....	35
P08.2-V3L	.....S..R ....G.....	35
P09.1-V3L	....A.....N.....	35
P09.2-V3L	....A.....N.....	35
P10.1-V3L	.....R..... ...G.....	35
P10.2-V3L	....G.L.....	35
P10.3-V3L	....L..L.....	35
P11.1-V3L	.....R..... ...G...M.....	35
P11.2-V3L	.....R..... ...G...M.....	35
P11.3-V3L	.....R..... .....Y.	35
P11.4-V3L	.....R....A.....	35

Figure 34: Alignement multiple des séquences, en acides aminés, de la boucle V3 des différentes quasi-espèces isolées chez les 10 patients au stade III de l'infection. Ces séquences sont déduites à partir de celles présentées dans la **figure 22**. Les patients P13, P19 et P20 possèdent des quasi-espèces (P13.4, 919.3, P19.4 et P20.3) dont les séquences des épitopes ADCC sont similaires à certaines des quasi-espèces présentes chez les patients au stade II de l'infection mais dont les niveaux d'activités ADCC diffèrent énormément.

Tous les quasi-espèces isolées chez le patient P15 et P21 avaient des séquences qui prédisaient un phénotype SI avec des résidus amino-acides basiques soit à la position 25 de la boucle V3 (lysine, K) ou arginine, R), soit à la position 11 de la boucle (arginine, R).

Les légendes des différentes régions fonctionnelles de la V3 sont identiques à celles de la **figure 21.**

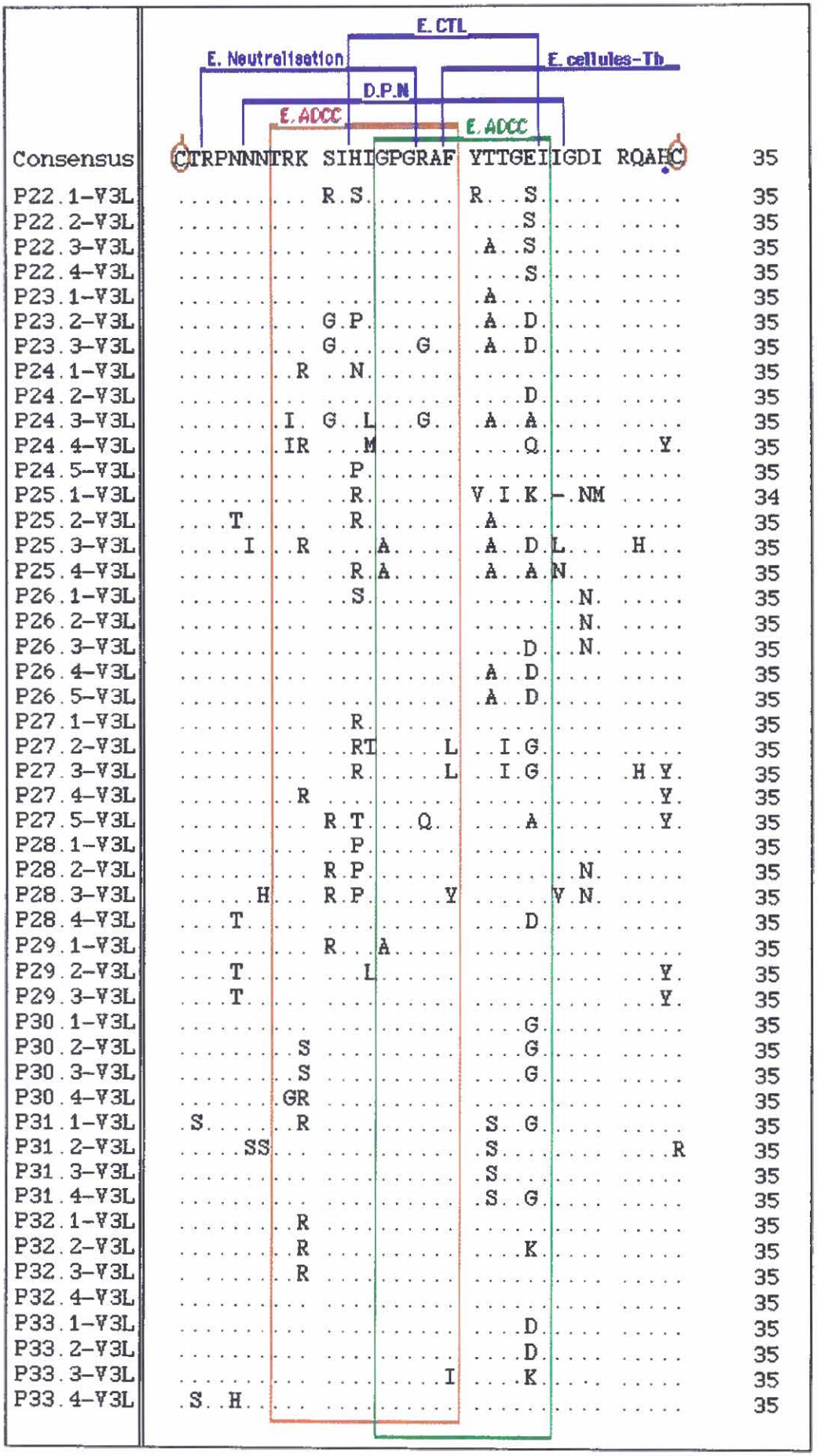


Consensus	CTRPNNNTRK SIHIGPGRAF YTTGEIIGDI RQAHC	35
P12.1-V3L	.....V..D.....	35
P12.2-V3L	.....D.....	35
P13.1-V3L	...HH...R.....	35
P13.2-V3L	...HH...R.....N.	35
P13.3-V3L	...H....R.....G.....K...	35
P13.4-V3L	.....R.....	35
P13.5-V3L	...RH...R.....	35
P14.1-V3L	....TI.....L.....	35
P14.2-V3L	.....I..N.....L.G....	35
P14.3-V3L	.....I.....L.....	35
P15.1-V3L	.....G.....V....K.....	35
P15.2-V3L	.....KR G.....V....R.V.....H...	35
P15.3-V3L	.....KR G.....R.....	35
P15.4-V3L	.....KR G.....V....R.V.....	35
P16.1-V3L	....T...R.....	35
P16.2-V3L	....T...R.....P.....L.....	35
P17.1-V3L	.....G.....I.....N.....	35
P17.2-V3L	.....G.....K.....N.....	35
P17.3-V3L	.....K..A.....N.....	35
P17.4-V3L	.....K..A.....N.....	35
P18.1-V3L	.....S.....L.....	35
P18.2-V3L	.....S.....L...L.G....	35
P19.1-V3L	.....G.....T.....	35
P19.2-V3L	...Y...R.....H...	35
P19.3-V3L	...Y.....H...	35
P19.4-V3L	...Y.....	35
P20.1-V3L	....SS.....L.....	35
P20.2-V3L	.....R...L.....	35
P20.3-V3L	.....L.....	35
P20.4-V3L	.S.....R.....G.....	35
P21.1-V3L	.....R.....L.....Y.	35
P21.2-V3L	.....R..... ...Y.	35
P21.3-V3L	.....R.....A.....	35
P21.4-V3L	....T....R.....A.....	35

Figure 35: Alignement multiple des séquences, en acides aminés, de la boucle V3 des différentes quasi-espèces isolées chez les 12 patients au stade IV de l'infection. Ces séquences sont déduites à partir de celles présentées dans la **figure 23**. les patients P22, P26 et P32 possèdent des quasi-espèces (P22.2, P22.4, P26.2, P26.4, P32.3 et P32.4) dont les séquences des épitopes ADCC sont similaires à certaines des quasi-espèces présentes chez les patients au stade II et III de l'infection mais dont les niveaux d'activités ADCC diffèrent énormément.

Les quasi-espèces P22.1, P25.1, P27.5, P28.2, P28.3, P29.1, P32.2, et P33.3 avaient des séquences dont la nature prédisaient un phénotype SI, avec des acides aminés basiques soit à la position 11 de la boucle V3 (arginine, R), soit à la position 25 (lysine, K).

Les légendes des différentes régions fonctionnelles de la V3 sont identiques à celles de la **figure 21.**



Consensus	CTRPNNNTRK SIHIGPGRAF YTTGEIIGDI RQAHC	35
P22.1-V3L	.....R.S.....R...S.....	35
P22.2-V3L	....S.....	35
P22.3-V3L	.... .A..S.....	35
P22.4-V3L	....S.....	35
P23.1-V3L	.... .A.....	35
P23.2-V3L	.....G.P..... .A..D.....	35
P23.3-V3L	.....G.....G.. .A..D.....	35
P24.1-V3L	.....R..N.....	35
P24.2-V3L	....D.....	35
P24.3-V3L	.....I.G..L..G.. .A..A.....	35
P24.4-V3L	.....IR...M..... ....Q..... ...Y.	35
P24.5-V3L	....P.....	35
P25.1-V3L	....R..... V.I.K.-.NM	34
P25.2-V3L	...T..... ..R..... .A.....	35
P25.3-V3L	.....I..R ....A..... .A..D.L... .H...	35
P25.4-V3L	....R.A..... .A..A.N...	35
P26.1-V3L	....S..... .....N.	35
P26.2-V3L	....N.	35
P26.3-V3L	....D..N.	35
P26.4-V3L	.... .A..D.....	35
P26.5-V3L	.... .A..D.....	35
P27.1-V3L	....R.....	35
P27.2-V3L	....RT.....L ..I.G.....	35
P27.3-V3L	....R.....L ..I.G..... .H.Y.	35
P27.4-V3L	.....R..... ....Y.	35
P27.5-V3L	.....R.T...Q.. ....A..... ...Y.	35
P28.1-V3L	....P.....	35
P28.2-V3L	.....R.P..... .....N.	35
P28.3-V3L	.....H...R.P.....Y ......V.N.	35
P28.4-V3L	...T..... ....D.....	35
P29.1-V3L	.....R...A.....	35
P29.2-V3L	...T..... ...L..... ....Y.	35
P29.3-V3L	...T..... ....Y.	35
P30.1-V3L	....G.....	35
P30.2-V3L	.....S..... ....G.....	35
P30.3-V3L	.....S..... ....G.....	35
P30.4-V3L	.....GR.....	35
P31.1-V3L	.S.....R..... .S..G.....	35
P31.2-V3L	....SS..... .S..... ...R	35
P31.3-V3L	.... .S.....	35
P31.4-V3L	.... .S..G.....	35
P32.1-V3L	.....R.....	35
P32.2-V3L	.....R..... ....K.....	35
P32.3-V3L	.....R.....	35
P32.4-V3L	....	35
P33.1-V3L	....D.....	35
P33.2-V3L	....D.....	35
P33.3-V3L	....I ....K.....	35
P33.4-V3L	.S..H.....	35

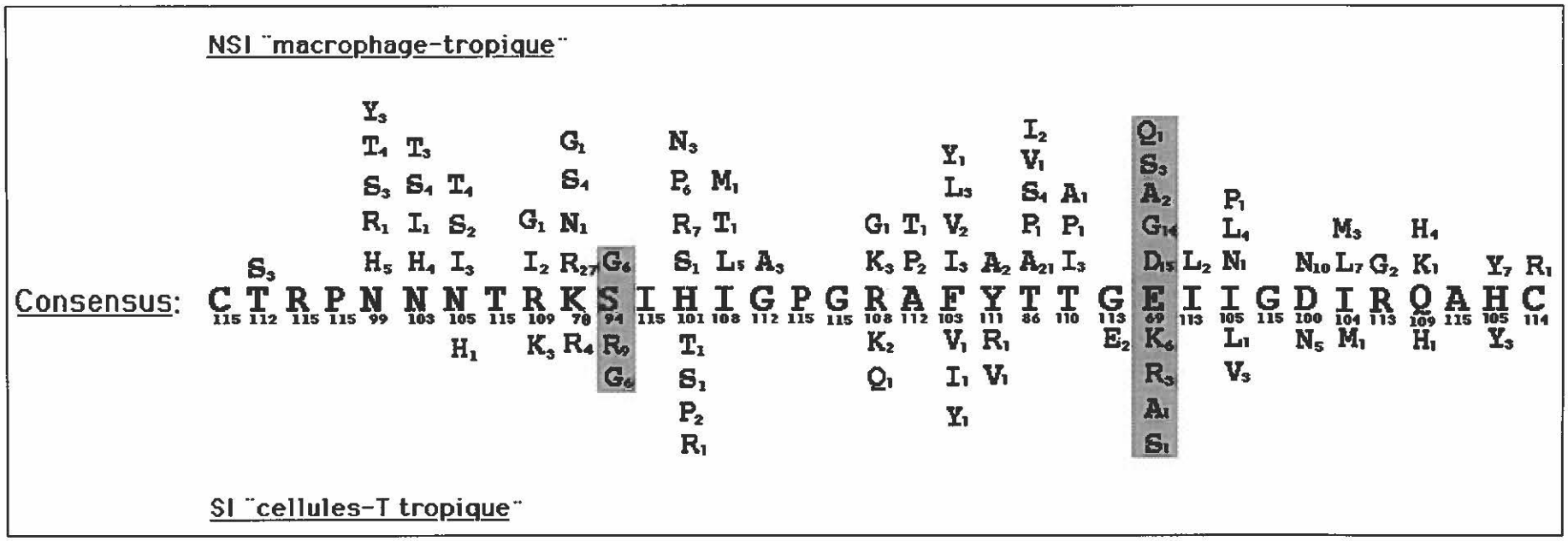


Figure 36. Phénotype inducteur de syncitia (SI) versus phénotype non-inducteur de syncitia (NSI)

La prédiction des phénotypes s'est faite à partir des séquences de quasi-espèces isolées chez les 33 patients membres de notre cohorte croisée, en se basant sur les travaux de *Fouchier et al. (1992); deJong et al. (1992); Donaldson et al. (1994); Kuiken et al. (1995); Cornelissen et al. (1995).*

Les résidus amino-acides à la position 11 et à la position 25 *(boites noires)* sont les deux résidus dont la nature contrôle le phénotype SI et NSI. La présence d'un acide aminé basique R (Lys) ou K (Arg) à une de ces positions a été associée au phénotype SI

Les chiffres en indices représentent le nombre de quasi-espèces ayant cet acide aminé à cette position particulière.

La séquences consensus a été déduite à partir de la fréquence des différents résidus amino-acides à chaque position.

Il a été montré que malgré un phénotype plus agressif *in vitro*, les souches SI "cellules-T tropiques" se transmettent moins efficacement après contact sexuel que les souches NSI "macrophages-tropique"(Roos *et al.*, 1992 et Zhu *et al.*, 1993). Ceci est dû au fait que les macrophages seraient les premières cellules infectées au niveau de la barrière mucosale en cas de transmission sexuelle, et que ces cellules "réservoirs" infectées sont responsables de la dissémination systémique du virus retrouvé dès l'infection primaire (Zhu *et al.*, 1993). La présence, chez le patient P01 de "quasi-espèces" (P01.1 et P01.3) de phénotype SI durant le stade asymptomatique, semble en lègere contradiction avec les propos de Roos *et al.* (1992) et de Zhu *et al.* (1993), et pourrait s'expliquer par une transmission de virus autre que sexuelle. En effet, la majorité des patients inclus dans cette étude étaient des utilisateurs de drogues injectables (description de la cohorte dans Matériel et Méthodes, section 3.1). Ainsi, des souches de phénotype SI auraient pu être directement introduites dans la circulation périphérique. La présence de souches SI chez le patient P01, durant le stade asymptomatique, était accompagnée d'un compte CD4 normal et d'une réponse ADCC intacte, suggérant qu'un système immunitaire fonctionnel serait capable de s'accommoder de la présence de souches (SI) plus cytopathogéniques, tôt dans l'infection. Dans une telle situation, la réponse ADCC qui constitue la première composante immune active après l'infection au VIH-1 serait la mieux désignée pour éradiquer les souches SI, en détruisant les cellules infectées productrices de virus.

Les séquences des épitopes ADCC, au niveau de la boucle V3, chevauchent les séquences des épitopes de neutralisation et de CTL (fig. 33, 34 et 35). Il est donc intéressant de noter que la chute de l'activité ADCC, qui pourrait être due à des mutations dirigées par les antigènes viraux en réponse à la pression sélective exercée par la réponse ADCC elle même, pourrait également être due à une sélection positive exercée cette fois-ci par les anticorps neutralisants et/ou la réponse CTL. Cependant, en se basant sur les analyses que nous avons présentées, et également sur d'autres analyses qui n'ont pas été présentées dans cette thèse mais qui proviennent également de nos travaux, nous n'étions

pas capables d'identifier des mutations spécifiques ponctuelles (ou autres) associées à la perte de l'activité ADCC. Il est donc possible que l'activité ADCC soit victime, avec la progression de l'infection, d'une sélection positive exercée par d'autres composantes du système immunitaire (anticorps neutralisants, réponse CTL). Cette sélection correspondrait à une ou plusieurs mutations, à l'intérieur des séquences des épitopes ADCC ou au niveau des régions avoisinantes, et qui pourraient modifier la structure et/ou la conformation des sites reconnus par les anticorps ADCC. Cette hypothèse est en partie supportée par le fait que la séquence **GRAF**, au milieu de la boucle V3 et qui semble représenter une cible potentielle (et peut-être l'unique cible) pour les anticorps ADCC dans cette région (Forthal *et al.*, 1995), chevauche les sites potentiels pour les anticorps neutralisants et pour les CTL. Il serait donc logique de penser que la variabilité génétique des épitopes neutralisants, ou ceux de l'activité CTL dans cette région, affecte les autres fonctions effectrices immunes dont l'ADCC. La séquence **GRAF** à l'intérieur de la boucle V3 est demeurée relativement bien conservée, et ce indépendamment du stade de l'infection (fig 33, 34, 35 et 36).

En résumé, l'étude des relations entre la diversité génétique virale et la perte de l'activité ADCC semble pointer vers une direction différente de laisser penser la notion selon laquelle ce serait l'augmentation de la diversité génétique virale qui est responsable de la progression de la maladie, plutôt que la déplétion des cellules CD4 et l'altération du système immunitaire.

5- Quantification différentielle des ARNm viraux par RT-qc-PCR

La progression de la maladie est accompagnée de l'apparition de souches de virus ("quasi-espèces") plus cytopathogéniques ayant acquis une vitesse de réplication plus importante, contrairement aux souches virales isolées durant le stade asymptomatique de l'infection. Cependant, la caractérisation de telles souches se faisait toujours *in vitro*, d'où notre dernier objectif qui était de vérifier une telle hypothèse *in vivo*, et du même coup étudier les relations entre la diversité génétique virale, l'activité ADCC et la réplication du virus à l'intérieur des cellules. L'idée était d'étudier les niveaux de transcription des ARNm viraux dans les cellules infectées de patients à différents stades de l'infection, et l'approche expérimentale choisie pour étudier les niveaux de transcription des ARNm viraux était celle de la Reverse Transcription-quantitative compétitive-PCR (RT-qc-PCR).(Merzouki *et al.*, 1994b, Annexe A; Michael *et al.*, 1995).

L'exploitation des résultats de la quantification des ARNm viraux était basée sur le fait que le cycle de réplication du VIH-1 est divisé en deux phases, une phase précoce (régulatrice) durant laquelle l'expression des ARNm régulateurs (*tat*, *rev* et *nef*) est prédominante par rapport aux ARNm non-épissés (*pol*), sous exprimés ou totalement absents, et une phase tardive (structurale) durant laquelle l'expression des ARNm non épissés s'accentue en signe d'une augmentation de production de virions. Le ratio ARNm régulateurs/ARNm structuraux, également appelé ratio d'épissage va donc nous permettre, comme nous l'avons déjà montré (Michael et al., 1995), d'évaluer le niveau de la réplication virale et de la production de virions dans les cellules infectées. Ainsi, plus il y a d'ARNm structuraux plus il y a production de virions et plus le ratio d'épissage a tendance à baisser. Le niveau et l'état de réplication des virus à l'intérieur des cellules infectées sont exprimés sous forme de valeurs de ce ratio d'épissage.

La figure 37 montre la séquence nucléotidique du standard interne utilisé comme cible compétitrice pour la quantification, par qc-PCR, des ARNm régulateurs *tat*, *rev* et *nef* et des ARNm structuraux *pol*. Le standard interne Pol-TRN-SI (plasmide pPoT Amer) contient un insert de 42 nucléotides au niveau de l'exon 5 commun aux 3 gènes régulateurs, et un insert de 34 nucléotides dans la séquence *pol*. L'analyse relative de l'expression des ARNm régulateurs épissés et des ARNm des gènes structuraux consistait d'abord en la synthèse des ADNc correspondant aux transcrits messagers *tat*, *rev*, *nef* et *pol* en utilisant les amorces 52R et polR. Ensuite chaque sous-classe de transcrits a été amplifiée séparément en présence de quantité croissante d'ADN compétiteur en utilisant des amorces Pol.R1-JOE et 90R-FAM fluorescentes (Merzouki *et al.*, 1994b, Annexe A).

Les résultats de la quantification des ARNm (tableau 6) sont exprimés en nombre de copies de transcrits messagers par 1000 PBMC. L'analyse des résultats de la quantification des ARNm viraux (tableau 6), nous a permis de tirer une première conclusion, et peut-être la plus importante, faisant état d'une activité de réplication et de production de virions durant toute la période d'infection, incluant le stade asymptomatique. En effet nous avons montré la présence, en même temps, de transcrits messagers régulateurs et structuraux chez 73% de patients au stade II de l'infection, chez 90% des patients au stade III et chez 92% de patients au stade IV. Cette observation est en accord avec les récents travaux sur la rotation des populations virales (Ho *et al.*, 1995, Wei *et al.*, 1995), montrant que l'infection au VIH-1 n'est pas une infection latente au réveil tardif, mais plutôt une infection qui obéit à un processus dynamique au cours duquel de grandes quantités de particules virales sont relâchées dans la circulation chaque jour.

Les ratio d'épissage, généralement plus élevé durant le stade asymptomatique (moyenne de 6,2±4,8) comparé aux ratios d'épissage durant le stade III et IV (moyenne de 2,7±1,4 et 2,8±1,7 respectivement), témoignent d'une production de virions plus importante durant les stades avancés de l'infection. L'augmentation des transcrits

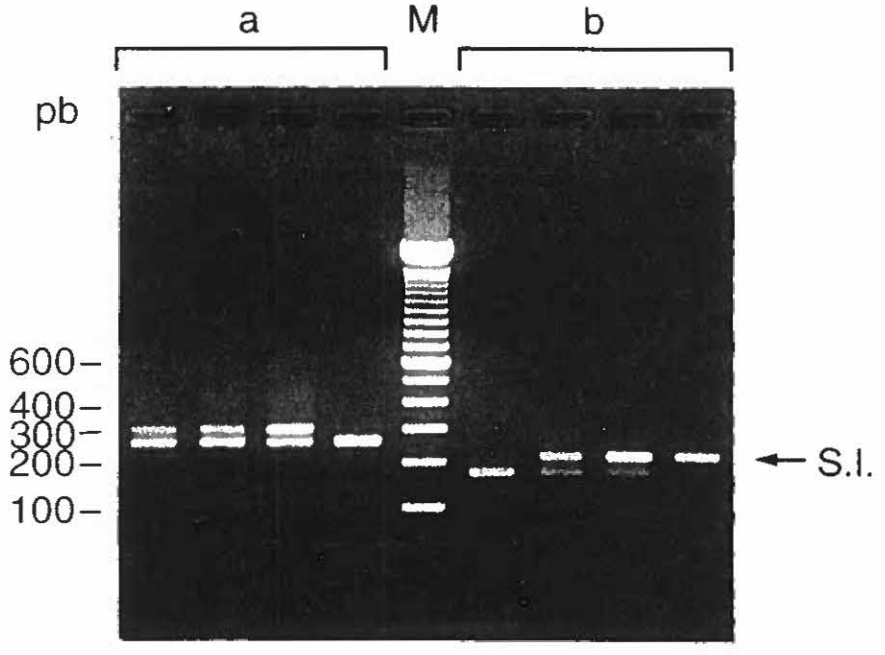
régulateurs et structuraux avec la progression de l'infection est probablement due à l'absence d'un système immunitaire efficace capable de limiter le nombre de cellules infectées, productrices de virus, en circulation.

Figure 37: Séquence du standard interne utilisé comme cible compétitrice pour la quantification, par qc-PCR, des ARNm viraux régulateurs *tat, rev, nef* et structuraux *pol* .

Le standard interne (Pol-TRN-S.I.) contient un insert de 42 nucléotides au niveau de l'exon 5, commun aux 3 gènes régulateurs *tat*, *rev* et *nef*, et un insert de 34 nucléotides dans la séquence du gène *pol* (les séquences en gras). Les séquences des amorces oligonucléotidiques utilisées dans les réactions de RT-qc-PCR sont indiquées sur la séquence du standard interne (séquences soulignées).

L'électrophorégramme (photo du bas) obtenu après migration sur gel d'agarose 1%, montre un exemple d'amplification, par RT-qc-PCR, à partir d'un échantillon clinique et en présence du standard interne (S.I.) des transcrits régulateurs *tat* **(a)** et *rev* **(b)**.

```
                    10         20         30         40         50         60
Pol-TRN-F.O. CCAATTATGT TGACAGGTGT AGGTCCTACT AATACTGTAC CTATAGCTTT ATGTCCACAG
Pol-TRN-S.I. CCAATTATGT TGACAGGTGT AGGTCCTACT AATACTGTAC CTATAGCTTT ATGTCCACAG
                  PolR
                    70         80  PolR1.JOE  100        110        120
Pol-TRN-F.O. ATTTCTATGA GTATCTGATC ATACTGTCTT ACT------- ---------- ----------
Pol-TRN-S.I. ATTTCTATGA GTATCTGATC ATACTGTCTT ACTCTAATCT GCCTCGAGTA TACTCGAGAA
                   130        140        150        160        170        180
Pol-TRN-F.O. CTCGCCGTTG ATAAAACCTC CAATTCCCCC TATCATTTTT GGTTTCCATC TTCCTGGCAA
Pol-TRN-S.I. -------TTG ATAAAACCTC CAATTCCCCC TATCATTTTT GGTTTCCATC TTCCTGGCAA
                   190        200        210        220        230        240
Pol-TRN-F.O. ACTCATTTCT TCTAATACTG TATCATCTGC TCCTGTATCT AATAGAGCTT GGCGCGCCAG
Pol-TRN-S.I. ACTCATTTCT TCTAATACTG TATCATCTGC TCCTGTATCT AATAGAGCTT GGCGCGCCAG
                                          PolF
                   250        260        270        280        290        300
Pol-TRN-F.O. CTAAGCCGAA TTCGGCTTAG GCCCTAGGCC TGGAAGCATC CAGGAAGTCA GCCTAAAACT
Pol-TRN-S.I. CTAAGCCGAA TTCGGCTTAG GCCCTAGGCC TGGAAGCATC CAGGAAGTCA GCCTAAAACT
                                                    04F
                   310        320        330        340        350        360
Pol-TRN-F.O. GCTTGTACCA ATTGCTATTG TAAAAAGTGT TGCTTTCATT GCCAAGTTTG TTTCACAACA
Pol-TRN-S.I. GCTTGTACCA ATTGCTATTG TAAAAAGTGT TGCTTTCATT GCCAAGTTTG TTTCACAACA
                   370        380        390        400        410        420
Pol-TRN-F.O. AAAAGCCTTA GGCATCTCCT ATGGCAGGAA GAAGCGGAGA CAGCGACGAA GACCTCCTCA
Pol-TRN-S.I. AAAAGCCTTA GGCATCTCCT ATGGCAGGAA GAAGCGGAGA CAGCGACGAA GACCTCCTCA
                        02F                              05F
                   430        440        450        460        470        480
Pol-TRN-F.O. AGACAGTCAG ACTCATCAAG TTTCTCTATC AAAGCAACCC ACCTCCCAAC CCCGAGGGGA
Pol-TRN-S.I. AGACAGTCAG ACTCATCAAG TTTCTCTATC AAAGCAACCC ACCTCCCAAC CCCGAGGGGA
                   490        500        510        520        530        540
Pol-TRN-F.O. CCCGACAG-- ---------- ---------- ---------- ---------- GCCCGAAGGA
Pol-TRN-S.I. CCCGACAGCG GTAAATTGCC CGAGTTCTCG AGGCAGATTT CCGTAGTTAG GCCCGAAGGA
                   550        560        570        580        590        600
Pol-TRN-F.O. ATAGAAGAAG AAGGTGGAGA GAGAGACAGA GACAGATCCA TTCGATTAGT GAACGGATCC
Pol-TRN-S.I. ATAGAAGAAG AAGGTGGAGA GAGAGACAGA GACAGATCCA TTCGATTAGT GAACGGATCC
                                          90R
                   610        620        630        640        650        660
Pol-TRN-F.O. TTAGCACTTA TCTGGGACGA TCTGCGGAGC CTGTGCCTCT TCAGCTACCA CCGCTTGAGA
Pol-TRN-S.I. TTAGCACTTA TCTGGGACGA TCTGCGGAGC CTGTGCCTCT TCAGCTACCA CCGCTTGAGA
                                                                52R
                   670
Pol-TRN-F.O. GACTTA
Pol-TRN-S.I. GACTTA
```



Ces résultats suggèrent qu'il pourrait exister un état d'équilibre entre le système immunitaire fonctionnel et la vitesse de production de virions par les cellules infectées. Cet équilibre est rompu avec la détérioration du système immunitaire et l'altération de la fonction des cellules-T, durant les stades avancés de l'infection, comme en témoigne la chute de l'activité ADCC et la dépletion des cellules CD4 aux stades III et IV. Ce bris d'équilibre (absence de système immunitaire fonctionnel) se traduit par la présence, dans la circulation, d'un grand nombre de cellules infectées productrices de virus, ce qui explique l'augmentation du nombre de transcrits détectés durant les stades III et IV. Cet énoncé est supporté par les récents travaux sur la rotation (turnover) de la population virale (Ho *et al.*, 1995, Wei *et al.*, 1995) montrant que le système immunitaire fonctionnel est capable de maintenir la charge virale basse, durant le stade asymptomatique, en éliminant quotidiennement, des milliards de particules virales produites par les cellules infectées.

Les ratio d'épissage relativement élevés chez certains des patients au stade IV (le cas des patients P23 et P31) (tableau 6), indiquant une plus faible production de virions que chez certains patients au stade III de l'infection, pourraient être directement reliés au fait que ces patients étaient sous traitement de drogues antirétrovirales et dont le but était de ralentir l'expression des ARN viraux et la production de nouveaux virions.

L'aboutissement de ce dernier objectif, qui terminait notre projet de recherche, nous a permis de montrer que la réplication virale est active durant tous les stades de l'infection y compris la dite phase "quiescente" (asymptomatique). Cette réplication virale ne semble pas être réprimée par la réponse immunitaire (et la réponse ADCC en particulier). La réponse immunitaire pourrait intervenir, par la suite, pour contrôler la production de virions en détruisant les cellules infectées (réponses ADCC et CTL), ou en éliminant les virus de la circulation (anticorps neutralisants). De tel énoncé plaide en faveur d'une thérapie (combinée ou même une polythérapie) très tôt dans l'infection, vu que la réplication virale est déjà active durant le stade asymptomatique.

Tableau 6: Quantification des ARNm viraux.

Ce tableau montre, chez chacun des patients, le nombre de copies de transcrits viraux des gènes régulateurs et structuraux par 1000 PBMC, ainsi que le ratio d'épissage, en rapport avec le nombre de cellules CD4 et le niveau d'activité ADCC. Les résultats en rouge correspondent aux patients, dont la nature des séquences de certains ou de tous leur quasi-epèces prédisait un phénotype inducteur de syncitia. Les valeurs en bleu correspondent aux moyennes du nombre des cellules CD4, de l'activité ADCC, et du ratio d'épissage pour l'ensemble des patient dans un même stade de l'infection.

Patient	Nbre CD4 (mm^3)	ADCC ± D.S.[a]	Nbre de copies d'ARN[b] tat	rev	nef	pol	Total regulateurs[c]	Ratio reg/pol
1	1010	44.3 ± 2.8	26	48	60	24	134	5,58
2	980	28.6 ± 2.0	145	220	310	60	675	11,25
3	430	38.1 ± 2.1	ND	ND	ND	4	-	-
4	640	9.9 ± 0.4	74	110	167	38	284	9,23
5	1050	27.0 ± 2.5	230	170	213	67	613	9,15
6	1220	40.2 ± 2.5	30	70	28	13	128	9,84
7	700	13.9 ± 0.7	110	92	180	32	382	11,9
8	710	21.4 ± 2.0	18	27	ND	ND	45	-
9	380	13.8 ± 0.9	17	14	72	45	103	2,28
10	975	26.3 ± 1.9	22	31	ND	ND	53	-
11	700	18.8 ± 1.3	54	32	76	17	167	9,52
moyenne	**799 ± 267**	**25,7 ± 11,5**						**6,2 ± 4,8**
12	700	15.2 ± 1.0	104	110	420	144	634	4,40
13	926	26.3 ± 1.1	65	82	112	68	259	3,80
14	735	14.6 ± 0.5	173	183	730	296	1086	3,66
15	210	5.1 ± 0.6	64	ND	57	69	121	1,75
16	220	5.8 ± 0.4	12	36	132	75	180	2,40
17	390	8.0 ± 0.3	123	54	340	123	517	4,20
18	400	22.4 ± 0.9	57	85	95	61	237	3,88
19	360	1.1 ± 0.1	ND	ND	ND	ND	-	-
20	620	1.7 ± 0.2	9	31	29	51	69	1,35
21	595	3.1 ± 0.2	84	42	490	335	616	1,83
moyenne	**515 ± 236**	**10,3 ± 8,9**						**2,7 ± 1,4**
22	21	1.6 ± 0.5	133	210	510	383	853	2,22
23	25	4.7 ± 0.2	18	110	207	57	335	5,87
24	7	1.2 ± 0.2	223	318	620	504	1160	2,30
25	148	17.9 ± 0.5	83	209	407	390	699	1,79
26	28	1.3 ± 0.2	ND	ND	ND	ND	-	-
27	100	4.7 ± 0.2	210	414	596	275	1220	4,43
28	1	1.1 ± 0.4	26	53	44	53	123	2,32
29	2	1.7 ± 0.1	114	70	410	214	594	2,77
30	7	2.3 ± 0.2	240	390	632	387	1320	3,26
31	50	27.8 ± 0.9	113	137	255	89	505	5,60
32	28	6.1 ± 0.2	117	270	402	492	789	1,60
33	30	11.3 ± 0.5	234	310	476	497	1020	2,05
moyenne	**37,25 ± 44**	**6,4 ± 8,1**						**2,8 ± 1,7**

[a]Niveau ADCC en utilisant le ratio E:C de 50:1

[b]Les résultats sont exprimés en nombre de copies par 1000 PBMC

[c]Somme arithmétique des ARNm *tat*, *rev* et *nef*.

ND: non déteminé

DISCUSSION

1- Établissement et caractérisation des cellules cibles pour les tests ADCC

Un certain nombre de paramètres, tels que la radioactivité relâchée spontanée du chrome, la mort des cellules en absence de sérum anti-HIV-1 (bruit de fond) et le niveau d'expression de la gp120/160 à la surface des cellules cibles, peuvent entraver significativement la mesure précise des titres d'anticorps ADCC dans les sérums des individus infectés par le VIH-1. Les deux premiers paramètres peuvent masquer l'activité ADCC, alors que le troisième paramètre, concernant la variabilité du pourcentage des cellules exprimant à leur surface les antigènes viraux, peut être responsable des résultats non reproductibles. Nous avons contourné les limites imposées par ces paramètres en établissant, après transfection par électroporation, de cellules qui expriment de manière stable les antigènes viraux gp120/160 à leur surface.

Les anticorps capables de diriger l'ADCC sont parmi les premiers à apparaître durant l'infection primaire par le VIH-1, précédant l'apparition de tout autre anticorps fonctionnellement actif, incluant les anticorps neutralisants (Goudsmit *et al.*, 1988b; Bolognesi, 1988). Cependant, le rôle précis des anticorps ADCC spécifiques au VIH-1 reste à élucider. L'un des problèmes majeurs rencontrés lors des études visant à évaluer le niveau d'activité ADCC était celui de la reproductibilité, due particulièrement à l'absence de cellules cibles exprimant les antigènes viraux de surface de façon stable avec une densité identique d'une analyse à l'autre.

Deux lignées cellulaires de lymphocytes ont été utilisées lors des expériences d'électroporation. La première lignée, CEM T4 est un sous-clone de lignée CEM à haut niveau d'expression de récepteur CD4. La deuxième lignée, CEM.NKR est dérivée à partir de la lignée CEM par immunosélection, et elle est résistante à la lyse spontanée par les cellules NK. Ces lignées cellulaires ont été transfectées par les vecteurs d'expression rétroviraux pDOLHIV*env* et le pDOLHIV*env*R (plasmide contrôle) qui contiennent les

cadres de lectures ouverts des gènes *tat*, *rev* et *env* de la souche VIH-1 NL4-3.

L'expression de ces cadres de lectures est dirigée par le promoteur du LTR de MuLV. Les glycoprotéines recombinantes exprimées à la surface des cellules transfectées sont capables d'immunoréagir avec les anticorps anti-VIH-1, présents dans un "pool" de sérums de patients séropositifs (Analyse par cytométrie de flux). La maturation et la localisation, dans les cellules, des glycoprotéines recombinantes sont similaires à celles des protéines authentiques du VIH-1. En effet, l'analyse par immunofluorescence en microscopie, a montré la présence des antigènes viraux à la surface et dans le cytoplasme des cellules transfectées.

Le criblage par radioimmunoprécipitation a confirmé l'expression de la gp120 à la surface des cellules transfectées (iodination des protéines membranaires), mais également la présence de la gp160 en quantité relativement importante (marquage métabolique). Une telle présence est probablement due à un clivage inefficace du précurseur gp160 dans les cellules transfectées et dont la cause pourrait être attribuable à une faible expression de la protéine régulatrice Vpu. En effet, la protéine Vpu dont le gène partage le même codon d'initiation que le gène *env* , semble jouer un rôle primordial dans la maturation de la gp160 dans les cellules $CD4^+$, par la déstabilisation des complexes gp160-CD4 formés dans le cytoplasme (Willey *et al.*, 1992; Raja *et al.*, 1994). La formation de ces complexes à l'intérieur des cellules pourrait expliquer d'une part, les résultats d'immunofluorescence en microscopie montrant la présence des antigènes VIH-1 dans le cytoplasme des cellules transfectées et d'autre part, la co-immunoprécipitation de la gp160 et du récepteur CD4 à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-CD4, OKT4.

La co-immunoprécipitation de la gp160 et du récepteur CD4 a confirmé, par contre, l'intégrité fonctionnelle de la glycoprotéine recombinante, vu que la gp160 est capable de fixer le récepteur CD4. En revanche, le clivage incomplet du précurseur gp160 à l'intérieur des cellules semble être suffisant, vu que la majorité des cellules des clones sélectionnés expriment la gp120 à leur surface (analyses par immunofluorescence et par RIA).

L'absence de formation de syncitia par les cellules exprimant la gp120/160, en conditions normales de culture, de même qu'en co-culture avec les cellules Jurkat T CD4+ ou avec les PBMC de donneurs normaux, pourrait être due au fait que les glycoprotéines recombinantes fonctionnelles fixent les récepteurs CD4 (des mêmes cellules) les rendant moins accessibles aux glycoprotéines gp120/160 d'autres cellules, pour la formation de syncitia (Yao *et al.*, 1993). En plus, ces cellules n'ont montré aucune altération mesurable dans le niveau de croissance, et avaient un temps de division similaire à celui des cellules CEM.NKR non-transfectées servant de témoin.

La caractérisation immunobiologique des cellules exprimant les antigènes viraux de surface (en particulier les cellules des clones CEMC2 et CEMG6), a confirmé leur potentiel comme cellules cibles de choix, pour évaluer l'activité ADCC dans les sérums de patients infectés par le VIH-1. En effet, ces cellules ont gardé une résistance à la lyse par les cellules effectrices (PBMC) comparable à celle des cellules contôles CEM.NKR, non transfectées ($p>0,05$). En plus, ces cellules ont montré une susceptibilité significative à la lyse par le mécanisme ADCC ($p\leq0.05$), en présence de sérums d'individus VIH-1 séropositifs, comparée à la lyse en présence de sérums d'individus séronégatifs. À titre indicatif, la radioactivité relâchée spontanée du ^{51}Cr des cellules cibles, en absence de sérum immun, était toujours en dessous de 10%, ce qui donnait une bonne reproductibilité à nos essais.

L'utilisation de ces cellules (en particulier les cellules du clone CEMG6) comme cellules cibles pour déterminer les titres d'anticorps ADCC, dans les sérums des individus infectés par le VIH-1, s'est avérée très judicieuse. En effet, nous avons montré lors de notre étude croisée, en utilisant de telles cellules cibles, une altération de l'activité ADCC (et des titres d'anticorps ADCC) durant les stades avancés de l'infection au VIH-1 (Merzouki *et al.*, 1994a Annexe A).

2- Réponse ADCC à différents stades de l'infection au VIH-1

Les résultats des tests ADCC ont montré que 56% de l'ensemble des patients de notre cohorte croisée avaient des anticorps anti-gp120/160 spécifiques capables de diriger une activité ADCC. Ce pourcentage de 56% des sérums de patients, à différents stades de l'infection, se compare bien à un pourcentage de 60% rapporté par Ljunggren *et al.* (1989 a,b), mais se compare plus au moins bien, à un pourcentage aussi élevé que 80% rapporté par Ojo-Amaize *et al.* (1989) ou à des pourcentages aussi bas que 40% et 43% rapportés par Ljunggren *et al.* (1987); Böttiger *et al.* (1988).

La différence à l'intérieur de ces diverses cohortes, entre les pourcentages de sérums capables de diriger une activité ADCC anti-VIH-1, pourrait être due au degré de parenté antigénique entre les antigènes cibles et les antigènes correspondant des virus infectants. Ainsi, la présence d'une activité ADCC aussi variable chez les patients à l'intérieur d'un même stade de l'infection (de 9,9±0,4 à 44,3±2,8 chez les patients au stade II), peut s'expliquer par la présence, chez les patients, de souches de VIH-1 présentant des immunogénicités différentes, suscitant des titres d'anticorps plus ou moins élevés.

Le niveau d'expression des antigènes viraux à la surface des cellules infectées, qui dépend en fait du phénotype biologique de ou des souche(s) infectante(s), peut influencer l'immunogénicité virale (souches SI versus souches NSI). De son côté la diversité génétique virale contrôle, au moins en partie, l'expression du phénotype biologique et peut donc influencer, directement ou indirectement l'immunogénicité virale et par conséquent, le niveau de production d'anticorps ADCC spécifiques à différentes souches du VIH-1 (Cornelissen *et al.*,1995; de Jong *et al.*, 1992a,b; Fouchier *et al.*, 1992; Koot *et al.*, 1993; Ljunggren et *al.*, 1989a; Nielsen *et al.*, 1993).

La différence, parmi les diverses cohortes, entre les pourcentages de sérums présentant une activité ADCC anti-VIH-1, pourrait également être causée par les mêmes facteurs responsables du phénomène de la réactivité "prozone". En effet, différentes

activités lytiques sous-optimales "prozone" ont été mises en évidence lors des tests ADCC, à la dilution 10^{-2} des sérums. Il s'agit particulièrement d'un certain nombre de sérums de patients au stade II de l'infection. L'origine du phénomène de la réactivité "prozone" n'est pas reliée à la densité des antigènes à la surface des cellules cibles, car les mêmes cellules cibles, avec la même densité d'antigènes, ont été utilisées dans tous les essais ADCC. Ce phénomène, déjà rapporté par d'autres auteurs (Lyerly *et al.*, 1987 a,b; Tyler *et al.*, 1990b) pourrait être dû à i) la présence dans les sérums de faibles quantités de substance inhibitrices capables d'interagir avec les récepteurs Fc, ii) la présence d'anticorps bloquants et/ou iii) la formation de complexes immuns ou d'agrégats d'immunoglobulines.

Par contre, la chute de l'activité ADCC durant les stades avancés de l'infection pourrait, quant-à-elle, s'expliquer soit i) par la disparition pure et simple des anticorps ADCC à la suite des perturbations graduelles de l'immunité cellulaire et humorale, comme en témoigne la déplétion des cellules CD4; ii) par la perte de reconnaissance, par les anticorps, des séquences des épitopes ADCC suite à des changements (mutations) dirigés par les antigènes viraux en réponse à une pression sélective exercée par le système immunitaire fonctionnel, durant le stade asymptomatique de la maladie, comme c'était le cas pour les anticorps neutralisants et pour la réponse CTL (McKeating *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1989a; Walker et Plata, 1990). Enfin iii) une des raisons qui pourrait être considérée pour expliquer la chute de l'activité ADCC, durant les stades avancés de l'infection, serait les interactions complexes du VIH-1 avec les différentes cellules hématopoïétiques, et la capacité du VIH-1 à infecter les cellules NK/K, qui sont des cellules effectrices dans la réaction de l'ADCC. En effet, il a déjà été montré que la fonction de ces cellules NK/K est altérée suite à l'infection par le VIH-1 (Ahmad et Menezes, 1995, 1996; Brenner *et al.*, 1989; Chehimi *et al.*, 1991). La chute de l'activité ADCC pourrait donc être une conséquence indirecte, du fait que l'effet des anticorps ADCC est optimal durant le stade asymptomatique, et que ces anticorps sont capables d'activer les cellules NK/K, et peut-être même les cellules phagocytaires du système réticuloendothélial. Cependant, dans la

présente étude, il n'est pas nécessaire d'invoquer la détérioration de la fonction des cellules effectrices pour expliquer la chute de l'activité ADCC, car nous avons utilisé les cellules effectrices (PBMC) de donneurs normaux séronégatifs.

En résumé, la présence d'une réponse ADCC précoce pourrait contribuer au maintien de l'état asymptomatique et du compte normal des cellules $CD4^+$, en limitant la réplication du virus après destruction des cellules infectées activées (productrices de virus). La participation de l'ADCC dans le maintien de l'état asymptomatique est aussi supporté, indirectement, par le fait que les anticorps ADCC associés à l'infection au VIH-2 ont une fréquence et un spectre de réactivité plus large, et des titres plus élevés, que ceux associés à l'infection au VIH-1 (Ljunggren *et al.*, 1989a; Norley *et al.*, 1990; Von Gegerfelt *et al.*, 1993). Ceci est encore plus intéressant depuis qu'il a été établi que le VIH-2 est moins pathogénique, cause moins de mortalité, et avec un temps de latence plus long, que le VIH-1 (Monteiro-Grillo *et al.*, 1993; Romieu *et al.*, 1990). Les niveaux d'activité ADCC élevés, chez individus infectés par le VIH-2, peuvent être s'expliquer par de nombreux facteurs, tels qu'une forte immunogénicité du VIH-2, un haut niveau d'expression des antigènes viraux à la surface des cellules cibles, et peut-être la présence d'épitopes cibles très conservés.

Si l'implication prédominante (ou probable) de la réponse ADCC dans le maintien de l'état asymptomatique est confirmée, les nouvelles thérapies devraient plaider en faveur de l'utilisation des anticorps induisant l'ADCC (monoclonaux ou autres) pour une immunothérapie passive.

3- Diversité génétique virale et la réponse ADCC

La grande variabilité des séquences (en particulier celles de la région V3) accompagnée de peu de polymorphisme de taille ont été les faits dominants des analyses des séquences des régions de l'enveloppe. Toutes les insertions et/ou les délétions dans le gène *env* sont des multiples de 3 nucléotides, ce qui permet le maintien du cadre de lecture en aval. Il n'existe toujours pas d'explication satisfaisante pour justifier les hauts niveaux de mutations dans certaines régions du gène de l'enveloppe, dont la région V3 (fig. 39, 40, 41) par rapport à des régions comme C4 et C5 plus conservées (fig. 42, 43, 44, 45, 46, 47). Une des explications pourrait être simplement l'absence de contraintes fonctionnelles, qui seraient capables de limiter la fréquence et le taux de variabilité dans des régions, tel que le site de fixation de la gp120 au récepteur CD4 (dans la région C4), qui ne serait pas soumis à des contraintes rigoureuses pour le maintien de sa séquence en acides aminés.

Le ratio de substitutions synonymes au substitutions non-synonymes (Ks/Ka) pour les séquences de la boucle V3 était de l'ordre de 1, indiquant qu'en moyenne la survie d'une mutation de remplacement (non-silencieuse) est pratiquement aussi probable que la survie de mutation synonyme (silencieuse). D'une manière générale, cela signifie que la pression de sélection favorise aléatoirement les changements dans cette région.

L'absence de codons "stop" fréquents et la conservation d'un certain nombre d'acides aminés, incluant les deux résidus cystéines impliqués dans la formation de la boucle V3 (fig. 33, 34, 35) indique cependant, que l'étendue des changements est limitée. Ces changements dirigés par les antigènes viraux répondraient à un besoin d'adaptation du virus à son environnement immunitaire hôte. Connaissant l'implication de la boucle V3 dans l'induction de la réponse immunitaire anti VIH-1, humorale et cellulaire, il est légitime de croire que la force sélective positive, exercée par le système immunitaire, confère un avantage sélectif aux séquences mutées, qui représentent en fait, les séquences du VIH-1

les plus adaptées à l'environnement hôte. Un tel scénario expliquerait, au moins en partie, l'altération de la réponse immunitaire dont l'ADCC. Ainsi chez certains individus infectés, les anticorps ADCC rencontrés dans le sérum et dirigés contre les isolats viraux "précoces" seraient incapables de reconnaître les isolats viraux "tardifs" présents au moment de la collecte du sérum. Le même scénario a déjà été dévoilé dans le cas de la perte du pouvoir neutralisant des anticorps et de la réponse CTL (McKeating *et al.*, 1989; Pantaleo *et al.*, 1990; Phillips *et al.*, 1991; Walker et Plata, 1990).

La divergence génétique entre les différents groupes de ¨quasi-espèces¨ n'était pas restreinte uniquement à la boucle V3, mais répartie sur les régions avoisinantes et sur d'autres séquences de la gp120. En absence d'échantillons séquentiels, il n'est pas connu à quel stade les génomes ont divergé, ou quels facteurs sont responsables de leur sélection ou de leur maintien. Il existe au moins deux mécanismes possibles pour l'origine de la diversité: i) elle était présente dans la population de virus infectante et a persisté tout le long de l'infection. Cette hypothèse est supportée par le fait que les séquences issues des échantillons de patients asymptomatiques montraient déjà une diversité intrapatient et interpatients importante; ii) les différentes ¨quasi-espèces¨ ont évolué à partir de séquences virales matrices primaires en réponse, soit aux différentes pressions sélectives exercées par la réponse immunitaire humorale et cellulaire, soit au besoin d'adaptation du virus pour pouvoir se répliquer dans différentes types cellulaires et acquérir un spectre d'hôte plus élargi. Cette hypothèse est en partie supportée par l'émergence de ¨quasi-éspèces¨ de phénotype inducteur de syncitia (SI), ¨cellules-T tropique¨ avec le potentiel de se répliquer plus rapidement. De telles ¨quasi-espèces¨ auraient évolué à partir de ¨quasi-espèces¨ de phénotype non-inducteur de syncitia (NSI), ¨macrophage-tropique¨ (Chesebro *et al.*, 1992; Cornelissen *et al.*, 1995; de Jong *et al.*, 1992a,b; Donaldson *et al.*, 1994; Fouchier *et al.*, 1992; Koot *et al.*, 1993; Kuiken *et al.*, 1995; Pantaleo *et al.*, 1993b).

L'absence de corrélation entre la diversité génétique virale (en particulier, celle de la boucle V3) et la chute des titres d'anticorps ADCC et du compte des cellules CD4 (fig. 38) souligne, en fait, un des points les plus intéressants de cette recherche, qui tend a démontrer que le niveau de la diversité génétique virale ne semble pas être la cause directe de la chute des titres d'anticorps ADCC ni celle des cellules CD4, mais qu'en fait le système immunitaire pourrait s'accommoder de la présence de virus divergents durant le stade asymptomatique. Cet énoncé est en partie supporté par les résultats de la variabilité génétique des séquences C4 et C5 montrant que ces deux régions, renfermant deux cibles potentielles pour les anticorps ADCC, sont demeurées relativement bien conservées, durant tous les stades de l'infection, alors que l'activité ADCC a chuté dramatiquement. La variabilité génétique limitée des région C4 et C5 a également suggéré que les déterminants antigéniques majeurs pour l'activité ADCC pourraient se retrouver au niveau de la boucle V3, et par conséquent les mutations dirigées par cette région seraient au commande du devenir de la réponse ADCC.

En plus, l'analyse des relations phylogénétiques entre les séquences des différentes ¨quasi-espèces¨ a montré que, indépendamment du stade de l'infection, du compte CD4 ou du niveau de l'activité ADCC, les ¨quasi-espèces¨ VIH-1 ne semblaient pas suivre une direction évolutionnaire précise, capable de les mener d'un état de ¨quasi-espèces¨ "sensible" où les virus sont incapables d'échapper au contrôle d'un système immunitaire fonctionnel, à un état de ¨quasi-espèces¨ "muté" où les virus sont plus adaptés à l'environnement hôte et capables d'éviter un système immunitaire qu'ils (virus) vont affaiblir avec le temps. (Asjo *et al.*, 1986; Ferbas *et al.*, 1995; Miedema *et al.*, 1990; Pantaleo *et al.*, 1993a,b; Rinaldo *et al.*, 1995).

L'absence de direction évolutionnaire évidente menant des ¨quasi-espèces¨ précoces, moins adaptées à l'environnement hôte, à des ¨quasi-espèces¨ tardives plus adaptées et plus cytopathogéniques, peut s'expliquer par le fait que, durant la progression

de l'infection, les séquences du VIH-1 ne varient pas en masse, mais subissent plutôt des mutations ponctuelles, dirigées par les antigènes viraux en réponse aux pressions sélectives du système immunitaire. Ces mutations qui sont nécessaires à la survie et à l'adaptation du virus à son environnement hôte peuvent varier (par leur nature et leur localisation) d'un système immunitaire hôte à un autre. Ainsi, les antigènes viraux dirigent des mutations pour le besoin de survie du virus, du moins jusqu'à l'émergence d'une forme de virus mieux adaptée à l'environnement hôte (Back *et al.*, 1993, 1994; Chesebro *et al.*, 1991; Lukashov *et al.*, 1995). Cette forme de virus n'aura plus besoin de diriger fréquemment de nouvelles mutations, en réponse aux pressions sélectives de l'hôte (donc elle change moins). Cependant, et vu que la boucle V3 contient les déterminants antigéniques pour la cytopathogénicité, l'infectivité et le tropisme cellulaire (fig. 33, 34 35) (Chesebro *et al.*, 1992; de Jong *et al.*, 1992 a,b; Fouchier *et al.*, 1992; Koot *et al.*, 1993; Schuitemaker *et al.*, 1992), l'adaptation du virus à son environnement hôte, qui découle d'une sélection positive et dont le résultat se traduit par des effets bénéfiques au niveau de la fonctionnalité biologique virale, peut donc être dirigée par des changements à l'intérieur de la boucle V3 ou par des changements compensatoires à l'extérieur de la boucle V3 (Back *et al.*, 1993, 1994). Nous avons rapporté des changements à l'intérieur de la boucle V3 mais également à l'extérieur de celle-ci (fig. 18, 21, 22, et 23).

Cette absence de corrélation entre le taux de variabilité et l'activité ADCC n'exclut pas, par contre, l'émergence de "quasi-espèces" ayant dirigé des mutations spécifiques (peut-être ponctuelles), qui pourraient leur conférer une meilleure adaptation à leur environnement hôte et, par conséquent, la capacité de causer plus de dommage au système immunitaire hôte. Goudsmit *et al.* (1990) ont montré que la variabilité la boucle V3, était capitale pour la survie du VIH-1 et en particulier, la variabilité des résidus amino-acides entourant la séquence GPGR (fig. 33, 34 et 35). Ainsi, les changements du côté amine (à gauche de la séquence GPGR), permettraient au virus d'échapper aux anticorps, alors que les changements du côté carboxyl lui permettraient d'échapper aux cellules T-cytotoxiques

$CD8^+$. Les points de variations "hot spots" dans nos "quasi-espèces" sont localisés dans les régions entourant le motif GPGR. Ces variations sont identiques à celles déjà rapportées pour les souches Nord-Américaines (LaRosa *et al.*,1990a,b), et les souches Européennes (Goudsmit *et al.*, 1989; Wolfs *et al.*, 1990). Des changements fréquents se sont produits, durant le stade IV de l'infection, à la position 13 (H, histidine); cette position a été impliquée dans l'émergence de mutants résistants à la neutralisation par des anticorps spécifiques à la boucle V3 (McKeating *et al.*, 1989). Des changements fréquents ont également eu lieu à la position 11 (S, sérine) et à la position 25 (E, acide glutamique), ces deux positions ont été impliquées dans l'émergence du phénotype inducteur de syncitia à partir du phénotype non-inducteur de syncitia (de Jong *et al.*, 1992a; Fouchier *et al.*, 1992, Groenink *et al.*, 1993). Le résidu tyrosine (Y) à la position 21, considéré comme étant le déterminant majeur pour la réponse CTL (Takahashi *et al.*, 1989a) est demeuré dans nos séquences, relativement bien conservé. Nos résultats ont montré que les substitutions de ces positions critiques de la boucle V3 ne signifiait pas nécessairement une augmentation de la diversité génétique virale. Ceci renforce notre énoncé selon lequel la diversité génétique virale n'est pas responsable de la chute de l'activité ADCC (et des titres des anticorps ADCC) et de la déplétion des cellules CD4.

Les travaux de Delwart *et al* . (1994) et ceux de Lukashov *et al.* (1995) qui ont montré qu'une complexité plus importante des "quasi-espèces" du VIH-1 est associée à une progression lente de l'infection et à une chute lente et limitée du nombre de cellules $CD4^+$, sont en concordance avec nos résultats. Cependant, ces travaux ainsi que le notre, contredisent le modèle de Nowak *et al.* (1990, 1991, 1995) selon lequel une population de VIH-1 hautement divergente, plutôt qu'une déplétion spécifique des cellules immunitaires, serait responsable de la défectuosité du système immunitaire et de la progression de l'infection.

Nos résultats, qui ont montré qu'il n'existe aucune preuve de la présence d'un seuil de diversité virale correlée avec la déplétion profonde des cellules CD4 et celle de la détérioration du système immunitaire (dont l'ADCC) chez les patients durant les stades avancés de l'infection (fig. 38), pourraient s'expliquer comme suit: l'effet de la réponse immunitaire fonctionnelle contrôle l'évolution intra-hôte du virus qui va diriger des mutations orientées et/ou aléatoires, afin d'échapper aux pressions exercées par le système immunitaire, du moins jusqu'à l'émergence d'une forme de virus adaptée à l'environnement immunitaire hôte. Cette forme de virus adaptée n'aura plus besoin de diriger fréquemment de nouvelles mutations en réponse aux pressions sélectives de l'hôte, et elle est, par conséquent, moins soumise aux changements évolutifs. En résumé, les différences fonctionnelles entre les virus, chez les individus à différents stades de l'infection, peuvent être interprétées par le fait selon lequel un variant de virus ne change pas rapidement à cause de son adaptation optimale à l'environnement immunitaire de l'hôte, sous cet état, les virus (adaptés) causent plus de dommages à l'hôte que les virus moins adaptés.

Nos résultats sont également supportés par des travaux, sur modèle animal (Chez l'humain et chez le chimpanzé), de Wolfs *et al.* (1990) et de Nara *et al.* (1990) qui ont montré que la réplication du VIH-1 en absence d'anticorps neutralisants fonctionnels conduit à l'expansion clonale d'un (seul) génotype (V3) dominant, plutôt que la divergence à partir des séquences matrices des "quasi-espèces" initiales (Goudsmit *et al.*, 1990). Il est, par contre, évident que les forces sélectives sont impliquées, à cause en particulier du fait que le taux des substitutions non-synonymes pour la région V3 est plus élevé (le ratio Ks/Ka est de l'ordre de 1), que celui pour les régions C4 et C5 (ratio Ks/Ka de l'ordre de 6,4). Ces forces sélectives sont représentées, notamment par les hauts niveaux d'anticorps neutralisants, d'anticorps ADCC, et d'activité CTL, dirigés contre la région V3 tout au long de l'infection (Broliden *et al*, 1990, 1991, 1992; Forthal *et al.*, 1995; Javaherian *et al.*, 1989; LaRosa *et al.*, 1990; Liou *et al.*, 1989; Pantaleo *et al.*, 1990; Walker et Plata, 1990).

Comme nous l'avions mentionné auparavant, l'absence de corrélation entre le taux de variabilité et l'activité ADCC n'exclut pas, par contre, l'émergence de "quasi-espèces" ayant dirigé des mutations spécifiques qui pourraient leur conférer une meilleure adaptation à leur environnement hôte et, par conséquent, la capacité de causer plus de dommage au système immunitaire hôte. En effet, Wolfs *et al.* (1991) et Kliks *et al.* (1993) ont montré que, durant la progression de l'infection au VIH-1, une substitution non-synonyme fixe, qui a lieu à la position 13 (I**H**IGPGRAF) de la boucle V3, pourrait avoir un impact direct sur les effets biologiques des anticorps, entraînant soit une sensibilité, soit une résistance à la neutralisation.

Nos résultats ont montré qu'un changement d'acide aminé à la position 13 (histidine 13) dans la boucle V3, s'est produit chez un grand nombre d'individus infectés (12 sur 33). Cependant, et malgré le fait qu'un tel changement pourrait entraîner une résistance à la neutralisation, ce changement ne semble pas avoir une grande signification biologique sur l'activité des anticorps ADCC, en particulier depuis que les individus au stade asymptomatique (patients P02, P03, P04 et P05) ont montré des changements à la position 13 presque aussi fréquemment que les individus au stade IV de l'infection (P22, P23, P24, P25, P26, P27 et P28). En plus, aucune préférence pour un acide aminé en particulier à la position 13 n'a été constatée (histidine pour proline, histidine pour arginine, histidine pour asparagine, histidine pour sérine et histidine pour tyrosine. Ces changements à la position 13 ont été, par contre, accompagnés chez les patients P22, P25, P27 et P28 au stade IV de l'infection, de deux autres substitutions d'acides aminés à la position 11 (K**S**IHIGPG) pour sérine contre arginine et à la position 25 (G**E**IIGDIR) pour acide glutamique contre lysine. Or, il a été clairement démontré que la présence d'un acide aminé **basique** (arginine ou lysine) à l'une des deux positions 11 et 25 de la boucle V3, est associée au phénotype biologique SI (inducteur de syncitia) (Cornelissen *et al.*, 1995; de Jong *et al.*, 1992; Donaldson *et al.*, 1994; Fouchier *et al.*, 1992; Kuiken *et al.*, 1995).

Il semble que les souches SI, ou souches tardives, ne sont pas reconnues par les différentes composantes du système immunitaire (Arendrup *et al.*, 1992; McKeating *et al.*, 1989; Nara *et al.*, 1990; Reitz *et al.*, 1988). Dans notre étude l'apparition de telles souches (SI) chez les patients P22, P25, P27 et P28 était souvent accompagnée d'une profonde déplétion des cellules CD4 et (sauf le patient P25) d'une chute importante des titres d'anticorps ADCC. En plus des patients P22, P25, P27 et P28, six autres patients (P01, P15, P21, P29, P32, et P33) au stade II, III et IV de l'infection, montraient des quasi-espèces dont la nature des séquences prédisaient un phénotype SI. L'apparition des séquences SI était généralement associée (exception faite pour le patient P01) à un compte CD4 et des titres d'anticorps ADCC lourdement altérés.

Les travaux de Cheng-Mayer *et al.* (1988), Fenyö *et al.* (1988) et Tersmette *et al.* (1989), ont montré qu'environ la moitié des individus qui progressent vers le SIDA, voient apparaître des virus ayant une vitesse de réplication plus élevée et un phénotype plus cytopathogénique. Nos résultats ont montré que 58% des patients (7 sur 12), au stade IV de l'infection, avaient des quasi-espèces dont les séquences prédisaient un phénotype SI. À l'exception du patient P25, l'apparition de souches SI était accompagnée d'une chute des titres d'anticorps ADCC et d'une profonde déplétion des cellules CD4, caractéristique au stade SIDA. Les patients P15 et P21 qui montraient également des séquences SI avaient des compte CD4 faibles mais une activité ADCC très altérée.

Il est, cependant, très difficile d'attribuer la perte de l'activité ADCC et des cellules CD4, à la seule apparition de souches SI. En effet, un grand nombre de patients au stade III et IV de l'infection, dont l'activité ADCC était lourdement altérée, montraient des "quasi-espèces" dont les séquences prédisaient un phénotype non-inducteur de syncitia.

L'apparition de souches SI a été associée à la perte accélérée des cellules $CD4^+$ et à la progression de la maladie (Koot *et al.*, 1993; Nielsen *et al.*, 1993; et Roos *et al.*, 1992). Or, nos résultats semblent démontrer que les individus infectés avec des souches dont les

séquences indiquent un phénotype NSI peuvent également voir, avec le temps, la chute de leur cellules $CD4^+$ et la progression concomitante vers la maladie (c'est le cas de la majorité des patients au stade III et IV de l'infection). Cette observation est supportée par les travaux de Richman et Bozzette, (1994) qui ont montré, chez des patients infectés exclusivement avec des souches NSI, un déclin du nombre de cellules CD4 et la progression de l'infection vers le stade SIDA.

Il a été montré que, malgré un phénotype plus agressif *in vitro*, les souches SI "cellules-T tropique" se transmettent moins efficacement après contact sexuel que les souches NSI "macrophage tropique"(Roos *et al.*, 1992 et Zhu *et al.*, 1993). Ceci est du au fait que les macrophages seraient les premières cellules infectées au niveau de la barrière mucosale, en cas de transmission sexuelle, et que ces cellules "réservoirs" (macrophages) infectées sont responsables de la dissémination systémique du virus retrouvé dès l'infection primaire (Zhu *et al.*, 1993). La présence, chez le patient P01 asymptomatique, de "quasi-espèces" (P01.1 et P01.3) dont les séquences prédisaient le phénotype SI, semble en contradiction avec les propos de Roos *et al.* (1992) et Zhu *et al.* (1993), mais pourrait s'expliquer par une transmission de virus autre que sexuelle. En effet, la majorité des patients de notre cohorte étaient des utilisateurs de drogues injectables. Ainsi, les souches de virus de phénotype SI auraient pu être déposées directement dans la circulation périphérique. La présence de souches SI, durant le stade asymptomatique en même temps qu'une réponse immunitaire fonctionnelle, supporte le fait que la réponse immunitaire est capable d'éradiquer ou de supprimer les souches (SI), plus cytopathogéniques, tôt dans l'infection. Dans une telle situation, la réponse ADCC, qui constitue la première composante immune active après l'infection au VIH-1, est la mieux désignée pour éradiquer les souches SI en détruisant les cellules infectées productrices de virus.

Les patients, au stade III et IV de l'infection, qui ont vu apparaître les souches SI parmi les populations de "quasi-espèces" provirales avaient également des ratio d'épissage parmi les plus bas, indiquant une production active de virions par les cellules infectées.

Cependant, de tels ratio d'épissage ne pourraient être attribués uniquement et spécifiquement à l'apparition de souches SI, car de nombreux patients à différents stades de l'infection avec des séquences qui prédisaient le phénotype NSI, présentaient des ratio d'épissage similaires (tableau 6 et fig. 38). Ceci pourrait suggérer que l'acquisition d'une certaine vitesse de réplication par les ¨quasi-espèces¨ présentes, chez un patient donné, ne dépendrait pas uniquement de l'apparition de résidus amino-acides basiques à la position 11 et/ou 25 de la boucle V3.

En résumé, puisque le taux de diversité génétique virale est très peu différent en fonction du stade de l'infection, on peut penser que le déclin de l'activité ADCC (et des titres d'anticorps ADCC), et celui des cellules CD4, pourraient être reliés à la nature (phénotype biologique) de certaines ¨quasi-espèces¨ présentant des mutations (des fois ponctuelles) critiques à l'intérieur des régions fonctionnelles des glycoprotéines de l'enveloppe (dont les épitopes ADCC). La confirmation, sans équivoque, d'une telle hypothèse pourrait être d'un intérêt capital dans la lutte contre l'infection au VIH-1. En effet, la mise au point d'un vaccin anti-VIH-1 efficace, ou le développement de stratégies d'immunothérapie passive utilisant des anticorps capables de diriger l'ADCC, doit tenir compte de l'émergence de telles ¨quasi-espèces¨.

4- Niveaux de transcription des ARNm viraux

Le cycle de réplication du VIH-1 peut être divisé en deux phases distinctes, une phase précoce (régulatrice) et une phase tardive (structurale). Durant la phase précoce, l'expression des ARNm régulateurs a épissage multiple (*tat*, *rev* et *nef*) est prédominante, par rapport à l'expression des ARNm non-épissés qui est faible ou quasiment absente (Robert-Guroff *et al.*, 1990). Durant le stade tardif, les proportions des ARNm non-épissés augmentent de façon très marquée, ce qui est caractéristique d'une production active de virions (Michael *et al.*, 1995). Les mécanismes contrôlant le passage d'une infection latente à une infection active demeurent encore largement inconnus. Certains des candidats les plus plausibles pour étudier un tel processus sont les gènes viraux régulateurs *tat* et *rev*. Le produit du gène *tat* agit comme transactivateur de l'expression génique, augmentant la production des ARNm viraux (Feinberg*et al.*, 1991; Muesing *et al.*, 1987), alors que le produit du gène *rev* fonctionne comme régulateur différentiel de la production de virions, semble-t-il en modulant l'épissage des ARNm ou en facilitant l'exportation des transcrits structuraux du noyau vers le cytoplasme pour leur traduction (Arrigo *et al.*, 1989; Feinberg *et al.*, 1986). Un niveau d'expression seuil de la protéine Rev semble être requis pour le transport des ARNm non-épissés à partir du noyau et permettre le passage à une infection productive (Pomerantz *et al.*, 1992).

Pour l'étude de la transcription, *in vivo*, du VIH-1 nous avons utilisé la technique de RT-qc-PCR pour l'amplification sélective et la quantification differentielle des transcrits à épissage multiple (*tat*, *rev* et *nef*) et des transcrits non-épissées (*pol*), directement dans les PBMC. Cette technique comporte plusieurs modifications qui ont amélioré la fiabilité du RT-qc-PCR, permettant la quantification des transcrits peu abondants (Merzouki *et al.*, 1994b). Cette approche assure que la concentration du compétiteur interne (standard interne) dans les réactions d'amplification demeure constante, ce qui permet des comparaisons directes des niveaux d'expression relatifs de chacunes des cibles amplifiées.

L'utilisation des amorces fluorescentes, en plus d'avoir permis d'éliminer le besoin de la radioactivité, a fourni un système de détection plus sensible sur un balayeur de gènes (Gene Scanner d'Applied Biosystems), que l'analyse des autoradiogrammes (Porcher *et al.*, 1992). Finalement, la séparation sur gel de séquençage des molécules d'ADN simple brin, en utilisant un séquenceur d'ADN automatique, a permis: d'une part, d'éliminer les problèmes associés à la formation d'hétéroduplex, et, d'autre part la collection et l'analyse automatique de plusieurs échantillons à la fois (Merzouki et al., 1994b AnnexeA).

Dans cette étude, l'analyse qualitative et quantitative de la transcription des gènes *tat, rev,nef* et *pol*, directement dans les PBMC, a montré l'existence de niveaux significatifs de transcrits régulateurs chez la majorité des patients durant tous les stades de l'infection (avec en moyenne des niveaux d'expression d'environ 2,3 fois plus important durant les stades III et IV que durant le stade II de l'infection). L'augmentation du nombre total de transcrits régulateurs, durant les stades avancés de l'infection, est influencé, entre autres, par une augmentation importante des transcrits *rev* par rapport aux transcrits *tat* . Ces résultats sont en accord avec les travaux, *in vitro,* de Pomerantz *et al.* (1992) et de Seshamma *et al.* (1992) et avec d'autres de nos travaux, *in vivo,* (Michael *et al.*, 1995), montrant une augmentation de l'expression des transcrits *rev* par rapport à celle des transcrits *tat*, durant la transition vers une infection productive. Les hauts niveaux de transcrits régulateurs observés dans notre étude sont consistants avec d'autres études, *in vivo,* (Patterson *et al.*, 1993; Seshamma *et al.*, 1992) montrant des niveaux élevés de transcrits régulateurs dans les PBMC. De tels résultats pourraient avoir des implications majeures dans la compréhension de la pathogenèse associée à l'infection au VIH-1, en particulier depuis qu'il a été montré que les protéines virales régulatrices sont toxiques pour les cellules, en altérant la perméabilité cellulaire après interaction avec les canaux K^+ (Giulian *et al.*, 1990; Werner *et al.*, 1991; Pulliam *et al.*, 1991). Il est donc concevable que de tels mécanismes indirects, qui prennent place en absence de production complète de virions, peuvent compter pour beaucoup dans la pathogenèse précoce du VIH-1.

Comme c'était le cas pour les transcrits régulateurs, les transcrits structuraux ont été détectés chez la majorité des patients, durant tous les stades de l'infection, mais cette fois-ci avec des niveaux d'expression beaucoup plus importants durant les stades III et IV que durant le stade II (asymptomatique), indiquant une production plus importante de virions durant les stades avancés de l'infection. Dans le cycle de réplication du VIH-1, l'expression des transcrits structuraux (ou transcrits tardifs) témoigne de la production de virions progéniture. Or, fait très intéressant, nous avons montré des niveaux d'expression de tels transcrits à des niveaux relativement importants et ce durant la phase asymptomatique de l'infection, montrant ainsi que la réplication virale est active et persistante tout le long de l'infection, y compris la dite phase quiescente (période de latence ou asymptomatique).

Ces résultats, qui semblent en contradiction avec les concepts usuels expliquant la pathogenèse du VIH-1, sont en accord avec les récents travaux de Ho *et al.*, (1995) et Wei *et al.*, (1995), sur la dynamique de l'infection au VIH-1 et sur la rotation de la population virale. Ces travaux ont, en effet, montré que l'infection au VIH-1 n'est pas une infection latente au réveil tardif, mais plutôt une infection qui obéit à un processus dynamique au cours duquel jusqu'à 10 milliards de particules virales sont relâchées dans la circulation chaque jours. Un nombre équivalent de virus est éliminé par le système immunitaire qui peut compter sur une réponse ADCC et une réponse CTL intactes, au moins durant le stade asymptomatique de l'infection, pour éliminer les cellules infectées activées productrices de virus. La chute de la réponse ADCC, probablement comme celle de la réponse CTL (Autran *et al.*, 1991, Carmichael *et al.*, 1993; Hoffenbach *et al.*, 1989; Pantaleo *et al.*, 1990) fait suite à l'altération de la fonction des cellules-T $CD4^+$ et la détérioration du système immunitaire, et ce à cause d'événements encore mal définis.

Cependant, et à l'exception du fait montrant une réplication virale à tous les stade de l'infection, l'analyse des niveaux de transcription des ARNm viraux chez chacun des patients ne semble pas montrer une relation directe entre la vitesse de réplication des virus et

la chute de l'activité ADCC (et des titres d'anticorps ADCC) et du nombre de cellules CD4 (tableau 6). En effet plusieurs patients (P01, P09, P12, P13, P14, P18, et P25) dont la réponse ADCC semblait intacte et qui avaient un nombre de cellules CD4 normal, montraient des niveaux de transcription et des ratios d'épissage très similaires à ceux de patients (P15, P16, P17, P19, P20, P21 et le reste des patients au stade IV) dont la réponse ADCC et le compte CD4 étaient lourdement altérés. De même, les patients chez lesquels ont été isolées des "quasi-espèces" dont les séquences semblaient prédire un phénotype SI, avaient effectivement des ratios d'épissage parmi les plus bas, indiquant une plus grande production de virions (tableau 6). Cependant, ces ratios étaient très similaires aux ratio d'épissage présentés par la majorité des patients au stades III et IV de l'infection et dont les séquences des "quasi-espèces" prédisaient un phénotype NSI (tableau 6).

CONCLUSIONS

Nous avons établi au cours de ce travail des cellules qui expriment de façon stable les antigènes de surface du VIH-1 NL4.3 dont la caractérisation immunobiologique a confirmé leur potentiel, comme cellules cibles de choix dans les essais visant à évaluer les titres d'anticorps ADCC dans les sérums de patients infectés par le VIH-1. Ceci nous a révélé que la réponse ADCC, intacte et fonctionnelle durant le stade asymptomatique, est lourdement altérée durant les stades avancés de l'infection (stades III et IV). Ceci semble suggérer un niveau d'implication important de l'activité ADCC dans la maintien de l'état asymptomatique, particulièrement depuis que son déclin coïncidait avec la déplétion des cellules CD4.

La présence d'une réponse ADCC précoce pourrait contribuer au maintien de l'état asymptomatique et d'un compte normal des cellules CD4, en limitant la réplication du virus après destruction des cellules infectées activées, productrices de virus. Une telle implication de la réponse ADCC supporte l'utilisation d'anticorps, monoclonaux ou autres, capables de diriger une activité ADCC comme un supplément de valeur, avec des anticorps neutralisants, dans le cas d'une immunothérapie passive anti-VIH-1 ou dans toutes autres stratégies vaccinales capables d'éliciter une telle réponse ADCC.

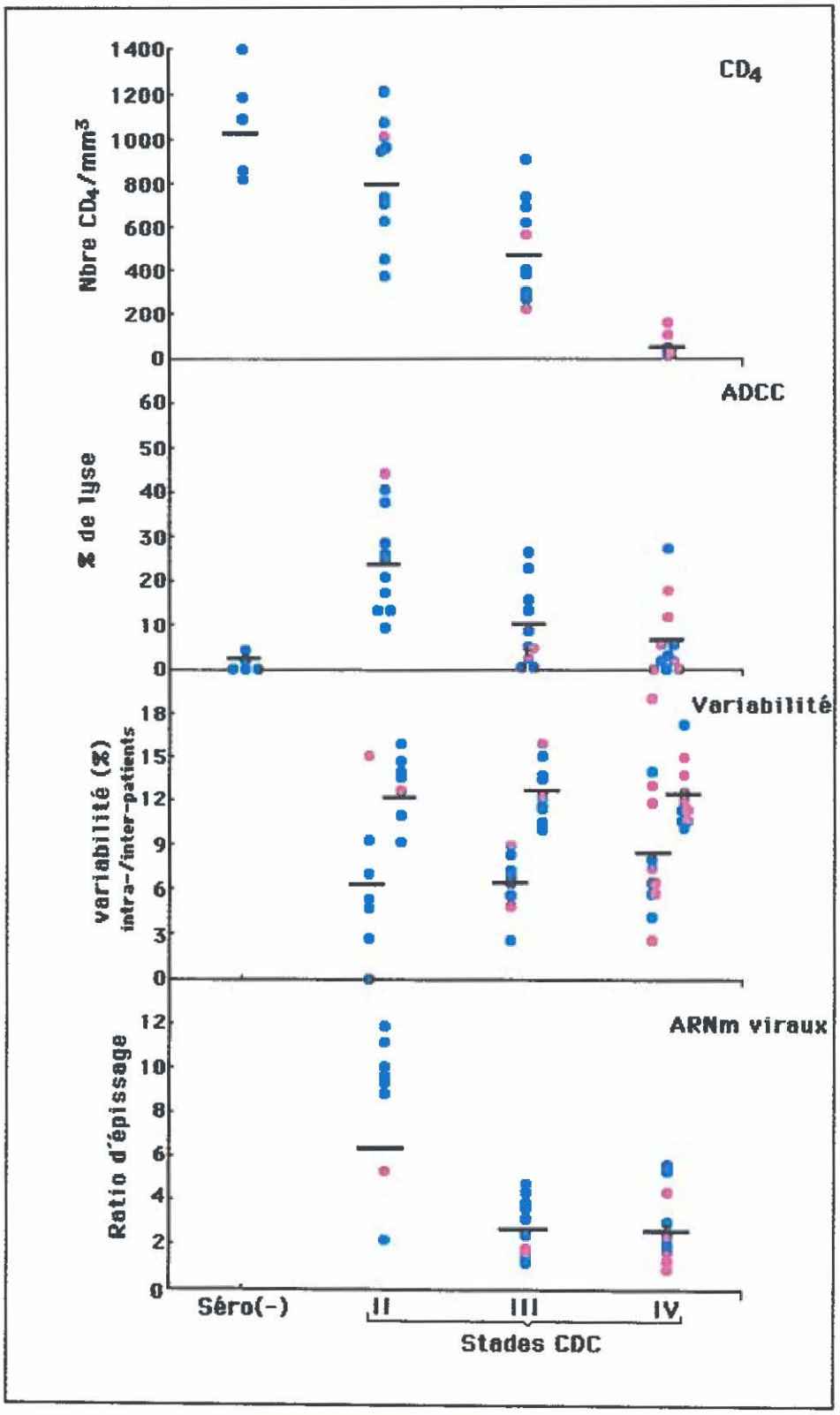
Cependant, le rôle exact de l'ADCC dans l'immunité protectrice contre le VIH-1 demeurera mal défini, peut-être, aussi longtemps qu'un modèle animal adéquat permettant un suivi serré de l'infection au VIH-1 ne soit développé.

L'étude de la diversité génétique des "quasi-espèces" provirales, isolées à partir des cellules de patients de cette étude croisée, n'a montré aucune relation directe entre le taux de la diversité génétique virale, intrapatient et interpatients, et la chute des titres d'anticorps ADCC et du nombre de cellules CD4 (fig. 38).

Figure 38: Étude des relations, chez les patients à différents stades de l'infection au VIH-1, entre le nombre de cellules CD4, le niveau d'activité ADCC antiviral, le taux de variabilité génétique provirale et le ratio d'épissage des transcrits messagers viraux.

Cette étude n'a montré aucune relation directe entre le taux de la diversité génétique virale, intrapatient et interpatients, et la chute de l'activité ADCC et du nombre de cellules CD4.

Les points en rouge correspondent aux patients dont la nature des séquences des quasi-espèces prédisait un phénotype inducteur de syncitia. Les points en bleu correspondent aux patients dont la nature des séquences des quasi-espèces prédisaient un phénotype non-inducteur de syncitia.


CD4
Nbre CD4/mm3
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
ADCC
% de lyse
60
50
40
30
20
10
0
Variabilité
variabilité (%)
intra-/inter-patients
18
15
12
9
6
3
0
ARNm viraux
Ratio d'épissage
12
10
8
6
4
2
0
Séro(-)
II
III
IV
Stades CDC

L'analyse des relations phylogénétiques a montré que les séquences de la région variable V3 des différentes "quasi-espèces" provirales ne se regroupent pas en concordance avec le stade de l'infection, ou avec l'état du système immunitaire, indiquant ainsi que le polymorphisme génétique de cette région (V3) n'est pas directement relié à la pathogenèse du SIDA. En plus, le fait que les régions C4 et C5 sont demeurées relativement bien conservées, et ce, peu importe le stade de l'infection, supporte le point de vue selon lequel le taux de diversité génétique virale n'est ni la cause directe, ni la conséquence, de la perte de l'activité ADCC.

Cette absence de corrélation entre le taux de variabilité et l'activité ADCC n'exclut pas, par contre, l'émergence de "quasi-espèces" ayant dirigé des mutations spécifiques qui pourraient leur conférer une meilleure adaptation à leur environnement immunitaire hôte et, par conséquent, la capacité de lui causer plus de dommages. En effet, nous avons montré que la majorité des patients au stade IV, et certains au stade III, de l'infection, ont vu apparaître parmi leur population de "quasi-espèces", des souches dont la nature des séquences prédisait le phénotype biologique SI (inducteur de syncitia). L'apparition des souches SI, plus cytopathogéniques a été généralement associée à une chute accélérée des cellules CD4 et une progression rapide de l'infection vers le SIDA, coïncidait effectivement avec des niveaux d'activité ADCC et des comptes CD4, généralement lourdement altérés (fig. 38).

Selon nos résultats, il est encore prématuré d'attribuer la perte de l'activité ADCC (et des anticorps ADCC), et la déplétion des cellules CD4, à la seule apparition des souches SI. En effet, un grand nombre de patients au stade III et IV de l'infection et, dont l'activité ADCC a été lourdement altérée, montraient des "quasi espèces" dont les séquences prédisaient un phénotype NSI (non-inducteur de syncitia). Ainsi, l'apparition de telles souches (SI) pourrait être aussi bien une conséquence des perturbations graduelles de la réponse immunitaire, à la suite de la chute des cellules CD4, plutôt que la cause principale. Il est par contre capital que dans toute tentative de développement d'un vaccin anti-VIH-1,

ou de stratégies d'immunothérapie passive, de tenir compte de l'émergence de telles ¨quasi-espèces¨.

Ces résultats sont contraires aux concepts usuels expliquant la pathogenèse du VIH-1, selon lesquels la réponse immunitaire de l'hôte contre le virus aboutit ultimement à une période de latence virale durant laquelle celui-ci ne se réplique quasiment pas. La quantification des ARNm viraux nous a confirmé qu'en fait, la réplication du virus et la production de virions est active, et persistante tout au long de l'infection au VIH-1, y compris la période ¨quiescente¨ ou asymptomatique. Ces résultats sont en accord avec les récents travaux sur la dynamique de l'infection au VIH-1 et sur la rotation de la population virale, qui ont montré que l'infection au VIH-1 n'est pas une infection latente au réveil tardif, mais plutôt une infection qui obéit à un processus dynamique au cours duquel plusieurs milliards de particules virales sont relâchées dans la circulation chaque jour, et qui sont éliminées par un système immunitaire intact, durant le stade asymptomatique.

L'augmentation du niveau de production de virions, durant le stade III et IV fait probablement suite à la chute de l'activité ADCC (fig. 38) et des différentes composantes de la réponse immunitaire (anticorps neutralisants, réponse CTL), après altération de la fonction des cellules-T $CD4^+$ et la détérioration concomitante du système immunitaire dues à des événements multiples qui restent à éclaircir.

Ces résultats, qui montrent une réplication virale déjà active dès le stade asymptomatique de l'infection durant lequel la réponse ADCC intacte et fonctionnelle semble bien s'adapter à la présence de souches de virus divergents, plaide en faveur d'une thérapie combinée ou même d'une polythérapie. On associerait ainsi les drogues antivirales et les anticorps capables de diriger l'ADCC, d'une part, pour aider l'organisme à contrôler (abaisser) la charge et la réplication virale, et d'autre part pour prévenir la détérioration du système immunitaire.

REMERCIEMENTS

Je remercie vivement mon directeur de thèse, le Dr. Max Arella qui a accepté de diriger ce travail. Je désire lui exprimer ma reconnaissance pour sa compétence, sa disponibilité et la patience dont il a fait preuve, tout au long de ce travail. Je remercie également mon codirecteur le Dr. Pravin Patel, pour son encadrement et le support technique de son laboratoire.

Je remercie le Dr Sharon Cassol, le Dr. Michael O'Shaughnessy et le Dr. John Gill pour leur participation et leur collaboration dans ce projet et pour leur support technique et financier.

Je désire exprimer toute ma reconnaissance à mon très cher papa, à ma très chère maman, à ma petite soeur Naima, à mes frères Omar, Abderrahman, Abdelkhaleq, Mohammed et Rachid, à mes nièces Najat et Ghislane et à mes neveux Mehdi, Othman et Yassir pour leur confiance et leur grand amour.

Mes remerciements s'adressent à tous mes ami(e)s, à mes camarades et collègues de travail à l'Institut Armand-Frappier, Au British Columbia Centre for Excellence in HIV/AIDS, et à U.B.C. Mes remerciements vont également au personnel du Centre de Recherche en Virologie, de l'informatique, de l'audio-visuel et de la bibliothèque pour leur collaboration.

Je suis reconnaissant au gouvernement du Maroc, à l'Agence Canadienne de Développement Internationale (ACDI), au Centre Féderal pour le SIDA (Ottawa) et au B.C Centre for Excellence in HIV/AIDS qui m'ont supporté financièrement pendant mes années d'études au doctorat.

RÉFÉRENCES

Adachi A., Gendelman H.E., Koening S., Folks T., Willey R., Rabson A., Martin M.A. 1986. Production of acquired immunodeficieny syndrome-associated retrovirus in human and non-human cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* **59**: 284-291.

Ahmad A., Morisset R., Thomas R., Menezes J. 1994. Evidence of a defect of ADCC effector function and anti-HIV gp120/41-specific ADCC-mediating antibody titres in HIV-infected individuals. *J. AIDS* **7**: 428-437.

Ahmad A., Menezes J. 1995. Positive correlation between the natural killer and gp120/41-specific ADCC effectorfunctions in HIV-infected individuals. *J. AIDS* **10**: 115-119.

Ahmad A., Menezes J. 1996. ADCC in HIV infections. *FASEB J.* **10**: 258-266.

Albert J., Bredberg U., Chiodi F., Bottinger B., Fenyo E.M., Norrby E., Biberfeld G. 1987. A new human retrovirus isolate of West African origin (SBL-6669) and its relationship to HTLV-IV, LAV-II, and HTLV-IIIB. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **3**: 3-10.

Aldovini A., Young R.A. 1990. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* **64**: 1920-1926.

Alkhatib G., Combadiere C., Broder C.C., Feng Y., Kennedy P.E., Murphy P.M., Berger E.A. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*. **272**: 1955-1958.

Allan J.S., Coligan J.E., Barin F., McLane M.F., Sodroski J.G., Rosen C.A., Haseltine W.A., Lee T.H., Essex M. 1985. Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science* **228**: 1091-1093.

Arendrup M., Nielsen J.-E., Hansen S., Pedersen C., Mathiesen L., Nielsen J.O. 1992. Autologous HIV-1 neutralizing antibodies: emergence of neutralization-resistant escape virus and subsequent development of escape virus neutralizing antibodies. *J. AIDS* **5**: 303-307.

Arrigo S.J., Weitsman S., Rosenblatt J.D., Chen I.S.Y. 1989. Analysis of rev gene function on human immunodeficiency virus type 1 replication in lymphoid cells ny using a quantitative polymerase chain reaction method. *J. Virol.*. **63**: 4875-4881.

Arthos J., Deen K.C., Chaikin M.A., Fornwald J.A., Sathe G., Sattentau Q.J., Clapham P.R. 1989. Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV. *Cell* **57**: 469-481.

Arya S.K., Guo C., Josephs S.F., Wong-Staal F. 1985. Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* **229**: 69-73.

Arya S.K., Gallo R.C. 1988. Three novel genes of human T-lymphotropic virus type III: Immune reactivity of their products with sera from acquired immune deficiency syndrome patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 2209-2213.

Arya S.K., Sadaie M.R. 1993. Fusogenicity of mutant and chimeric proviruses derived from molecular clones of cytopathic and noncytopathic human immuodeficiency virus type 2. *J. AIDS.* **6**: 1205-1211.

Ashorn P.A., Berger E.A., Moss B. 1990. HIV envelope glycoprotein/CD4-mediated fusion of nonprimate cells with human cell. *J. Virol.* **64**: 2149-2156

Asjo B., Morfeldt-Manson L., Chiodi F., Albert J., Biberfeld G., Karlsson A., Lidman K., Fenyo E.M. 1986. Replicative capacity of human immunoeficiency virus from patients with varying degrees of severity of HIV infection. *Lancet* **2**: 660-662.

Asjo B., Ivhed I., Gidlund M., Fuerstenberg S., Fenyo E.M., Nilsson K., Wigzell H. 1987. Susceptibility to infection by the human immunodeficiency virus (HIV) correlates with T4 expression in a parental monocytoid cell line and its subclones. *Virology* **157**: 359-365.

Autran B., Plata F., Debre P. 1991. MHC-restricted cytotoxicity against HIV. *J. AIDS***4**: 361-367.

Back N.K.T., Smit L. Schutten M., Nara P.L., Tersmette M., Goudsmit J. 1993. Mutations in human immunodeficiency virus type 1 gp41 affect sensitivity to neutralization by gp 120 antibodies and soluble CD4. *J. Virol.* **67:** 6897-6902.

Back N.K.T., Smit L., de Jong J.J., Keulen W., Schutten M., Goudsmit J., Tersmette M. 1994. An N-glycan within the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop affects virus neutralization. *Virology* **199**: 431-438.

Bagasra O., Hauptman S.P., Lischner H.W., Sachs M., Pomerantz R.J. 1992. Detection of human immunodeficiency virus type 1 provirus in mononuclear cells by *in situ* polymerase chain reaction. *N. Engl. J. Med.* **326**: 1385-1391.

Barre-Sinoussi F., Cherman J.C., Rey R., Nugerye M.T., Chamaret S., Gruest J., Dauget C., Axler-Blin C., Vezinet-Brun F., Rouzioux C., Rosenbaum W., Montagnier L. 1983. Isolation of a lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) *Science* **220**: 868-871.

Bedinger P., Moriarty A., von Borstel R.C. II., Donovan N.J., Steimer R.S., Littman D.R. 1988. Internalization of human immunodeficiency virus does not require the cytoplasmic domain of CD4. *Nature* **334**: 162-165.

Bergeron L., Sodroski J. 1992. Dissociation of unintegrated viral DNA accumulation from single-cell lysis induced by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **66**: 5777-5787.

Berman P.W., Gregory T.J., Riddle L., Nakamura G.R., Champe M.A., Porter J.P., Wurm F.M., Hershberg R.D., Cobb E.K., Eichberg J.W. 1990. Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160. *Nature* **345**: 622-625.

Berman P.W., Nunes W., Haffar O.K. 1988. Expression of membrane-associated and secreted variants of gp160 of human immunodeficiency virus type 1 *in vitro* and in continuous cell lines. *J. Virol.* **62**: 3135-3142.

Blumberg R.S., Paradis T., Hartshorn K.L., Vogt M., Ho D.D., Hirsch M.S., Leban J., Sato V.L., Schooley R.T. 1987. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against cells infected with the human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* **156**: 878-884.

Bolognesi D.P. 1988. Natural immunity to HIV and its possible relationship to vaccine strategies. *Microbiol. Sci.* **8**: 236-241.

Bosch V., Pfeiffer T. 1992. HIV-1 induced cytopathogenicity in cell culture despite very decreased amounts of fusion-competent viral glycoprotein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**: 1815-1821.

Böttiger B., Ljunggren K., Karlsson A., Krohn K., Fenyo E.M., Biberfeld G. 1988. Neutralizing antibodies in relation to antibody dependent cellular cytotoxicity inducing antibodies against human immunodeficiency virus type 1. *Clin Exp. Immunol.* **73**: 339-342.

Bowman M.R., MacFerrin K.D., Schreiber S.L., Burakoff S.J. 1990. Identification and structural analysis of residues in the V1 region of CD4 involved in interaction with human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 and class II major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 9052-9056.

Brinchman J.E., Gaudernack G., Vartdal F. 1991b. *In vitro* replication of HIV-1 in naturally infected CD4+ T cells is inhibited by rIFN alpha2 and by a soluble factor secreted by activated CD8+ T cells , but not by rIFN beta, rIFN gamma, or recombinant tumor necrosis factor alpha. *J. AIDS***4**: 480-488.

Broder C.C., Berger E.A. 1995. Fusogenic selectivity of the envelope glycoprotein is a major determinant of HIV-1 tropism for CD4 T-cell lines vs. primary macrophages. *PNAS.* **92**: 9004-9008.

Broder C.C., Dimitrov D.S., Blumenthal R., Berger E.A. 1993. The block to HIV-1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion in animal cells expressing human CD4 can be overcome by a human cell component(s). *Virology.* **193**: 483-491.

Broliden P.-A., Ljunggren K., Hinkula J., Norrby E., Akerblom L.,Wahren B. 1990. A monoclonal antibody to HIV-1 mediating cellular cytotoxicity (ADCC) and neutralization. *J. Virol.* **64**: 936-940.

Broliden P.-A., Makitalo B., Akerblom L., Rosen J., Broliden K., Utter G., Jondal M., Norrby E., Wahren B. 1991. Identification of amino acids in the V3 region of gp120 critical for virus neutralization by human HIV-1-specific antibodies. *Immunology* **73**: 371-376.

Broliden P.-A., von Gegerfelt A., Clapham P., Rosen J., Fenyo E.-M., Wahren B., Broliden K. 1992. Identification of human neutralization-inducing regions of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 461-465.

Bryant M., Ratner L. 1990. Myristylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 523-527.

Bushman F.D., Fujiwara T., Craigie R. 1990. Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro. *Science* **249**: 1555-1558.

Callebaut, C., Krust B., Jacotot E., Hovanessian A.G. 1993. T cell activation, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4+ cells. *Science* **262**: 2045-2050.

Camerini D., Seed B. 1990. A CD4 domain important for HIV-mediated syncytium formation lies outside the virus binding site. *Cell* **60**: 747-754.

Camerini D., Jamieson B.D., Zack J.A., Chen I.S.Y. 1994. Pathogenesis of syncytium-inducing and non-syncytium inducing HIV-1 isolates and molecular clones in SCID-hu mice. *Keystone Symp. Mol. Cell. Biol. Suppl.* **18B**, 155.

Cann A., Koyanagi Y., Chen I.S.Y. 1988. High efficiency transfection of primary human lymphocytes and studies of gene expression. *Oncogene* **3**: 123-128.

Cann A.J., Zack J.A., Go A.S., Arrigo S.J., Koyanagi Y., Green P.L., Koyanagi Y., Pang S., Chen I.S. 1990. Human immunodeficiency virus type 1 T-cell tropism is determined by events prior to provirus formation. *J. Virol.* **64**: 4735-4742.

Carmichael A., Jin X., Sissons P., Borysiewicz L. 1993. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. *J. Exp. Med.* **177**: 249-256.

Carrillo A., Trowbridge D.B., Westervelt P., Ratner L. 1993. Identification of HIV-1 determinants for T lymphoid cell line infection.*Virology* **197**: 817-824.

Centers for Disease Control. 1987. Revision of the CDC Surveillance Case Definition for Acquired Immunodeficiency Syndrome. Morbid. Mort. Week. Report 36, (2S).

Chehimi J., Bandyopadhyay S., Prakash K., Perussia B., Hassan N.F., Kawashima H., Campbell D., Kornbluth J., Starr S.E. 1991. *In vitro* infection of natural killer cells with different human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J. Virol.* **65**: 1812-1822.

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

Cheng-Mayer C., Iannello P., Shaw K., Luciw P.A., Levy J.A. 1989. Differential effects of *nef* on HIV replication: Implications for viral pathogenesis in the host. *Science* **246**: 1629-1632.

Cheng-Mayer C., Quiroga M., Tung J.W., Dina D., Levy J.A. 1990. Viral determinants of human immunodeficiency virus type-1 T-cell or macrophage tropism, cytopathogenicity and CD4 antigen modulation. *J. Virol.* **64**: 4390-4398.

Cheng-Mayer C., Shioda T., Levy J.A. 1991. Host range, replicative, and cytopathic properties of human immunodeficiency virus type 1 are determined by very few amino acid changes in Tat and gp120. *J. Virol.* **65**: 6931-6941.

Chesebro B., Buller R., Portis J., Wehrly K. 1990. Failure of human immunodeficiency virus entry and infection in CD+-positive brain and skin cells. *J. Virol.* **64**: 215-221.

Chesebro B., Nishio J., Perryman S., Cann A., O'Brien W., Chen I.S.Y, Wehrly K. 1991. Identification of human immunodeficiency virus envelope gene sequences influencing viral entry into CD4-positive HeLa cells, T-leukemia cells, and macrophages. *J. Virol.* **65**: 5782-5789.

Chesebro B., Wehrly K., Nishio J., Perryman S. 1992. Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence heterogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism. *J. Virol.* **66**: 6547-6554.

Chiu I.M, Yaniv A., Dahlberg J.E., Gazit A., Skuntz S.F., Tronick S.R., Aaronson S.A. 1985. Nucleotide sequence evidence for the relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature* **317**: 366-368.

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., Sodroski J. 1996. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell.* **85**: 1135-1148.

Chomczynski P., Sacchi N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.

Chu G., Hayakawa H., Berg P. 1987. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells. *Nucleic Acid Res.* **15**: 1311-1326.

Cichutek K., Merget H., Norley S., Linde R., Kreuz W., Gahr M., Lower J., Von Wangenheim G., Kurth R. 1992. Development of a quasi-species of human immunodeficiency virus type 1 *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 7365-7369.

Clapham P., Nagy K., Weiss R.A. 1984. Pseudotypes of human T-cell leukemia virus types 1 and 2: Neutralization by patients' sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 2886-2889.

Clapham P.R., Weber J. N., Whitby D., McIntosh K., Kalgleish A.G., Maddon P.J., Deen K.C., Sweet R.W., Weiss R.A. 1989. Soluble CD4 blocks the infectivity of diverse strains of HIV and SIV for T cells and monocytes but not for brain and muscle cells. *Nature* **337**: 368-370.

Clark S.J., Saag M.S., Decker W.D., Campell-Hill S., Roberson J.L., Veldcamp P.J., Kappes J.C., Hahn B.H., Shaw G.M.,1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* **324**: 954-960.

Clavel F., Guetard D., Brun-Vezinet F., Chamaret S., Rey M.-A., Santos-Ferreira M.O., Laurent A.G., Dauguet C., Katlama C., Rouzioux C., Klatzmann D., Champalimaud J.L., Montangnier L. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**: 343-346.

Clavel F., Mansinho K., Chamaret S., Guetard D., Favier V., Nina J., Santos-Ferreira M.D., Champalimaud J.L., Montagnier L. 1987. Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. *N. Engl. J. Med.* **316**: 1180-1185.

Clements G.J., Price-Jones M.J., Stephans P.E., Sutton C., Schultz T.F., Clapham P.R., McKeating J.A., McClure M.O., Thomson S., Marsh M., Kay J., Weiss R.A., Moore J.P. 1991. The V3 loops of the HIV-1 and HIV-2 surface glycoproteins contain proteolytic cleavage sites: A possible function in viral fusion? *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **7**: 3-16.

Clerici M., Stocks N.I., Zajac R.A., Boswell R.N., Lucey D.R., Via C.S., Shearer G.M. 1989. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic human immunodeficiency virus -positive patients. Independance of CD4+ cell numbers and clinical staging. *J. Clin. Invest.* **84**: 1892-1899.

Clerici M., Lucey D.R., Zajac R.A., Boswell R.N., Gebel H.M., Takahashi H., Berzofsky J.A., Shearer G.M.,1991. Detection of cytotoxic T lymphocyes specific for synthetic peptides of gp160 in HIV-seropositive individuals. *J. Immunol.* **146**: 2214-2219.

Clerici M., Giorgi J.V., Chou C.C., Gudeman V.K., Zack J.A., Gupta P., Ho H.N., Nishanian P.G., Berzofsky J.A., Shearer G.M. 1992. Cell-mediated immune response to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1. *J.Infect. Dis.***165**: 1012-1019.

Clerici M., Shearer G.M. 1993. A TH1 to TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today* **14**: 107-111.

Clerici M., Levin J.M., Kessler H.A., Harris A., Berzofsky J.A., Landay A.L., Shearer G.M. 1994. HIV-specific T-helper activity in seronegative health care workers exposed to contaminated blood. *JAMA* **271**: 42-46.

Cocchi F., DeVico A. L., Garzino-Demo A., Arya S.K., Gallo R.C., Lusso P. 1995. Identification of RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science.* **270**: 1811-1815.

Coffin J.M. 1986. Genetic variation in AIDS viruses. *Cell* **46**: 1-4.

Cohen E.A., Dehni G., Sodroski J.G., Haseltine W.A. 1990a. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* **64**: 3097-3099.

Cohen E.A., Terwilliger E. F., Jalinoos Y., Proulx J., Sodroski J.G., Haseltine W.A. 1990b. Identification of HIV-1 vpr product and function. *J. AIDS* **3**: 11-18.

Colbere-Garapin, F., Horodniceanu F., Kourilsky P., Garapin A.-C. 1981. A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J. Mol. Biol.* **150**: 1-8.

Connor R.I., Ho D.D. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 variants with increased replicative capacity develop during the asymptomatic stage before disease progression. *J. Virol.* **68**: 4400-4408.

Connor R.I., Mohri H., Cao Y., Ho D.D. 1993. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1 infected individuals.*J. Virol.* **67**: 1772-1777.

Cooper D.A., Gold J., Maclean P., Donovan B., Finlayson R., Barnes T.G., Michelmore H.M., Brooke P., Penny R. 1985. Acute AIDS retrovirus infection: definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* **i**: 537-540.

Cordingley M.G., La Femina R.L., Callahan P.L., Condra J.H., Sardana V.V., Graham D.J., Nguyen T.M., LeGrow K., Gotlib L., Schlabach A.J. 1990. Sequence-specific interaction of Tat proteins and Tat peptides with the transactivation-reponsive sequence element of human immunodeficiency virus type 1 *in vitro. Proc . Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 8985-8989.

Cornelissen M., Mulder-Kampinga G., Veenstra J., Zorgdrager F., Kuiken C., Hartman S., Dekker J., van der Hoek L., Sol C., Coutinho R., Goudsmit J. 1995. Syncytium-inducing (SI) phenotype suppression at seroconversion after intramuscular inoculation of a non-syncytium-inducing/SI phenotypically mixed human immunodeficiency virus population. *J Virol* **69**: 1810-8.

Curtis B.M., Scharnowske S., Watson A.J. 1992. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5162-5166.

D'aquila R.T., Blechtel L.J., Videler J.A., Eron J.J., Gorczyca P., Kaplan J.C. 1991. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucleic Acids Res.* **19**: 3749.

Daar E.S., Moudgil T., Meyer R.D., Ho D.D. 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **325**: 733-735.

Dalgleish A.G., Beverley P. C., Clapham P.R., Crawford D.H., Greaves M.F., Weiss R.A. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**: 763-767.

Darlix J.-L., Gabus C., Nugeyre M.-T., Clavel F., Barre-Sinoussi F. 1990. Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J. Mol. Biol.* **216**: 689-699.

Dayton A.J., Sodroski J.G., Rosen C.A. 1986. The trans-activator gene of the human T-cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **4**: 941-947.

Dayton A.I., Terwilliger E. F., Potz J., Kowalski M., Sodroski J.G., Haseltine W.A. 1988. Cis-acting sequences responsive to the *rev* gene product of the human immunodeficiency virus. *J. AIDS* **1**: 441-452.

Debouck C., Gorniak J.G., Strickler J.E., Meek T.D., Metcalf B.W., Rosenberg M. 1987. Human immunodeficiency virus protease expressed in *Escherichia coli* exhibits autoprocessing and specific maturation of the *gag* precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 8903-8906.

de Jong J.J. Goudsmit J., Keulen W., Klaver B., Krone W., Tersmette M. de Ronde A. 1992a. Human immunodeficiency virus type 1 clones chimeric for the envelope V3 domain differ in syncytium formation and replication capacity. J. Virol. 66: 757-765.

de Jong J. J., de Ronde A., Keulen W., Tersmette M., Goudsmit J. 1992b. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J. Virol.* **66:** 6777-6780.

Del Prete G.F., De Carli M., Ricci M., Romagnani S. 1991. Helper activity for immunoglobulin synthesis of T helper type 1 (Th1) and Th2 human T cell clones: the help of Th1 clones is limited by their cytolytic capacity. *J. Exp. Med.* **174**: 809-813.

Delwart E.L., Sheppard H.W., Walker B.D., Goudsmit J., Mullins J.I. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 evolution *in vivo* tracked by DNA heteroduplex mobility assays. *J. Virol.* **68**: 6672-6683.

Deng H., Liu R., Ellmeier W., Choe S., Unutmaz D., Burkhart M., Di Marzio P., Marmon S., Sutton R.E., Hill C.M., DavisC.B., Peiper S.S., Schall T.J., Littman D.R., Landau N.R.,. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. **381**: 661-666.

Dewar R.L., Vasudevachari M.B., Natarajan V., Salzman N.P. 1989. Biosynthesis and processing of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins: Effect of monensin on glycosylation and transport. *J. Virol*. **63**: 2452-2456.

Donaldson Y.K., Bell J.E., Holmes E.C., Hughes E.S., Brown H.K., Simmonds P. 1994. In vivo distribution and cytopathology of variants of human immunodeficiency virus type 1 showing restricted sequence variability in the V3 loop. *J. Virol* **68**: 5991-6005.

Doranz B.J., Rucker J., Yi Y., Smyth R.J., Samson M., Peiper S.C., Parmentier M., Collman R.G., Doms R.W. Adual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. 1996. *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., Paxton W.A. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*. **381**: 667-673.

Dumitrescu, O., Kalish M., Kilks S.C., Bandea C.I., Levy J.A. 1994. Characterization of HIV-1 strains isolated from children in Romania: identification of a new envelope subtype. *J. Infect. Dis.* **169**: 281-288.

Earl P.L, Doms R.W., Moss B. 1990. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 648-652.

Earl P.L, Moss B., Doms R.W. 1991. Folding, interaction with GRP78-BIP, assembly and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* **65**: 2047-2055.

Embretson J., Zupancic M., Beneke J., Till M., Wolinsky S., Ribas J.L., Burke A., Haase A.T. 1993. Analysis of human immunodeficiency virus-infected tisues by amplification and in situ hybridization reveals latent and permissive infections at single-cell resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 357-361.

Emini E.A., Nara P.L., Scleif W.A., Lewis J.A., Davide J.P., Lee D.R., Kessler J., Conley S., Matsushita S., Putney S.D. 1990. Antibody-mediated *in vitro* neutralization of human immunodeficiency virus type 1 abolishes infectivity for chimpanzees. *J. Virol.* **64**: 3674-3678.

Evans L.A., McHugh T.M., Stites D.P., Levy J.A. 1987. Differential ability of human immunodeficiency virus isolates to productively infect human cells. *J. Immunol.* **138**: 3415-3418.

Evans L.A., Moreau J., Odehouri K., Seto D., Thomson-Honnebier G., Legg H., Barboza A., Cheng-Mayer C., Levy J.A. 1988. Simultaneous isolation of HIV-1 and HIV-2 from an AIDS patient. *Lancet* **2**: 1389-1391.

Farnet C.M., Haseltine W.A. 1990. Integration of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4164-4168.

Fauci A.S. 1993. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* **262**: 1011-1018.

Feinberg M.B., Jarrett R.F., Aldovini A., Gallo R.C., Wong-Staal F. 1986. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell* **46**: 807-817.

Felsenstein J. 1989. PHYLIP-phylogenetic interference package (version 3.2) *Cladistics* **5**: 164-166.

Feng Y., Broder C.C., Kennedy P.E., Berger E.A. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*. **272**: 872-877.

Fenyo E.M., Morfeldt-Manson L., Chiodi F., Lind B., von Gegerfelt A., Albert J., Olausson E., Asjo B. 1988. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J. Virol.* **62**: 4414-4419.

Ferbas J. Kaplan A.H., Hauser M.A., Hultin L.E., Matud J.L., Liu Z., Panicali D.L., Nerng-Ho H., Detels R., Giorgi J.V. 1995. Virus burden in long-term survivors of human immunodeficiency virus (HIV) infection is a determinant of anti-HIV CD8+ lymphocyte activity.*J. Infect. Dis.***172** : 329-339.

Fiala M., Cone L.A., Chang C., Mocarski E.S. 1986. Cytomegalovirus viremia increases with progressive immune deficiency in patients infected with HTLV-III. *AIDS Res.* **2**: 175-181.

Fields, A.P., Bednarik D.P., Hess A., May W.S. 1988. Human immunodeficiency virus induces phosphorylation of its cell surface receptor. *Nature* **333**: 278-280.

Fisher A.G., Feinberg M.B., Josephs S.F. 1986. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* **320**: 2367-2371.

Fisher R.A., Bertonis J. M., Meier W., Johnson V.A., Costopoulos D.S., Liu T., Tizard R., Walker R.D., Hirsch M.S., Schooley R.T. 1988. HIV infection is blocked in vitro by recombinant soluble CD4. *Nature* **331**: 76-78.

Foley G.E., Lazarus H., Farber S., Uzman B.G., Boone B.A., McCarthy R.E. 1965. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* **18**: 522-529.

Forthal D.N., Landucci G., Gorny M.W., Zolla-Pazner S., Robinson W.E. 1995. Functional activities of 20 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific human monoclonal antibodies. *AIDS Research and Human Retroviruses* **11**: 1095-1099.

Fouchier R.A.M., Groenick M., Kootstra N.A., Tersmette M., Huisman H.G., Miedema F., Schuitemaker H. 1992. Phenotype associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J. Virol.* **66**: 3183-3187.

Freed E.O., Meyers D.J., Risser R. 1989. Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *J. Virol.* **63**: 4670-4675.

Freed E.O., Myers D.J., Risser R. 1990. Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 4650-4654.

Fung, M.S.C., Sun, C.R.Y., Gordon W.L., Liou, R.-S., Chang T.W., Sun W.N.C., Daar E.S., Ho D.D. 1992. Identification and characterization of a neutralization site within the second variable region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* **66**: 848-856.

Gaines H., Albert J., von Sydow M., Sonnerberg A., Chiodi F., Ehrnst A., Strannegard O., Asjo B. 1987. HIV antigenaemia and virus isolation from plasma during primary HIV infection. *Lancet* **1**: 1317-1318.

Gaines H., von Sydow M., Parry J.V., Forsgren M., Pehrson P.O., Sonnerborg A., Mortimer P.P., Strannegard O. 1988. Detection of immunoglobulin M antibody in primary human immunodeficiency virus infection. *AIDS.* **2**: 11-15.

Gallaher W.R. 1987. Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* **50**: 327-328.

Garcia, J.A., Wu F.K., Mitsuyasu R., Gaynor R.B. 1987. Interactions of cellular proteins invoved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus *EMBO J.* **6**: 3761-3770.

Gartner S., Markovits P., Markovitz D.M., Kaplan M.H., Gallo R.C., Popovic M. 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* **233**: 215-219.

Gaynor, R. 1992. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *AIDS* **6**: 347-363.

Gazzinelli R.T., Makino M., Chattopadhyay S.K., Snapper C.M., Sher A., Hugin A.W., Morse III H.C. 1992. CD4+ subset regulation in viral infection. *J. Immunol.* **148**: 182-188.

Gelderblom H.R., Hausmann E.H.S., Ozel M., Pauli G., Koch M.A. 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of stuctural proteins. *Virology* **156**: 171-176.

Gelderblom H.R., Ozel M., Hausmann E.H.S., Winkel T., Pauli G., Koch M.A. 1988. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV), immunolocalization of structural proteins and virus-cell relation. *Micron Microscop.* **19**: 41-60.

Gelderblom H.R., Ozel M., Pauli G. 1989. Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. *Arch. Virol.* **106**: 1-13.

George J.R., Ou C.Y., Parekh B., Brattegaard K., Brown V., Boateng E., De Cock K.M. 1992. Prevalence of HIV-1 and HIV-2 mixed infections in Cote d'Ivoire. *Lancet* **340**: 337-339.

Girard M., Kieny M.P., Pinter A., Barre-Sinoussi F., Nara P., Kolbe H., Kusumi K., Chaput A., Reinhart T., Muchmore E., Ronco J. Kaczonek M., Garrand E., Gluckman J.C. Fultz P.N. 1991. Immunization of chimpanzees confers protection against challenge with human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 542-546.

Giulian D., Vaca K., Noonan C.A. 1990. Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science* **250**: 1593-1596.

Gnann J.W., Jr., McCormick J.B., Mitchell S., Nelson J.A., Oldstone M.B.A. 1987. Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and HIV type 2 infections. *Science* **237**: 1346-1349.

Goding J.W. 1980. Antibody production by hybridomas (Review). *J of Imm. Meth.* **39**:285-308.

Gorelick R.J., Nigida S. M. Jr., Bess J.W. Jr., Arthur L.O., Henderson L.E., Rein A. 1990. Noninfectious human immunodeficiency virus type 1 mutants deficient in genomic RNA. *J. Virol.* **64**: 3207-3211.

Gottlieb, M.D., Schroff R., Schanker H.M., Weisman J.D., Fan P.T., Wolf R.A., Saxon A. 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. *N. Engl. J. Med.* **305**: 1425-1431.

Gottlinger H.G., Sodroski J.G., Haseltine W.A. 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5781-5785.

Gottlinger H.G., Dorfman T., Sodroski J.G., Haseltine W.A. 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3195-3199.

Goudsmit J., de Wolf F., Paul D.A., Epstein L.G., Lange J.M., Krone W.J., Speelman H., Wolters E.C., Van der Noordaa J., Oleske J.M. 1986. Expression of human immunodeficiency virus antigen (HIV-Ag) in serum and cerebrospinal fluid during acute and chronic infection. *Lancet* **ii**: 177-180.

Goudsmit J., Debouck C., Meloen R.H., Smit L., Bakker M., Asher D.M., Wolff A.V, Gibbs C. Jr., Gajdusek D.C. 1988a. Human immunodeficiency virus type 1 neutralizing epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 4478-4482.

Goudsmit J., Ljunggren K., Smit L., Jondal M. Fenyo E.M. 1988b. Biological significance of the antibody response to HIV antigens expressed on the cell surface. *Arch Virol.* **103**: 189-206.

Goudsmit J., Kuiken C.L., Nara P.L. 1989. Linear versus conformational variation of V3 neutralization domains of HIV-1 during experimental and natural infection. *AIDS* **3(S1)**: S119-S123.

Goudsmit J. Wolfs T.F.W., Kuiken C.L. 1990 Biological significance of HIV envelope variability. In "Annual Review of AIDS" (W.C Koffs, F.Wong-Staal and R.C. Kennedy, Eds.), Dekker, New York, (1991).

Greene W.C. 1991. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **324**: 308-317.

Grez M., Dietrich U., Balfe P., von Briesen H., Maniar J.K., Mahambre G., Delwart E.L., Mullins J.I., Rubsamen-Waigmann H. 1994. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2) mixed infections in India reveals a recent spread of HIV-1 and HIV-2 from a single ancestor for each of these viruses. *J. Virol.* **68**: 2161-2168.

Groenink M., Fouchier R.A, de Goede R.E., de Wolf F., Gruters R.A., Cuypers H.T., Huisman H.G., Tersmette M. 1991. Phenotypic heterogenity in a panel of infectious molecular human immunodeficiency virus type 1 clone derived from a single individual. *J. Viol.* **65**: 1968-1975.

Gruters R.A., Terpstra F.G., de Jong R., Van Noesel C.J.M., Van Lier R.A.W., Miedema F. 1990. Selective loss of T cell function in different stages of HIV infection. Early loss of anti-CD3-induced T cell proliferation followed by decreased anti-CD3-induced cytotoxic T lymphocyte gereration in AIDS-related complex and AIDS. *Eur. J. Immunol.* **20**: 1039-1044.

Gupta S., Vayuvegula B. 1987. Human immunodeficiency virus-associated changes in signal transduction. *J. Clin. Immunol.* **7**: 486-489.

Gurtler L. G., Hauser P.H., Eberle J., von Brunn A., Knapp S., Zekeng L., Tsague J.M., Kaptue L. 1994. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol.* **68**: 1581-1585.

Guy B., Geist M., Dott K., Spehner D., Kieny M.P., Lecocq J.P. 1991. A specific inhibitor of cysteine proteases impairs a *vif*-dependent modification of human immunodeficiency virus type 1 Env protein. J. *Virol.* **65**: 1325-1331.

Haffar O.K, Dowbenko D., Berman P.W. 1988. Topogenic analysis of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, gp160, in microsomal membranes. *J. Cell. Biol.* **107**: 1677-1687.

Haigwood, N.S., Shuster J.R., Moore G.K., Lee H., Skiles P.V., Higgins K. W., Barr P.J., George-Nascimento C., Steimer K.S. 1990. Importance of hypervariable regions of HIV-1 gp120 in the generation of virus neutralizing antibodies. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**: 855-869.

Hammond S.A., Bollinger R.C., Stanhope P.E., Quinn T.C., Schwartz D., Clements M.L., Siliciano R.F. 1993. Comparative clonal analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific CD4+ and CD8+ cytoloytic T lymphocytes isolated from seronegative humans immunized with candidate HIV-1 vaccines. *J. Exp. Med.* **176**: 1531-1542.

Hansen J.E.S., Nielsen C., Mathiesen L.R., Nielsen J.O. 1991. Involvement of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) in HIV infection: inhibition by monoclonal antibody. *Scand. J. Infect. Dis.* **23**: 31-26.

Harouse J.M., Bhat S., Spitalnik S.L., Laughlin M., Stefano K., Silberberg D.H., Gonzalez-Scarano F. 1991. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* **253**: 320-323.

Hatakeyama M., Koni T., Kobayashi N., Kawahara A., Levin S.D., Perlmuther R.M., Taniguichi T. 1991. Interaction of the IL-2 receptor with the src-family kinase p56 lck: identification of novel intermolecular association. *Science* **252**: 1523-1528.

Helseth E., Olshevsky U., Furman C., Sodroski J. 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* **65**: 2119-2123.

Henderson L.A., Qureshi N.M. 1993. A peptide inhibitor of human immunodeficiency virus infection binds to novel human cell surface polypeptides. *J. Biol. Chem.* **268**: 15291-15297.

Hildreth J.E., Orentas R.J. 1989. Involvement of a leukocyte adhesion receptor (LFA-1) in HIV-induced syncytium formation. *Science* **244**: 1075-1078.

Ho D.D., Moudgil T., Alam M. 1989. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N. Engl. J. Med.* **321**: 1621-1625.

Ho D.D., McKeating J.A., Li X.L., Moudgil T., Daar E.S., Sun N.C., Robinson J.E. 1991. Conformational epitope on gp120 important in CD4 binding and human immunodeficiency virus type 1 neutralization identified by a human monoclonal antibody. *J. Virol.* **65**: 489-493.

Ho D.D., Neumann A.V., Perelson A.S., Chen W., Leonard J.M., Markowitz M. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**: 126-129.

Hoffenbach A., Langlade-Demoyen P., Dadaglio G., Vilmer E., Michel F., Mayaud C., Autran B., Plata F. 1989. Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans. *J. Immunol.* **142**: 452-462.

Homsy J., Meyer M., Tateno M., Clarkson S., Levy J.A. 1989. The Fc and not the CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells. *Science* **244**: 1357-1360.

Horsburgh C.R., Jr., Ou C.-Y., Jason J., Holmberg S.D., Longini I.M., Jr., Schable C., Mayer K.H., Lifson A.R., Schochetman G., Ward J.W., Rutherford G.W., Evatt B.L., Seage III G.R., Jaffe H.W. 1989. Duration of human immunodeficiency virus infection before detection of antibody. *Lancet* **ii**: 637-640.

Hosmalin A., Clerici M., Houghten R., Pendleton C.D., Flexner C., Lucey D.R., Moss B., Germain R.N., Shearer G.M., Berzofsky J.A. 1990. An epitope in human immunodeficiency virus 1 reverse transcriptase recognized by both mouse and human cytotoxic T lymohocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2344-2348.

Hoxie J.A., Alpers J.D., Rackowski J.L., Huebner K., Haggarty B.S., Cedarbaum A.J., Reed J.C. 1986. Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV. *Science* **234**: 1123-1127.

Hsia K., Spector S.A. 1991. Human immunodeficiency virus DNA is present in a high percentage of CD4+ lymphocytes of seropositive individuals. *J. Infect. Dis.* **164**: 470-475.

Hwang S.S., Boyle T.J., Lyerly H.K., Cullen B.R. 1991. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **253**: 71-74.

Jakobovits A., Smith D.H., Jakobovits E.B., Capon D.J. 1988. A discrete element 3' of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) and HIV-2 mRNA initiation sites mediates transcriptional activation by an HIV trans-activator. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2555-2561.

Javaherian K., Langlois A.J., McDanal C., Ross K.L., Eckler L.I., Jellis C.L, Profy A.T., Rusche J.R., Bolognesi D.P., Putney S.D., Matthews T.J. 1989. Principle neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6768-6772.

Jewett A., Giorgi J.V., Bonavida B. 1990. Antibody dependent cellular cytotoxicity against HIV-coated target cells by peripheral blood monocytes from HIV seropositive asymptomatic patients. *J. Immunol.* **145**: 4065-4071.

Jimenez A., Davies J. 1980. Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces. Nature* **287**: 869-871

Kan N.C., Franchini G., Wong-Staal F., DuBois G.C., Robey W.G., Lautenberger J.A., Papas T.S. 1986. Identification of HTLV-III/LAV *sor* gene product and detection of antibodies in human sera. *Science* **231**: 1553-1555.

Kato H., Horikoshi M., Roeder R.G. 1991. Repression of HIV-1 transcription by a cellular protein. *Science* **251**: 1476-1479.

Kido H., Fukutomi A., Katanuma N. 1990. A novel membrane-bound serine esterase in human T4+ lymphocytes immunologically reactive with antibody inhibiting syncytia induced by HIV-I. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **265**: 21979-21985.

Kido, H., Fukutomi A., Katanuma N. 1991 Tryptase TL_2 in the membrane of human T4+ lymphocytes is a novel binding protein of the V3 domain of HIV-1 envelope glycoprotein gp120. *FEBS Lett.* **286**: 233-236.

Kim S.Y., Byrn R., Groopman J., Baltimore D. 1989. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infections: Evidence for differential gene expression. *J. Virol.* **63**: 3708-3713.

Kim S., Ikeuchi K., Groopman J., Baltimore D. 1990. Factors affecting cellular tropism of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **64**: 5600-5604.

Kinter A.L., Poli G., Maury W., Folks T.M., Fauci A.S. 1990. Direct and cytokine mediated activation of protein kinase C induces human immunodeficiency virus expression in chronically infected promonocytic cells. *J. Virol.* **64**: 4306-4312.

Klasse P.J., McKeating J.A., Schutten M., Reitz M.S., Jr., Robert-Guroff M. 1993. An immune-selected point mutation in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1 (HXB2-Env:Ala-582 Thr) decreases viral neutralization by monoclonal antibodies to the CD4-binding site. *Virology* **196**: 332-337.

Klatzmann D., Barre-Sinoussi F., Nugeyre M.T., Danquet C., Vilmer E., Griscelli C., Brun-Veziret F., Rouzioux C., Gluckman J.C., Cherman J.C. 1984. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) or helper-induced T lymphocytes. *Science* **225**: 59-63.

Kleiman L., Caudry S., Boulerice F., Wainberg M.A., Parniack M.A. 1991. Incorporation of tRNA into normal and mutant HIV-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**: 1272-1280.

Kliks S.C., Shioda T., Haigwood N.L., Levy J.A. 1993. V3 variability can influence the ability of an antibody to neutralize or engance infection by diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11518-11522.

Klimkait T., Strebel K., Hoggan M.D., Martin M.A., Orenstein J.M. 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol.* **64**: 621-629.

Koenig S., Earl P., Powell D., Pantaleo G., Merli S., Moss B., Fauci A.S.,1988. Group-specific, major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic responses to human immunodeficiency virus I (HIV-1) envelope proteins by cloned peripheral blood T cells from an HIV-1 infected individual. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8638-8642.

Koenig S., Fuerst T. R., Wood L.V., Suzich J.A., Jones G.M., de la Cruz V.F., Daley R.. Jr., Venkatesan S., Moss B. 1990. Mapping the fine specificity of a cytolytic T cell response to HIV-1 nef protein. *J. Immunol.* **145**: 127-135.

Koot M., Keet I.P.M., Vos A.H.V., de Goede R.E.Y., Roos J.T.L., Coutinho R.A., Miedema F., Schellekens P.T.A., Tersmette M. 1993. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann. Intern. Med.* **118**: 681-688.

Korman A.J., Frantz J.O., Strominger J.L., Mulligan R.C. 1987. Expression of human class II major histocompatibility complex antigens using retrovirus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2150-2154.

Kornfeld H., Cruikshank W.W., Pyle S.W., Berman J.S., Center D.M. 1988. Lymphocyte activation of HIV-1 glycoprotien. *Nature* **335**: 445-448.

Koup R.A., Sullivan J.L., Levine P.H., Brewster F., Mahr A., Mazzara G., McKenzie S., Panicali D., 1989b. Antigenic specificity of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity directed against human immunodeficiency virus in antibody positive sera. *J. Virol.* **63**: 584-590.

Kowalski M., Bergeron L., Dorfman T. 1991. Attenuation of human immunodeficiency type 1 cytopathic effect by a mutation affecting the transmembrane envelope glycoprotein. *J. Virol.* **65**: 281-291.

Kozarsky K., Penman M., Basiripour L., Haseltine W., Sodroski J., Kreiger M. 1989. Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. AIDS* **2**: 163-169.

Kuiken, C.A., de Jong J.-J., Baan E., Keulen W., Tersmette M., Goudsmit J. 1992. Evolution of the V3 envelope domain in proviral sequences and isolates of human immunodeficiency virus type 1 during transition of the viral biological phenotype. *J. Virol.* **66**: 4622-4627.

Kuiken C.L., Goudsmit J., Weiller G.F., Armstrong J.S., Hartman S., Portegies P., Dekker J., Cornelissen M. 1995. Differences in human immunodeficiency virus type 1 V3 sequences from patients with and without AIDS dementia complex. *J Gen Virol* **76**(Pt 1): 175-80.

Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Landau N.R., Warton M. , Littman D.R. 1988. The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds the immunoglobulin-like domain of CD4. *Nature* **334**: 159-162.

Landau N.R., Page K.A., Littman D.R. 1991. Pseudotyping with human T-cell leukemia virus type 1 broadens the human immunodeficiency virus host range. *J. Virol.* **65**: 162-169.

Lane H.C., Depper, J.M., Greene W.C., Whalen G., Walkmann T.A., Fauci A.S. 1985. Qualitative analysis of immune fuction in patients with the acquired immunodeficiency symdrome. *N. Engl. J. Med.* **313**: 79-84.

Langhoff E., Terwilliger E.F., Bos H.J., Kalland K.H., Poznansky M.C., Bacon D.M., Haseltine W.A. 1991. Replication of HIV-1 in primary dendritic cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7998-8002.

Lapatto R., Blundell T., Hemmings A., Overington J., Wilderspin A., Merson J.R., Whittle P.J., Danley D.E., Geoghegan K.F. 1989. X-ray analysis of HIV-1 proteinase at 2.7 Å resolution confirms structural homology among retroviral enzymes. *Nature* **342**: 299-302.

LaRosa G.J., Davide J.P., Weinhold K., Waterbury J.A., Profy A.T., Lewis J.A., Langlois A.J., Dreesman G.R., Boswell R.N., Shadduck P., Holley L.H., Karplus M., Bolognesi D.P., Matthews T.J., Emini E.A., Putney S.D. 1990a. Conserved sequence and structural elements in the HIV-1 principal neutralizing determinant. *Science* **249**: 932-935.

LaRosa, G., Javaherian K., Profy A., Putney S., Matthews T., Shadduck P., Weinhold K., Bolognesi D., Boswell R.N., Emini E.A. 1990b. Variation of the principal neutralizing determinant of HIV-1 In "Vaccines 90", pp. 277-281. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.

Lasky L.A., Nakamura G., Smith D.H., Fennie C., Shimasaki C., Patzer E., Berman P., Gregory T., Capon D.J. 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* **50**: 975-985.

Laspia M.F., Rice A.P., Matthews M.B. 1989. HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell* **59**: 283-292.

Laurence J., Saunders A., Early E., Salmon J.E., 1990. Human immunodeficiency virus infection of monocytes: Relationship of Fc-gamma receptors and antibody dependent viral enhancement. *Immunology* **70**: 338-343.

Layne S.P., Merges M.J., Dembo M., Spouge J.L., Conley S.R., Moore J.P., Raina J.L., Renz H., Gelderblom H.R., Nara P.L. 1992. Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibity to neutralization of human immunodeficiency virus. *Virology.* **189**: 695-714.

Lee T.H., Coligan J.E., Allan J.S., McLane M.F., Groopman J.E., Essex M. 1986. A new HTLV-III/LAV protein encoded by a gene found in cytopathic retroviruses. *Science* **231**: 1546-1549.

Lee H., Swanson P., Shorty V.S., Zack J.A., Rosenblatt J.D., Chen I.S. 1989. High rate of HTLV-II infection in seropositive I.V. drug abusers in New Orleans. *Science* **244**: 471-475.

Leonard R., Zagury D., Desportes I., Bernard J., Zagury J.F., Gallo R.C. 1988. Cytopathic effect of human immunodeficency virus in T4 cells is linked to the last stage of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3570-3574.

Lever A., Gottlinger H., Haseltine W., Sodroski J. 1989. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J. Virol.* **63**: 4085-4087.

Levy J.A., Mackewicz C., Cheng-Mayer C. 1991. Natural antiviral responses in HIV infection, abstr. 1:58. VIIth Int. Conf. AIDS , Florence, Italy.

Levy J.A., 1994. HIV and the Pathogenesis of AIDS. *ASM Press*, Washington, D.C.

Li W.-H., Wu C.-I., Luo C.-C. 1985. A new method for estimating synonymous substitution and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Mol. Biol. Evol.* **2**: 150-174.

Lifson J.D., Coutre S., Huang E., Engleman E. 1986a. Role of envelope glycoprotein carbohydrate in human immunodeficiency virus (HIV) infectivity and virus-induced cell fusion. *J. Exp. Med.* **164**: 2101-2106.

Lifson J.D., Feinberg M.B., Reyes G.R., Rabin L., Banapour B., Chakrabarti S., Moss B., Wong-Staal F., Steimer K.S., Engleman R.G. 1986b. Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* **323**: 725-728.

Lifson J.D., Reyes G.R., McGrath M.S., Stein B.S., Engleman E.G. 1986c. AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* **232**: 1123-1127.

Lifson A.R., Buchbinder S.P., Sheppard H.W., Mawle A.C., Wilber J.C., Stanley M., Hart C.E., Hessol N.A., Holmberg S.D. 1991. Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: Immunologic and virologic characteristics. *J. Infect. Dis.* **163**: 959-965.

Lightfoote M.M., Coligan J. E., Folks T.M., Fauci A.S., Martin M.A., VenKatesan S. 1986. Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease polypeptides of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. *J. Virol.* **60**: 771-775.

Liou R., Rosen E., Fung M., Sun W., Sun C., Gorden W., Chang N., Chang T. 1989. A chimeric mouse-human antibody that retains specificity for HIV-2 gp120 and mediates the lysis of HIV-infected cells. *J. Immunol.* **143**: 3967-3975.

Liu Z.Q., Wood C., Levy J.A., Cheng-Mayer C. 1990. The viral envelope gene is involved in macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1 strain isolated from brain tissue. *J. Virol.* **64**: 6148-6153.

Ljunggren K., Bottinger B., Biberfield B., Karlson A., Fenyo E.M., Jondal M. 1987. Antibody-dependent cellular cytotoxicity inducing antibodies against human immunodeficiency virus: presence at different clinical stages. *J Immunol.* **139**: 2263-2267

Ljunggren K., Broliden P.A., Morfeldt, Manson L., Jondal M., Wahren B. 1988. IgG subclass response to HIV in relation to antibody dependent cytotoxicity at different clincal stages. *Clin Exp. Immunol.* **73**: 343-347.

Ljunggren K., Biberfeld G., Jondal M., Fenyo E.M. 1989a. Antibody-dependent cellular cytotoxicity detects group and strain antigens among HIV-1 and HIV-2 infected isolates. *J. Virol.* **63**: 3376-3381.

Ljunggren K., Chiodi F. , Broliden P.A., Albert J., Norkrans G., Hagberg L., Jondal M., Fenyo E.M. 1989b. HIV-1 specific antibodies in cerebrospinal fluid mediate cellular cytotoxicity and neutralization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5**: 629-638.

Ljunggren K., Karlson A., Fenyo E.M.,Jondal M. 1989c. Natural and antibody-dependent cytotoxicity in different clinical stages of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Exp. Immunol.* **75**: 184-189.

Los Alamos National Laboratory, 1991. Human Retroviruses and AIDS: A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences.

Lu Y.Y., Koga Y., Tanaka K., Sasaki M., Kimura G., Nomoto K. 1994. Apoptosis induced in CD4+ cells expressing gp160. of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **68**: 390-399.

Luciw P.A., Cheng-Meyer C., Levy J.A. 1987. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: The orf-E region down-regulates virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1434-1438.

Lukashov V.V., Kuiken C.L., Goudsmit J. 1995. Intrahost human immunodeficiency virus type 1 evolution is related to the length of the immunocompetent period. *J. Virol.* **69**: 6911-6916.

Lusso P., di Marzo Veronese F., Ensoli B., Franchini G., Jemma C., DeRocco J.E., Kalyanaraman V.S., Gallo R.C. 1990. Expanded HIV-1 cellular tropism by phenotypic mixing with murine endogenous retroviruses. *Science* **247**: 848-852.

Lyerly H.K., Matthews T. J., Langlois A.J., Bolognesi D.P., Weinhold K.J. 1987a. Human T-cell lymphotropic virus IIIB glycoprotein (gp120) bound to CD4 determinants on normal lymphocytes and expressed by infected cells serves as a target for immune attack. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4601-4605.

Lyerly H.K., Reed D., Matthews T.J., Langlois A.J., Ahearne P.A., Petteway S.R., Weinhold K.J. 1987b. Anti-gp120 antibodies from HIV seropositive individuals mediate broadly reactive anti-HIV ADCC. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **3**: 409.

Mackewicz C.E., Ortega H. W., Levy J.A. 1991. CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J. Clin. Invest.* **87**: 1462-1466.

Mackewicz C.E., Ortega H.W., Levy J.A. 1994. Effect of cytokines on HIV replication in CD4+ lymphocytes: lack of identity with the CD8+ cell antiviral factor. *Cell. Immunol.***153**: 329-343.

Maddon P.J., Littman D. R., Godfrey M., Maddon D.E., Chess L., Axel R. 1985. The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: A new member of the immunoglobulin gene family. *Cell* **42**: 93-104.

Maddon P.J., Dalgleish A. S., McDougal J.S., Clapham P.R., Weiss R.A., Axel R. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**: 333-348.

Maggi E., Macchia D., Parronchi P., Mazzatti M., Ravina A., Milo D., Romagnani S. 1987. Reduced production of interleukin 2 and interferon gamma and enhanced helper activity for IgG synthesis by cloned CD4+ T cells from patients with AIDS. *Eur. J. Immunol.* **17**: 1685-1690.

Malim M.H., Hauber J., Le S.Y., Maizel J.V., Cullen B.R. 1989. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**: 254-257.

Maniatis, T., Sambrook J., Fritsch E.F. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Marciniak R.A., Calnan B. J., Frankel A.D., Sharp P.A. 1990. HIV Tat protein trans-activates transcription *in vitro*. *Cell* **63**: 791-802.

Masur H., Michelis M.A., Greene J.B. 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia. *N. Engl. J.Med.* **305**: 1431-1438.

Matsuda Z., Chou M. J., Matsuda M., Huang J.H., Chen Y.M., Redfield R., Mayer K., Essex M., Lee T.H. 1988. Human immunodeficiency virus type 1 has an additional coding sequence in the central region of the genome. *Proc. Natl. Acad Sci USA* **85**: 6968-6972.

Matthews T.J., Weinhold K. J., Lyerly H.K., Langlois A.J., Wigzell H., Bolognesi D.P. 1987. Interaction between the human T-cell lymphotropic virus type IIIB envelope glycoprotein gp120 and the surface antigen CD4: Role of carbohydrate in binding and cell fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5424-5428.

McClure M.O., Marsh M., Weiss R.A. 1988. Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *EMBO J.* 7: 513-518.

McCune J.M., Rabin L.B., Feinberg M.B., Lieberman M., Kosek J.C., Reyes G.R., Weissman I.L. 1988. Endoproteolytic cleavage of gp 160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53**: 55-67.

McDougal J.S., Mawle A., Cort S.P., Nicholson J.K., Cross G.D., Scheppler-Campbell S.A., Hicks D., Sligh J. 1985. Cellular tropism of the human retrovirus HTLV III/LAV: I. Role of T cell activation and expression of the T4 antigen. *J. Immunol.* **135**: 3151-3162.

McKeating J.A., Gow J. , Goudsmit J., Pearl L.H., Mulder C., Weiss R.A. 1989. Characterization of HIV-1 neutralization escape mutants. *AIDS* **3**: 777-784.

McKeating J.A., Shotton C., Cordell J., Graham S. Balfe P., Sullivan N., Charles M., Page M., Bolmstedt A., Olofsson S., Kayman S.C., Wu Z., Pinter A., Dean C., Sodroski J., Weiss R.A. 1993. Characterization of neutralizing monoclonal antibodies to linear and conformation-dependent epitopes within the first and second variable domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* **67**: 4932-4944.

Merzouki A., Patel P., Cassol S., O'Shaughnessy M., Gill J., Arella M. 1994a. HIV-1 gp 120/160 expressing transfected cell clones to evaluate the antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) during the course of HIV-1 infection. *J Virol. Meth.* **48**: 9-22.

Merzouki A., Mo T., Vellani N., Pattullo A., Estable M., O'Shaughnessy M., Tsoukas C., Cassol S. 1994b. Accurate and differential quantitation of HIV-1 *tat*, *rev* and *nef* mRNAs by competitive PCR. *J Virol. Meth.* **50**: 115-128.

Merzouki A., Patel P., Cassol S., Ennaji M., Tailor P., Turcotte F.R., O'Shaughnessy M., Arella M. 1995. HIV-1 GP120/160 Expressing Cells Upregulate HIV-1 LTR Directed Gene Expression in a cell line Transfected with HIV-1-LTR-Reporter Gene Constructs. Cell. Mol. Biol. 41: 445-452.

Meyerhans A., Cheynier R., Albert J., Seth M., Kwok S., Sninsky J., Morfeldt-Manson L., Asjo B., Wain-Hobson S. 1989. Temporal fluctuations in HIV quasispecies *in vivo* are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* **58**: 901-910.

Michael N., Mo T., Merzouki A., O'Shaughnessy M., Oster C., Burke D.S., Redfield R.R., Birx D.L., Cassol S.A. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 cellular RNA load and splicing patterns predict disease progression in a longitudinally studied cohort. *J. Virol.* **69**: 1868-1877.

Miedema F., Petit A.J.C., Terpstra F.G., Eeftinck Schattenkerk J.K.M., de Wolf F., Al B.J.M., Roos M., Lange J.A.M., Danner S.A., Goudsmit J., Schellenkens P.T.A. 1988. Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. *J.Clin. Invest.* **82**: 1904-1914.

Miedema F., Tersmette M., Van Lier R.A.W. 1990. AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system. *Immunol. Today* **11**: 293-297.

Mierendorf R. C., Pfeffer D. 1987. Direct sequencing of denatured plasmid DNA. *Methods in Enzymology* **152**: 556-562.

Modrow S., Hahn B.H., Shaw G.M., Gallo R.C., Wong-Staal F., Wolf H. 1987. Computer assisted analysis of envelope protein sequences of seven human immunodeficiency virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J. Virol.* **61**: 570-578.

Monteiro-Grillo M., Sousa A.P., Galvao J., Yueh M., Neves C., Ribeiro-da-Silva J. 1993. Clinical correlations in HIV-1 et HIV-2 infected patients. Euro. *J. Ophthalmol.* 3:13-20.

Montpetit M., Cassol S., Salas T., O'Shaughnessy M. 1992. OLIGOSCAN: a computer program to assist in the design of primers homologous to multiple DNA sequences. *J. Virol. Meth.* **36**: 119-128

Moore J.P., McKeating J.A., Norton W.A., Sattentau Q.J. 1991. Direct measurement of soluble CD4 binding to human immunodeficiency virus type 1 virions: gp120 dissociation and its implications for virus-cell binding and fusion reactions and their neutralization by soluble CD4. *J. Virol.* **65**: 1133-1142.

Moore J.P., Ho D.D. 1993. Antibodies to discontinuous or conformationally sensitive epitopes on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 are highly prevalent in sera of infected humans. *J. Virol.* **67**: 863-875.

Mosca J.D., Bednarik D.P., Raj N.B.K., Rosen C.A., Sodroski J. G., Haseltine W.A., Pitha P.M. 1987. Herpes simplex virus type 1 can reactivate transcription of latent human immunodeficiency virus. *Nature* **325**: 67-70.

Mous J., Heimer E.P., Le Grice S.F. 1988. Processing protease and reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1 polyprotein in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **62**: 1433-1436.

Muesing M.A., Smith D.H., Cabradilla C.D., Benton C.V., Lasky C.A., Capon D.J. 1985. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* **313**: 450-458.

Muesing M.A., Smith D.H., Capon D.J. 1987. Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus. *Cell* **48**: 691-701.

Murakami T., Hattori T., Takatsuki K. 1991. A principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 interacts with proteinase-like molecule(s) at the surface of Mole-4 clone 8 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1079**: 279-284.

Murakami T., Matsushita S., Maeda Y., Takatsuki K., Uchiyama T., Hattori T. 1993. Applications of biotinylated V3 looppeptides of human immunodeficiency virus type 1 to flow cytometric analyses and affinity chromatographic techniques. *Biochim Biophys. Acta* **1181**: 155-162.

Muster T., Steindl F., Purtscher M., Trkola A., Klima A., Himmler G., Ruker F., Katinger H. 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **67**: 6642-6647.

Myers G., MacInnes K., Korber B. 1992. The emergence of simian/human immunodeficiency viruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**: 373-386.

Myers G., Korber B., Wain-Hobson S., Smith R.F., Pavlakis G.N. 1993. Human retroviruses and AIDS 1993, I-V. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos N.M.

NIH Publication, No. 94-1536. 1994. AIDS Research and Reference Reagent Program Catalog.

Nara P.L., Smit L., Dunlop N., Hatch W., Merges M., Waters D., Kelliher J., Gallo R.C., Fischinger P.G., Goudsmit J. 1990. Emergence of viruses resistant to neutralization by V3-specific antibodies in experimental human immunodeficiency virus type 1 IIIB infection of chimpanzees. *J. Virol.* **64**: 3779-3791.

Nara, P. Retroviruses of Human AIDS and Related Animal Diseases, pages, journal et maion d<édition 1991.

Navia M.A., Fitzgerald P.M., McKeever B.M., Leu C.T., Heimbach J.C., Herber W.K., Sigal I.S., Darke P.L., Springer J.P. 1989. Three-dimensional structure of aspartyl protease from human immunodeficiency virus HIV-1. *Nature* **337**: 615-620.

Nei M., Gojobori T. 1986. Simple methods for estimating the number of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol.Biol. Evol.* **3**: 418-426.

Nielsen C., Pederson C., Lundgren J.D., Gerstoft J. 1993. Biological properties of HIV isolates in primary HIV infection: consequences for the subsequent course of infection. *AIDS* **7**: 1035-1040.

Nixon D.F., Townsend A.R., Elvin J.G., Rizza L.R., Gallwey J., McMichael A.J. 1988. HIV-I gag-specific cytotoxic T lymphocytes defined with recombinant vaccinia virus and synthetic peptides. *Nature* **336**: 484-487.

Nolan G.P., Ghosh S., Liou H.C., Tempst P., Baltimore D. 1991. DNA binding and IkB inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kB, rel-related polypeptide. *Cell* **65**: 961-969.

Norley S.G., Mikschy U., Werner A., Staszewski S., Helm E.B., Kurth R. 1990. Demonstration of cross-reactive antibodies able to elicit lysis of HIV-1 and HIV-2-infected cells. *J. Immunol.* 145:1700-1705.

Nowak M.A. May R.M., Anderson R.M. 1990. The evolutionary dynamics of HIV-1 quasispecies and the development of immunodeficiency disease. *AIDS* **4:** 1095-1103.

Nowak M.A. Anderson R.M., McLean A.R., Wolfs T.F., Goudsmit J., May R.M. 1991. Antigenic diversity thresholds and the development of AIDS. *Science* **254**: 963-969.

Nowak M.A. May R.M., Phillips R.E., Rawland-Jones S., Lalloo D.G., McAdam S., Klenerman P., Koppe B., Sigmund K., Bangham C.R. 1995. Antigenic oscillations and shifting immunodominance in HIV-1 infection. *Nature* **375** : 606-611.

Nuovo G.J. Becker J., Bark M.W., Margiotta M., Fuhrer J., Steigbigel R.T. 1994a. *In situ* detection of PCR-amplifed HIV-1 nucleic acids in lymph nodes and peripheral blood in patients with asymptomatic HIV-1 infection and advanced stage AIDS. *J. AIDS* 7: 916-923.

Nuovo G.J., Gallery F., MacConnell P., Braun A. 1994b. *In situ* detection of PCR-amplified HIV-1 nucleic acids and tumor necrosis factor alpha RNA in the central nervous system. *Am. J. Pathol.* **144**: 659-666.

Nutt R.F., Brady S.F., Darke P.L., Ciccarone T.M., Colton C.D., Nutt E.M., Rodkey J.A., Bennett C.D., Waxman L.H., Sigal I.S. 1988. Chemical synthesis and enzymatic activity of a 99-residue peptide with a sequence proposed for the human immunodeficiency virus protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7129-7133.

O'Brien W.A., Koyanagi Y., Namazie A., Zhao J.Q., Diagne A., Idler K., Zack J.A., Chen I.S. 1990. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain. *Nature* **348**: 69-73.

Ojo-Amaize E.A., Nishanian P., Keith D.E. Jr., Houghton R.L., Heitjan D.F., Fahey J.L., Giorgi J.V. 1987. Antibodies to human immunodeficiency virus in human sera induce cell-mediated lysis of human immunodeficiency virus-infected cells. *J. Immunol.* **139**: 2458-2463.

Ojo-Amaize E., Nishabuab P.G., Heitjan D.F., Rezai A., Esmail I., Korns E., Detels R., Fahey J., Giorgi J.V. 1989. Serum and effector-cell antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity remains high during human immunodeficiency virus (HIV) disease progression. *J. clin. Immunol* **9**: 454.

Olshevsky U., Helseth E., Furman C., Li J., Haseltine W.A., Sodroski J. 1990. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acid important for CD4 receptor binding. *J. Virol.* **64**: 5701-5707.

Ozel M., Pauli G., Gelderblom H.R. 1988. The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch. Virol.* **100**: 255-266.

Pal R., Reitz M. S. Jr., Tschachler E., Gallo R.C., Sarngadharan M.G., Veronese F.D. 1990. Myristylation of gag proteins of HIV-1 plays an important role in virus assembly. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**: 721-730.

Palker T.J., Clark M.E., Langlois A.J., Matthew T.J., Weinhold K.J., Randall R.R., Bolognesi D.P., Haynes B.F. 1988. Type-specific neutralization of the human immunodeficiency virus with antibodies to env-encoded synthetic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 1932-1936.

Pang S., Koyanagi Y., Miles S., Wiley C., Vinters H.V., Chen I.S.Y. 1990. High levels of unintegrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients. *Nature* **343**: 85-89.

Pantaleo G., DeMaria A., Koenig S., Butini L., Moss B., Baseler M., Lane H.C., Fauci A.S. 1990. CD8+ T lymohocytes of patients with AIDS maintain normal broad cytolytic function despite the loss of human immunodeficiency virus-specific cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4818-4822.

Pantaleo G. Butini L., Graziosi C., Poli G., Schnittman S.M., Greenhouse J.J., Gallin J.I., Fauci A.S. 1991. Human immunodeficiency virus (HIV) infection in CD4+ T lymphocytes genetically deficient in LFA-1: LFA-1 is required for HIV-mediated cell fusion but not for viral transmission. *J. Exp. Med.* **173**: 511-514.

Pantaleo G., Graziosi C., Demarest J.F., Butini L., Montroni M., Fox C.H., Orenstein J.M., Kotler D.P., Fauci A.S. 1993a. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of the disease. *Nature* **362**: 355-358.

Pantaleo G., Graziosi C., Fauci A.S. 1993b. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **328**: 327-335.

Patel P., Menezes J. 1982. Epstein-Barr virus (EBV)-lymphoid cell interactions: the influence of the EBV replication cycle on natural killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity against EBV-infected cells. *Clin Exp Immunol.* **48**: 589-601.

Patterson S., Knight S.C. 1987. Susceptibility of human peripheral blood dendritic cells to infection by human immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.* **68**: 1177-1181.

Patterson B.K., Till, M., Otto P., Goolsby C., Furtado M.R., McBride L.J., Wolinsky S.M. 1993. Detection of HIV-1 DNA and messenger RNA in individual cells by PCR driven *in situ* hybridization and flow cytometry. *Science* **260**: 976-979.

Pauza C.D., Price T.M. 1988. Human immunodeficiency virus infection of T cells and monocytes proceeds via receptor-mediated endocytosis. *J. Cell. Biol.* **107**: 959-968.

Peeters M., Gershy-Damet C.-Y., Fransen K., Koffi K., Coulibaly M., Delaporte E., Piot P., van der Groen. 1992. Virological and polymerase chain reaction studies of HIV-1/HIV-2 dual infection in Cote d'Ivoire. *Lancet* **340**: 339-340.

Peng C., Ho B. K., Chang T.W., Chang N.T. 1989. Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. *J. Virol.* **63**: 2550-2556.

Perez L.G., O'Donnell M.A., Stephens E.B. 1992. The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncitium formation in the absence of the receptor binding glycoprotein. *J. Virol.* **66**: 4134-4143.

Petersen L.R., Satten G., Dodd R.Y. 1992. Current estimates of the infectious window period and risk of HIV infections from seronegative blood donations, p. 37, abstr. P13T. 5th Natl. Forum AIDS Hepatitis Other Blood-Borne Dis., Atlanta.

Phillips, R.E., Rowland-Jones S., Nixon D.F., Gotch F.M., Edwards J.P., Ogunlesi A.O., Elvin J.G., Rothbard J.A., Bangham C.R.M., Rizza C.R., McMichael A.J. 1991. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* **354**: 453-459.

Piatak, M., Jr., Saag S., Yang L.C., Knappes J.C., Luk K.-C., Hahn B.H., Shaw G.M., Lifson J.D. 1993. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**: 1749-1754.

Pinter A., Honnen W.J., Tilley S.A., Bona C., Zaghouani H., Gorny M.K., Zolla-Pazner. 1989. Oligomeric structure of gp41, the transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **63**: 2674-2679.

Pinter A. Honnen W.J., Tilley S.A. 1993. Conformational changes affecting the V3 and CD4-binding domains of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 associated with env processing and with bonding of ligands to these sites. *J. Virol.* **67**: 5692-5697.

Pomerantz R. J., Seshamma,.T., Trono D. 1992, Efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 requires a threshold level of Rev: Potential implications for latency. *J. Virol.* **66**: 1809-1813.

Popovic M., Sarngadharan M.G., Read E., Gallo, R.C. 1984. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**: 497-500.

Porcher C., Malinge M.C., Picat C., Grandchamp B. 1992. A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequencer. *Biotechniques* **13**: 106-113.

Preston B.D., Poiesz B.J., Loeb L.A. 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **242**: 1168-1171.

Pulliam L., Herndier B.G., Tang N.M., McGrath M.S. 1991. Human immunodeficiency virus infected macrophage produce soluble factors that cause histological and neurochemical alterations in cultured human brains. *J. Clin. Invest.* **87**: 503-512.

Purcell D.F., Martin M.A. 1993. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J. Virol.* **67**:6365-6378.

Putney S.D., Matthews T. J., Robey W.G., Lynn D.L., Robert-Guroff M., Mueller W.T., Langois A.J., Ghrayeb J., Petteway S.R. Jr., Weinhold K.J. 1986. HTLV-III/LAV-neutralization antibodies to an *E. coli*-produced fragment of the virus envelope. *Science* **234**: 1392-1395.

Qian J., Bours V., Manischewitz J., Blackburn R., Siebenlist U., Golding H. 1994. Chemically selected subclones of the CEM cell line demonstrate resistance to HIV-1 infection resulting from a selective loss of NF-kB DNA binding proteins. *J. Immunol.* **152**: 4183-4191.

Raja N.U., Vincent M.J., Abdul Jabbar M. 1994. Vpu-mediated proteolysis of gp160/CD4 chimeric envelope glycoproteins in the endoplasmic reticulum: requirement of both the anchor and cytoplasmic domains of CD4. *Virology* **204**: 357-366.

Ratner L., Vander Heyden N., Garcia J., Polinsky M., Westervert P., Becich M. 1991. Formation of non-infectious HIV-1 virus particles lacking a full-length envelope protein. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **7**: 287-294.

Reisinger E.C., Vogetseder W., Berzow D., Kofler D., Bitterlich G., Lehr H.A., Wachter H., Dierich M.P. 1990. Complement-mediated enhancement of HIV-1 infection of the monoblastoid cell line U937. *AIDS* **4**: 961-965.

Reitz M.S. Jr, Wilson C., Naugle C., Gallo R.C., Robert-Guroff M. 1988. Generation of a neutralization-resistant variant of HIV-I is due to selection for a point mutation in the envelope gene. *Cell* **54**: 57-63.

Richman D.D., Bozzette S.A. 1994. The impact of the syncytium-inducing pheotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J. Infect. Dis.* **169**: 968-974.

Rinaldo C.R., Huang X.L., Fan Z.F., Ding M., Beltz L., Logar A., Panicali D., Mazzara G., Liebmann J., Cottrill M. 1995. High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J. Virol.* **69**: 5838-5842.

Riviere Y., Tanneau-Salvadori F., Regnault A., Lopez O, Sansonetti P, Guy B, Kieny MP, Fournel JJ, Montagnier L. 1989. Human immunodeficiency virus-specific cytotoxic responses of seropositive individuals: Distinct types of effector cells mediate killing of targets expressing gag and env proteins. *J. Virol.* **63**: 2270-2277.

Robert-Guroff M., Popovic M., Gartner S., Markham P., Gallo R.C., Reitz M.S. 1990. Structure and expression of Tat-, Rev-, and Nef-specific transcripts of human immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages. *J. Virol.* **64**: 3391-3398.

Roberts J.D., Bebenek K., Kunkel T.A. 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**: 1171-1173.

Robey W.G. Safai B., Oroszlan S., Arthur LO, Gonda MA, Gallo RC, Fischinger PJ. 1985. Characterization of envelope and core structural geneproducts of HTLV-III with sera from AIDS patients. *Science* **228**: 593-595.

Romagnani, S. 1992. Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the "natural" immune response? *Immunol. Today* **13**: 379-381.

Romieu I., Marlink R., Kanki P., M'Boup S., Essex M. 1990. HIV-2 link to AIDS in West Africa. *J AIDS.* 3:220-230

Rook A.H., Lane H. C., Folks T., McCoy S, Alter H, Fauci AS., 1987. Sera from HTLV-III/ LAV antibody-positive individuals mediate antibody-dependant cellular cytotoxicity against HTLV-III/LAV infected T cells. *J. Immunol.* **138**: 1064-1067.

Roos M.T.L., Lange J.M.A., de Goede R.E.Y., Coutinho R.A., Schellenkens P.T.A., Miedema F., Termsette M. 1992. Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Infect. Dis.* **165**: 427-432.

Rosen C.A., Sodroski J.G., Haseltine W.A. 1985. The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell* **41**: 813-823.

Rosen C.A., Terwilliger E. , Dayton A., Sodroski J.G., Haseltine W.A., 1988. Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2071-2075.

Roy S., Parkin N. T., Rosen C., Itovitch J., Sonenberg N. 1990. Structural requirements for trans-activation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat-directed gene expression by Tat: Importance of base pairing, loop sequence, and bulges in the Tat-responsive sequence. *J. Virol.* **64**: 1402-1406.

Rudd C.E., Trovillyan J.M., Dasgupta J.D., Wong L.L., Schassman J.F. 1988. The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5190-5194.

Rusche J.R., Javaherian K. , McDanal C., Petro J., Lynn D.L., Grimaila R., Langlois A., Gallo R.C., Arthur L.O., Fischinger P.S., Bolognesi D.P., Putney S.D., Matthews T.J. 1988. Antibodies that inhibit fusion of human immunodeficiency virus-infected cells bind a 24-amino acid sequence of the viral envelope gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 3198-3202.

Rutherford G.W., Lifson A.R., Hessol N.A. 1990. Course of HIV-1 infection in a cohort of homosexual and bisexual men: an 11 year follow up study. *Br. Med J.* **301**: 1183-1188.

Saag M.S., Hahn B. H., Gibbons J., Li Y, Parks ES, Parks WP, Shaw GM., 1988. Extensive variation of human immunodeficiency virus type-1 *in vivo*. *Nature* **334**: 440-444.

Sabatier J.-M., Vives E., Mabrouk K., Benjouad A., Rochat H., Duval A., Hue B., Bahraoui E. 1991. Evidence for neurotoxic activity of Tat from human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **65**: 961-967.

Sadat-Sowti B., Debre P., Idziorek T., Guillon J.M., Hadida F., Okzenhendler E., Katlama C., Mayaud C., Autran B. 1991. A lectin-binding soluble factor released by CD8+CD57+lymphocytes from AIDS patients inhibits T cell cytotoxicity. *Eur. J. Immuol.* **21**: 737-741.

Sakai K., Dewhurst S., Ma X., Volsky DJ., 1988. Differences in cyto-pathicity and host cell range among infectious molecular clones of human immunodeficiency virus type 1 simultaneously isolated from an infected individual. *J. Virol.* **62**: 4078-4085.

Salacinski P.R.P., McLean C., Sykes J.E.C., Clement-Jones V.V., Lowry P.J., 1981. Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid-phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphenyl glycoluril (Iodogen). *Anal. Biochem.* **117**: 136-146.

Salahuddin S.Z., Ablashi D. V., Markham P.D., Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, Halligan G, Biberfeld P, Wong-Staal F, Kramarsky B. 1986. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* **234**: 596-601.

Sattentau Q.J., Moore J.P. 1991. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J. Exp. Med.* **174**: 407-415.

Schnittman S.M., Psallidopoulos M. C., Lane H.C., Thompson L., Baseler M., Massari F., Fox C.H., Salzman N.P., Fauci A.S. 1989. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* **245**: 305-308.

Schuitemaker H., Koot M., Kootstra N.A., Dercksen M.W., de Goede R.E.Y., van Steenwijk R.P., Lange J.M.A., Schattenkerk J.K.M., Miedema F., Tersmette M. 1992. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus populations. *J. Virol.* **66**: 1354-1360.

Schwartz S., Felber B.K., Benko D.M, Fenyo EM, Pavlakis GN. 1990. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **64**: 2519-2529.

Selby M.J., Bain E.S., Luciw P.A., Peterlin B.M., 1989. Structure, Sequence, and position of the Stem-Loop in tar determine Transcriptional Elongation by tat through the HIV-1-LTR. *Genes & Development*. 3: 547-558.

Seshamma T., Bagasra O., Trono D., Baltimore D., Pomerantz R. J. 1992. Blocked early-stage latency in the peripheral blood cells of certain individuals infected with human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10663-10667.

Sharer L.R., Eun-Sook C., Epstein L.G. 1985. Multinucleated giant cells and HTLV-III in AIDS encephalopathy. *Hum. Pathol.* **16**: 760.

Shearer G.M., Clerici M. 1991. Early T-helper cell defects in HIV infection. *AIDS* **5**: 245-253.

Sher A., Gazzinelli R.T., Oswald I.P., Clerici M., Kullberg M., Pearce E.J., Berzofsky J.A., Mosmann T.R., James S.L., Morse III H.C., Shearer G.M. 1992. Role of T cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol. Rev.* **127**: 183-204.

Shioda T., Levy J. A., Cheng-Mayer C. 1992. Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T cell line and macrophage tropisms of human imunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **89**: 9434-9438.

Shioda T., Oka S., Ida S., Nokihara K., Toriyoshi H., Mori S., Takebe Y., Kimura S., Shimada K., Nagai Y. 1994. A Naturally Occurring Single Basic Amino Acid Substitution in the V3 Region of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Env Protein Alters the Cellular Host Range and Antigenic Structure of the Virus. J. *Virol* **68**: 7689-7696.

Simmonds P., Balfe P., Ludham C.A., Bishop J.O., Brown A.J. 1990a. Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **64**: 5840-5850.

Simmonds P., Balfe P., Peutherer J.F., Ludlam C.A., Bishop J.O., Brown A.J. 1990b. Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J. Virol.* **64**: 864-872.

Skinner M.A., Langlois A. J., McDanal C.B., McDougal J.S., Bolognesi D.P., Matthews T.J. 1988. Neutralizing antibodies to an immunodominant envelope sequence do not prevent gp120 binding to CD4. *J. Virol.* **62**: 4195-4200.

Sodroski J., Patarca R., Rosen C., Wong-Staal F., Haseltine W. 1985. Location of the trans-activating region of the genome of the human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* **229**: 74-77.

Sodroski J., Goh W. C., Rosen C., Dayton A., Terwilliger E., Haseltine W. 1986a. A second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* **321**: 412-417.

Sodroski J., Goh W.C., Rosen C., Campbell K., Haseltine W.A. 1986b. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* **322**: 470-474.

Somasundaran M., Robinson H.L. 1987. A major mechanism of human immunodeficiency virus-induced cell killing does not involve cell fusion. *J. Virol.* **61**: 3114-3119.

Sonigo P., Alizon M. , Staskus K., Klatzmann D, Cole S, Danos O, Retzel E, Tiollais P, Haase A, Wain-Hobson S., 1985. Nucleotide sequence of the visna lentivirus: Relationship to the AIDS virus. *Cell* **42**: 369-382.

Spector D.H., Wade E. , Wright D.A., Koval U., Clark C., Jaquish D., Spector S.A. 1990. Human immunodeficiency virus pseudotypes with expanded cellular and species tropism. *J. Virol.* **64**: 2298-2308.

Stamatatos L., Werner A., Cheng-Mayer C. 1994. Differential regulation of cellular tropism and sensitivity to soluble to soluble CD4 neutralization by the envelope gp120 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **68**: 4973-4979.

Stanley S.K., Folks T.M., Fauci A.S. 1989. Induction of expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected promonocytic cell line by ultraviolet radiation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **5**: 375-384.

Steimer K.S., Klasse P.J., McKeating J.A. 1991a. HIV-1 neutralization directed to epitopes other than linear V3 determinants. *AIDS* **5**: S135-S143.

Steimer K.S., Scandella C.J., Skiles P.V., Haigwood N.L. 1991b. Neutralization of divergent HIV-1 isolates by conformation-dependent human antibodies to gp120. *Science* **254**: 105-108.

Stein B.S., Gowda SD., Lifson J., Penhallow R.C., Bensch KG., Engleman E.G. 1987. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* **49**: 659-668.

Stein B.S., Engleman E.G. 1990. Intracellular processing of gp160 HIV-1 envelope precursors. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **265**: 2640-2649.

Stephens R.M., Casey J. W., Rice N.R., 1986. Equine infectious anemia virus *gag* and *pol* genes: Relatedness to visna and AIDS virus. *Science* **231**: 589-594.

Strebel K., Klimkait T., Martin M.A. 1988. A novel gene of HIV-1, *vpu* and its 16 kilodalton product. *Science* **241**: 1221-1223.

Sun N.-C., Ho D. D., Sun C.R.Y., Liou R.S., Gordon W., Fung M.S., Li X.L., Ting R.C., Lee T.H., Chang N.T. 1989. Generation and characterization of monoclonal antibodies to the putative CD4-binding domain of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* **63**: 3579-3585.

Sundstrom C., Nilsson K. 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic/lymphoma cell line (4937). *Int. J. Cancer* **17**: 565-577.

Takahashi H., Merli S., Putney S.D., Houghten R., Moss B., Germain R.N., Berzofsky J.A.. 1989a. A single amino acid interchange yields reciprocal CTL specificities for HIV-1 gp 160. *Science* **246** : 118-121.

Takahashi I., Takama M., Ladhoff A.M., Scholz D., 1989b. Envelope structure model of human immunodeficiency virus type 1. *J. AIDS* **2**: 136-140.

Takeuchi Y., Nagumo T., Hoshino H. 1988. Low fidelity of cell-free DNA synthesis by reverse transcriptase of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **62**: 3900-3902.

Tang S., Levy J.A. 1990. Parameters involved in the cell fusion induced by HIV. *AIDS* **4**: 409-414.

Tanneau F., McChesney M., Lopez O., Sansonetti P., Montagnier L., Riviére Y. 1990. Primary cytotoxicity against the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: evidence for antibody-dependent cellular cytotoxicty in vivo. *J. Infect Dis.* **162**: 837-843.

Tateno M., Gonzalez-Scarano F., Levy J.A. 1989. The human immunodeficiency virus can infect CD4-negative fibroblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4287-4290.

Tersmette M., de Goede R.E., Al B.J., Winkel IN, Gruters RA, Cuypers HT, Huisman HG, Meidema F., 1988. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: Frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J. Virol.* **62**: 2026-2032.

Tersmette M., Gruters R. A., de Wolf F., de Goede RE, Lange JM, Schellekens PT, Goudsmit J, Huisman HG, Miedema F., 1989. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: Studies on sequential HIV isolates. *J. Virol.* **63**: 2118-2125.

Terwilliger E.F., Cohen E. A., Lu Y.C., Sodroski J.G., Haseltine W.A. 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5163-5167.

Thali M., Furman C., Wahren B., Posner M., Ho D.D., Robinson J., Sodroski J. 1992. Cooperativity of neutralizing antibodies directed against the V3 and CD4 binding regions of the human immunodeficiency virus gp120 envelope glycoprotein. *J. AIDS.* **5**: 591-599.

Tindall B., Cooper D.A. 1991. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* **5**: 1-14.

Toohey M.G., Jones K.A., 1989. In vitro formation of Short RNA Polymerase II transcripts that terminate within the HIV-1 and HIV-2 promoter-proximal downstream regions. *Genes & Development*. 3: 265-282.

Tritch R.J., Cheng Y.E., Yin F.H., Erickson-Viitanen S. 1991. Mutagenesis of protease cleavage sites in the human immunodeficiency virus type 1 gag polyprotein. *J. Virol.* **65**: 922-930.

Truneh A., Buck D., Cassatt D.R., Juszczak R., Kassis S., Ryu S.E., Healey D., Sweet R., Satttentau Q. 1991. A region in domain 1 of CD4 distinct from the primary gp120 binding site is involved in HIV infection and virus-mediated fusion. *J. Biol. Chem.* **266**: 5942-5948.

Tyler D.S., Lyerly H.K., Weinhold K.J. 1989. Anti-HIV-1 ADCC. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **5**: 557-563.

Tyler D.S., Stanley S. D., Nastala C.A., Austin A.A., Bartlett J.A., Stine K.C., Lyerly H.K., Bolognesi D.P., Weinhold K.J. 1990a. Alterations in antibody-dependent cellular cytotoxicity during the course of HIV infection. Humoral and cellular defects. *J. Immunol.* **144**:3375-3384.

Tyler D.S., Stanley S. D., Zolla-Panzer S., Gorny M.K., Shadduck P.P., Langlois A.J., Matthews T.J., Bolognesi D.P., Palker T.J., Weinhold KJ. 1990b. Identification of sites within gp41 that serve as target for antibody-dependent cellular cytotoxicity by using human monoclonal antibodies. *J. Immunol.* **145**:3276-3282.

Varmus H. 1988. Retroviruses. *Science* **240**: 1427-1435.

Vanden Haeselvelde M., Decourt J.L., De Leys R.J., Vanderborght B., van der Droen G., van Heuverswijn H., Saman E. 1994. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J. Virol.* **68**: 1586-1596.

Veillette A., Bookman M.A., Horak E.M., Bolan J.B. 1988. The CD4 and CD8 T-cell surface antigens are associated with the infected membrane tyrosine protein kinase $p56^{lck}$. *Cell* **55**: 301-308.

von Briesen H., Andreesen R., Rubsamen-Waigmann H. 1990. Systematic classification of HIV biological subtypes on lymphocytes and monocytes/macrophages. *Virology* **178**: 597-602.

Von Gegerfelt A., Diaz-Pohl C., Fenyo E.M., Broliden K. 1993. Specificity of ADCC in sera from HIV-2 infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 9:883-889.

Wain-Hobson S., Sonigo P., Danos O., Cole S., Alizon M. 1985. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* **40**: 9-17.

Walker C.M., Moody D. J., Stites D.P., Levy J.A. 1986. CD8+ lymphocytes can control HIV infection *in vitro* by suppressing virus replication. *Science* **234**: 1563-1566.

Walker B.D., Chakrabarti S., Moss B., Paradis T.J., Flynn T., Durno A.G., Blumberg R.S., Kaplan J.C., Hirsch M.J., Schooley R.T. 1987. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* **328**: 345-348.

Walker B.D., Plata F. 1990. Cytotoxic T lymphocytes against HIV. *AIDS* **4**: 177-184.

Weber I.T., Miller M., Jaskolski M. 1989. Molecular modeling of the HIV-1 protease and its substrate binding site. *Science* **243**: 928.

Weeks K.M., Ampe C., Schultz S.C., Steitz T.A., Crothers D.M. 1990. Fragments of the HIV-1 tat protein specifically bind TAR RNA. *Science* **249**: 1281-1285.

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., Shaw G.M. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**: 117-122.

Weinhold K.J., Lyerly H. K., Matthews T.J, Tyler D.S., Ahearne P.M., Stine K.C., Langlois A.J., Durack D.T., Bolognesi D.P. 1988. Cellular anti-gp120 cytolytic reactivities in HIV-1 seropositive individuals. *Lancet* **1**: 902-905.

Weiss R.A., Clapham P. R., Weber J.N, Dalgleish A.G., Lasky L.A., Berman P.W. 1986. Variable and conserved neutralization antigens of human immunodeficiency virus. *Nature* **324**: 572-575.

Weiss S.H., Goedert J.J., Gartner S., Popovic M., Waters D., Markham P., di Marzo Veronese F., Gail M.H., Barkley W.E., Gibbon S.J. 1988. Risk of human immunodeficiency virus (HIV-1) infection among laboratory workers. *Science* **239**: 68-71.

Weiss C.D., Levy J.A., White J.M. 1990. Oligomeric organization of gp120 on infectious human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* **64**: 5674-5677.

Werner T., Ferroni S., Saermark T., Brack-Werner R., Banati R.B., Mager R., Steinaa L., Kreutzberg G.W., Erfle V. 1991. HIV-1 *nef* protein exhibits structural and functional similarity to scorpion peptides interacting with K+ channels. *AIDS* **5**: 1301-1308.

White J., Kielian M., Helenius A. 1983. Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. *Q. Rev. Biophys.* **16**: 151-195.

Wilks D., Walker L., O'Brien J., Habeshaw J., Dalgleish A. 1990. Differences in affinity of anti-CD4 monoclonal antibodies predict their effects on syncytium induction by human immunodeficiency virus. *Immunology* **71**: 10-15.

Willey R.L., Ross E.K., Buckler-White A.J., Theodore T.S., Martin M.A. 1989. Functional interaction of constant and variable domains of HIV-1 gp120. *J. Virol.* **63**: 3595-3600.

Willey R.L., Maldarelli F., Martin M.A., Strebel K. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J. Virol.* **66**:226-234.

Wlodawer A., Miller M. , Jaskolski M, Sathyanarayana BK, Baldwin E, Weber IF, Selk LM, Clawson L, Schneider J, Kent SB. 1989. Conserved folding in retroviral proteases: Crystal structure of a synthetic HIV-1 protease. *Science* **245**: 616-621.

Wolfs T.F.W., de Jong J.J., Van den Berg H., Tunagel J.M.G.H., Krone W.J.A., Goudsmit J. 1990. Evolution of sequences encoding the principal neutralization epitope of HIV-1 is host-dependent, rapid and continuous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 9938-9942.

Wrin T.L., Crawford L., Sawyer L., Weber P., Sheppard H.W., Hanson C.V. 1994. Neutralizing antibody responses to autologous and heterologous isolates of human immunodeficiency virus. *J. AIDS.* **7**: 211-219.

Yahi N.S., Baghdiguian S., Moreau H., Fantini J. 1992. Galatosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on the human colon epithelial HT29 cells. *J. Virol.* **66**: 4848-4854.

York-Higgins D., Cheng-Meyer C., Bauer D., Levy J.A., Dina D. 1990. Human immunodeficiency virus type 1 cellular host range, replication, and cytopathicity are linked to the envelope region of the viral genome. *J. Virol.* **64**: 4016-4020.

Yu X.F., Matsuda M., Essex M., Lee T.H. 1990. Open reading frame *vpr* of simian immunodeficiency virus encodes a virion-associated protein. *J. Virol.* **64**: 5688-5693.

Yu X., Xin Y., Matsuda Z., Lee T.H., Essex M. 1992. The matrix protein of human immunodeficiency vorus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J. Virol.* **66**: 4966-4971.

Zinkernagel R.M. 1995. Are HIV-specific CTL responses salutary or pathogenic? *Curr. Opin Immunol.* **7**: 462-470.

Zhu Z.H., Chen S.S., Huang A.S. 1990. Phenotypic mixing between human immunodeficiency virus and vesicular stomatitis virus or herpes simplex virus. *J. AIDS* **3**: 215-219.

Zhu T.F., Ho M. N., Wang N., Nam D.S., Cao Y.Z., Koup R.A., Ho D.D. 1993. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 in patients with primary infection. *Science* **261**: 1179-1181.

ANNEXE A

Tous les résultats obtenus au cours de mon doctorat ont été publiés ou sont en voie de l'être.

- **Liste des communications et des publications**
- **Copie des articles publiés**

Communications (auteur principal)

Merzouki A, Estable M, Acel A, Moniz De Sa M, Montaner J, Mandy F, Arella M. **Sequence Variability of HIV-1 ADCC Epitopes *in vivo*: V3 Loop ADCC Epitopes Appear to be the Major Determinants for ADCC Activity at Different Stages of the Infection.** The XI international Conference On AIDS, Vancouver, July 1996.

Merzouki A, O'Shaughnessy M, Weniger B, Ou Cy, Read S, Gomez P, Cassol S. **Direct Automated Sequencing of Dried Blood Spots (DBS): An International Resource for Monitoring HIV-1 Genetic Variation.** The Second National Conference on Human Retroviruses and Related Infections, Washington, January 1995.

Merzouki A., Arella M, Tailor P, Cassol S, Turcotte F, O'Shaughnessy M, Patel P. **HIV-1 GP120/160 Expressing Cells Upregulate HIV-1 LTR Directed Gene Expression in a Cell Line Transfected with HIV-1 LTR Reporter Gene Constructs.** 3rd Canadian Conference on HIV/AIDS Research, Montreal, May 1993.

Merzouki A, Patel P, Cassol S, Gill J, O'Shaughnessy M, Arella M. **HIV-1 gp120/160 Expressing Transfected Cell Clones to Evaluate ADCC During the Course of HIV-1 Infection.** 3rd Canadian Conference on HIV/AIDS Research, Montreal, May 1993.

Merzouki A, Cassol S, O'Shaughnessy M, Patel P, Arella M. **Establishment of Transfected CEMNKR Cell Clones Expressing the Envelope Protein (gp160) of HIV-1.** 41st Annual Congress of CSM, London, Ont., June 2-6, 1991.

Communications (coauteur)

Estable M, Bell B, Merzouki A, Montaner J, O'Shaughnessy M, Sadowski I. **HIV-1 5'-LTR from 42 Patients Representing all Stages of Infection, Display a Wide Range of Polymorphism In Sequence, Transcription Potentiel and Binding of Factors But No Clinical Correlation.** The XI international Conference On AIDS, Vancouver, July 1996.

Michael N.L., Mo T, Merzouki A, O'Shaughnessy M, Burke D, Redfield D, Birx L, Cassol S. **HIV-1 Cellular RNA Load and Splicing Patterns Predict Disease Progression in a Longitudinally Studies Cohort.** The Second National Conference on Human Retroviruses and Related Infections, Washington, January 1995.

Pattullo A, Patenaude P, Merzouki A, Sy T, Conway B, Montaner J, O'Shaughnessy M. **Quantification of HIV-1 Cellular & Plasma RNA During Combination Antiretroviral Treatment.** The Second National Conference on Human Retroviruses and Related Infections, Washington, January 1995.

Mo. T, Merzouki A, *et al.* **Accurate differential quantification of HIV-1 tat,rev, nef and pol mRNAs in patients with early stage infection**. X International Conference on AIDS,Yokohama, Japan, August 1994.

Pattullo A, Merzouki A, *et al.* **Quantification of HIV-1 pol and regulatory mRNAs in patients with HIV-1 infection undergoing combination antiretroviral treatment.** 4th Annual Canadian Conference on HIV/AIDS Research, Toronto, June 1994.

Estable M, Merzouki A, Ruedy C, Montaner J, Arella M, O'Shaughnessy M, Craib K, Le T, Schechter M, Cassol S. **Polymorphic Proviral Genotypes of HIV-1 5'-LTR During the Course of HIV-1 infection.** VII International Conference on Comparative and Applied Virology, Montreal, October 1994.

Cassol S, Mo T, Arella M, Merzouki A, Harrigan R, Rudnik J, O'Shaughnessy M. **Rapid Absolute Quantitation of HIV-1 mRNA Subclasses Using Competitive Reverse Transcription PCR and an Automated Fluorescence Fragment Analyzer.** 3rd Canadian Conference on HIV/AIDS Research, Montreal, May 1993.

Publications (auteur principal)

Merzouki A, Patel P, Cassol S, O'Shaughnessy M, Gill J, Arella M (1994). **HIV-1 gp120/160 expressing Transfected Cell Clones to Evaluate the Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) During the Course of HIV-1 Infection.** *Journal of Virological Methods.* 1994. **48**: 9-22.

Merzouki A, Patel P, Cassol S, Ennaji M, Tailor P, Rivard F, O'Shaughnessy M, Arella M (1994). **HIV-1 gp120 /160 Expressing Cells Upregulate HIV Long Terminal Repeat (LTR)-Directed Gene Expression in a Cell Line Transfected with HIV LTR-Reporter Gene Constructs.** *Cellular and Molecular Biology.* 1995. **41**: 445-452.

Merzouki A, Mo T, Vellani N, Pattullo A, Estable M, O'Shaughnessy M, Tsoukas C, Cassol S. **Accurate and differential quantitation of HIV-1 tat, rev and nef mRNAs by competitive PCR.** *Journal of Virological Methods.* 1994. **50**: 115-128

Merzouki A, Arella M. **Sequence Analysis of the ADCC Epitopes of the HIV-1 *env* Genes at Different Stages of the Infection.** (In Preparation)

Publications (coauteur)

Michael N, Mo T, Merzouki A, O'Shaughnessy M, Burke D, Redfield R, Birx D, Cassol S. **HIV-1 Cellular RNA Load and Splicing Patterns Predict Disease Progression in a Longitudinally Studied Cohort.** *Journal of Virology.* 1995. **69**: 1868-1877.

Estable M, Bell B, Merzouki A, Montaner J, O'Shaughnessy M, Sadowski I. **HIV-1 Long Terminal Repeat Variants From 42 Patients Representing All Stages of Infection Display a Wide Range of Sequence Polymorphism and Transcription Activity.** *Journal of Virology.* 1966. **70**: 4053-4062.

Publications (sans *peer reviewer*)

Merzouki A, Acel A, Ennaji M, Arella M. **Naturally Occurring Mutations Within HIV-1 ADCC Type-Specific Epitope.** Advances in Gene Technology: *Protein Engineering and Structural Biology*. 1995, **8** (Supp. S) p 116.

Merzouki A, Arella M, Acel A, O'Shaughnessy M, Ennaji M, Estable M, Cassol S. **Nested-PCR Detection of Cytomegalovirus DNA in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection.** *Advances in Gene Technology*: Molecular Biology and Human Genetic Disease **8** (Supp. S) p 22.

Cassol S, Estable M, Merzouki A, *et al.* (1994). **Monitoring Genetic Variation in HIV-1 Field Strains by Direct Sequencing of Dried Blood Spot Specimens: Implications for Vaccine Development.** *Retroviruses of Humans AIDS and Related Animal Diseases*. Colloque des cents gardes (Paris).1993. 75-78.

Cassol S, Estable M, Mo T, Merzouki A, *et al.* **New insights into HIV-1 replication and transmission: implications for therapeutic intervention.** *Can. Ass. Cli. Micr. Infec. Dis.* 1994. 9