

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**Mémoire présenté à
l'Institut Armand Frappier
comme exigence partielle
de la Maîtrise en
Virologie et Immunologie**

par

FRANÇOIS DEMERS

**RÔLE DU VIH DANS LE PROCESSUS
D'ENGAGEMENT VERS UNE MORT CELLULAIRE
PAR APOPTOSE
DES LYMPHOCYTES T AUXILIAIRES.**

Juin 1996

à grand-papa

TABLE DES MATIÈRES.

| | |
|---|------|
| TABLE DES MATIÈRES | ii |
| LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES | vii |
| SOMMAIRE | xiii |
| INTRODUCTION | 1 |
| 1. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE | 4 |
| 1.1 LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE (VIH) | 5 |
| 1.1.1 Taxonomie | 5 |
| 1.1.2 Morphologie | 6 |
| 1.1.3 Génome et protéines virales | 7 |
| 1.1.4 Variabilité du VIH | 12 |
| 1.2 CYCLE RÉPLICATIF DU VIH | 14 |
| 1.2.1 L'attachement du virus | 14 |
| 1.2.2 Fusion et pénétration du virus | 16 |
| 1.2.3 Rétrotranscription et intégration du virus | 17 |
| 1.2.4 Réplication et état de latence | 18 |
| 1.3 SYNDROME D'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE (SIDA) | 20 |
| 1.3.1 Épidémiologie | 20 |
| 1.3.2 Mode de transmission | 21 |
| 1.3.3 Aspects cliniques | 22 |
| 1.3.4 Histoire naturelle de l'infection | 24 |
| 1.3.5 Immunopathogénèse de l'infection | 26 |
| 1.3.6 Anergie et déplétion de la population de lymphocytes T CD4+ ... | 28 |
| 1.4 L'APOPTOSE | 31 |

| | |
|---|----|
| 1.4.1 Apoptose: une mort cellulaire en tant que phénomènes physiologiques et pathologiques | 32 |
| 1.4.2 Caractéristiques cytologiques de l'apoptose | 33 |
| 1.4.2.1 Réduction de volume | 33 |
| 1.4.2.2 Le calcium et son rôle dans l'apoptose | 34 |
| 1.4.2.3 Condensation de la chromatine et activation d'une endonucléase | 34 |
| 1.4.2.4 Changements dans le cytoplasme et activation de la transglutaminase | 36 |
| 1.4.2.5 Modification de la membrane cytoplasmique | 37 |
| 1.4.3 Gènes régulateurs de l'apoptose | 38 |
| 1.4.4 Les signaux d'apoptose | 42 |
| 1.5 IMPLICATION DU PHÉNOMÈNE D'APOPTOSE DANS LA PATHOGÉNÈSE DU SIDA..... | 44 |
| 1.5.1 Les fondements de l'hypothèse de l'apoptose..... | 44 |
| 1.5.2 Rôle du VIH dans l'induction de l'apoptose chez des lymphocytes T CD4+ | 45 |
| 1.6 OBJECTIFS DU PROJET | 47 |
| 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES | 50 |
| 2.1 CULTURES CELLULAIRES | 51 |
| 2.1.1 Lignées cellulaires | 51 |
| 2.1.2 Milieu de culture: RPMI complet | 51 |
| 2.1.3 Passage cellulaire | 51 |
| 2.1.4 Mesure de l'expression de la molécule CD4 sur les cellules CEM et Raji..... | 52 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 2.2 | PRODUCTION ET PURIFICATION DES GLYCOPROTÉINES VIRALES (GP160/120)..... | 53 |
| 2.2.1 | Production du VIH-1 | 53 |
| 2.2.2 | Isolement des glycoprotéines virales | 53 |
| 2.2.3 | Purification des glycoprotéines virales | 54 |
| 2.2.4 | Caractérisation des protéines virales gp160/120..... | 55 |
| 2.2.4.1 | Mesure de la concentration en protéines par spectrophotométrie | 55 |
| 2.2.4.2 | Électrophorèse sur gel de polyacrylamide | 55 |
| 2.2.4.2.1 | Préparation des échantillons et des gels | 55 |
| 2.2.4.2.2 | L'électrophorèse | 56 |
| 2.2.4.2.3 | Révélation des protéines par coloration à l'argent | 56 |
| 2.3 | PRÉPARATION DES IMMUNOSOMES..... | 57 |
| 2.3.1 | Préparation des liposomes..... | 57 |
| 2.3.2 | Préparation des immunosomes | 58 |
| 2.4 | ÉVALUATION DU NOMBRE DE PARTICULES VIRALES..... | 59 |
| 2.5 | QUANTIFICATION DE L'APOPTOSE | 60 |
| 2.5.1 | Cytométrie en flux | 60 |
| 2.5.2 | Microscopie électronique | 61 |
| 2.5.2.1 | Préparation des échantillons | 61 |
| 2.5.2.2 | Examen au microscope électronique | 62 |
| 2.5.3 | Électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose | 63 |
| 2.6 | INDUCTION DE L'APOPTOSE CHEZ LES CELLULES CEM | 64 |
| 2.6.1 | Par privation du sérum foetal bovin (SFB) | 64 |
| 2.6.2 | Avec le dexamethasone | 64 |
| 2.7 | CINÉTIQUES DE 90 MINUTES AVEC LE VIH | 64 |

| | | |
|---------|--|----|
| 2.8 | INCUBATION AVEC LES IMMUNOSOMES | 65 |
| 2.9 | CINÉTIQUE AVEC LA GLYCOPROTÉINE VIRALE | 66 |
| 2.9.1 | Cinétiques de 6 heures avec la gp160 | 66 |
| 2.9.2 | Cinétiques de 25 heures avec la gp160 | 67 |
| 2.9.3 | Cinétiques avec sérums humains | 68 |
| 3. | RÉSULTATS | 69 |
| 3.1 | LES CELLULES CEM | 70 |
| 3.1.1 | La courbe de croissance des cellules CEM | 70 |
| 3.1.2 | L'expression du récepteur CD4 | 71 |
| 3.1.3 | Induction de l'apoptose chez les cellules CEM | 71 |
| 3.1.3.1 | Mesure de l'apoptose par cytofluorométrie | 72 |
| 3.1.3.2 | Évaluation du pourcentage d'apoptose par comptage au microscope électronique | 74 |
| 3.1.3.3 | Mesure qualitative par électrophorèse de l'apoptose | 75 |
| 3.2 | PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DES GLYCOPROTÉINES GP160 ET DES IMMUNOSOMES-GP160..... | 76 |
| 3.3 | CINÉTIQUE AVEC LE VIH..... | 77 |
| 3.4 | INCUBATION DES CELLULES CEM AVEC LES IMMUNOSOMES..... | 79 |
| 3.5 | CINÉTIQUES AVEC LA GLYCOPROTÉINE GP160 | 80 |
| 3.5.1 | Cinétiques de 6 heures avec différentes concentrations de gp160.. | 80 |
| 3.5.2 | Cinétiques de 25 heures avec de la gp160 dans différents milieux. | 81 |
| 3.5.3 | Rôle de la gp160 dans l'induction de l'apoptose | 84 |
| 3.5.4 | Sérums humains | 86 |
| 4. | DISCUSSION..... | 88 |
| 4.1 | LES CELLULES CEM | 89 |

| | |
|--|-----|
| 4.2 CINÉTIQUES AVEC LE VIH | 90 |
| 4.3 INCUBATIONS DES CELLULES CEM AVEC LES IMMUNOSOMES... | 92 |
| 4.4 CINÉTIQUES AVEC LA GLYCOPROTÉINE GP160 | 94 |
| 4.5 SÉRUMS HUMAINS..... | 103 |
| CONCLUSION | 105 |
| REMERCIEMENTS..... | 108 |
| TABLEAUX | 110 |
| FIGURES | 114 |
| BIBLIOGRAPHIE | 167 |
| ANNEXE I | 192 |
| ANNEXE II: Analyses Statistiques | 195 |

**LISTE DES TABLEAUX
ET
DES FIGURES.**

TABLEAUX

| | | |
|------------|---|-----|
| TABLEAU 1: | La famille des Rétroviridae | 111 |
| TABLEAU 2: | Système de classification révisé pour l'infection du VIH | 112 |
| TABLEAU 3: | Liste des conditions cliniques associées au SIDA | 113 |

FIGURES

| | | |
|-----------|---|-----|
| FIGURE 1: | Représentation schématique du VIH | 115 |
| FIGURE 2: | Génome du VIH | 117 |
| FIGURE 3: | Les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH | 119 |
| FIGURE 4: | Courbe de croissance des cellules CEM..... | 121 |
| FIGURE 5: | Expression de la molécule CD4..... | 123 |
| FIGURE 6: | Analyse de cytométrie en flux..... | 125 |
| FIGURE 7: | Microphotographie d'une cellule CEM vivante..... | 127 |
| FIGURE 8: | Microphotographies de cellules CEM apoptotiques..... | 129 |
| FIGURE 9: | Électrophorèse sur gel d'agarose d'ADN provenant de cellules apoptotiques..... | 133 |

| | | |
|------------|---|-----|
| FIGURE 10: | Profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide 8% de glycoprotéines purifiées et d'Immunosomes..... | 135 |
| FIGURE 11: | a) Microphotographie de rosettes de glycoprotéines gp160..... | 137 |
| | b) Microphotographie d'un Immunosome-gp160..... | 137 |
| FIGURE 12: | Pourcentages d'apoptose lors d'une incubation de 90 minutes des cellules CEM avec un surnagent viral inactivé..... | 139 |
| FIGURE 13: | Pourcentages d'apoptose lors d'une incubation de 90 minutes des cellules CEM récoltées d'une population en phase exponentielle (3 jours) ou en phase plateau (4 jours après un passage) avec un surnagent viral inactivé..... | 141 |
| FIGURE 14: | Pourcentages d'apoptose lors d'une incubation de 90 minutes de cellules CEM avec un échantillon de VIH ultracentrifugé et inactivé..... | 143 |
| FIGURE 15: | Pourcentages d'apoptose lors d'une incubation de 90 minutes de cellules CEM avec différentes dilutions d'un échantillon de VIH ultracentrifugé et non-inactivé..... | 145 |

| | | |
|------------|--|-----|
| FIGURE 16: | Incubation de 6 heures de cellules CEM avec différentes concentrations d'Immunosomes-gp160..... | 147 |
| FIGURE 17: | Incubation de 27 heures de cellules CEM avec des Immunosomes-gp160..... | 149 |
| FIGURE 18: | Incubation de 24 heures de cellules CEM de trois jours avec des Immunosomes-gp160..... | 151 |
| FIGURE 19: | Cinétiques de 6 heures de cellules CEM avec différentes concentrations de gp160 dans du PBS..... | 153 |
| FIGURE 20: | Cinétique de 25 heures de cellules CEM en contact intime avec de la gp160 dans différents milieux..... | 155 |
| FIGURE 21: | Cinétique de 24 heures de cellules CEM avec de la gp160 dans du PBS additionné de SFB..... | 157 |
| FIGURE 22: | Incubation de cellules CEM avec de la gp160 couplée à des anticorps polyclonaux anti-gp160..... | 159 |
| FIGURE 23: | Incubation de 6 heures avec des cellules Raji en présence de la gp160 dans du PBS ou RPMIc..... | 162 |

| | | |
|------------|--|-----|
| FIGURE 24: | Incubation de 24 heures avec des cellules CEM en présence de la gp160 dans du PBS contenant 10 % de différents sérums humains..... | 164 |
|------------|--|-----|

SOMMAIRE

La baisse fonctionnelle et numérique des lymphocytes T CD4⁺ sont les événements qui caractérisent le mieux la progression de l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Les lymphocytes T CD4⁺ étant les cellules-clés de la réponse immunitaire, leur déplétion se traduit par une perte graduelle de l'efficacité du système immunitaire. L'immunodéficience ainsi causée par le VIH se manifeste tardivement par le développement d'infections opportunistes et de certaines néoplasies. L'absence d'un traitement curatif fait que l'issue du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) est toujours fatale.

Plus d'une douzaine d'années après l'identification de l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) par le Pr. Luc Montagnier et ses collègues (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983), la nature des mécanismes par lesquels le virus entraîne le SIDA reste encore mal comprise. La déplétion progressive, puis la disparition complète de la population de lymphocytes T CD4⁺ ne peuvent s'expliquer uniquement par l'infection de ces cellules par le VIH. En effet, il a été démontré que le virus n'infecte qu'un faible pourcentage des lymphocytes CD4⁺ (Bagasra *et al.*, 1992). Différents mécanismes indirects ont donc dûs être considérés. Certains chercheurs ont émis l'hypothèse qu'une réémergence inappropriée d'une mort cellulaire programmée, ou apoptose, induite par le VIH pourrait expliquer la baisse fonctionnelle et la diminution graduelle du nombre de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang (Montagnier *et al.*, 1991; Gougeon *et al.*, 1991; Ameison et Capron, 1991).

Dans notre projet, nous avons voulu déterminer la capacité du VIH et plus spécifiquement, de la glycoprotéine de son enveloppe, la gp160, à induire en apoptose des cellules provenant d'une lignée cellulaire lymphoblastoïde CD4+. En utilisant différentes conditions expérimentales, nous avons trouvé que ni le VIH, ni les Immunosomes-gp160, qui sont des vésicules phospholipidiques sur lesquels la gp160 est ancrée, n'induisent les cellules T CD4+ en apoptose. Par contre, la glycoprotéine virale purifiée et agencée en rosette, a induit en apoptose 30% d'une population de lymphocytes T CD4+, en seulement 6 heures d'incubation. Dans une autre expérience, une préincubation de la gp160 avec des anticorps anti-gp160 a annulé l'induction d'apoptose. Ce dernier résultat démontre que la gp160 agit de manière spécifique comme une inductrice de l'apoptose.

Par ailleurs, d'autres résultats que nous avons obtenus montrent qu'un ou plusieurs facteurs présents dans le sérum foetal bovin (SFB) ainsi que dans le sérum humain protègent les cellules de l'action de la gp160. Il semble également que les sérums d'individus séropositifs offrent une moins bonne protection contre l'apoptose induite par la gp160 que les sérums provenant de personnes séronégatives.

Nos résultats suggèrent donc que la gp160 libre se trouvant dans les ganglions et le sang, pourrait induire une proportion significative de lymphocytes T CD4+ en apoptose. De plus, la gp160 semble bénéficier de conditions favorables à son action puisque le sérum provenant de personnes séropositives semble offrir une moins bonne protection qu'un sérum normal contre l'apoptose induite par la gp160.

INTRODUCTION

Le VIH est l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et a été isolé une première fois par l'équipe du Pr. Luc Montagnier de l'Institut Pasteur de Paris (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983). Le VIH cause une infection chronique qui, après plusieurs années, progresse inévitablement vers un profond déséquilibre du système immunitaire. C'est alors que diverses infections opportunistes apparaissent ainsi qu'une tumeur rare, le sarcome de Kaposi, qui se développe aux dépens du tissu conjonctif. Les infections opportunistes sont fréquemment la cause de la morbidité associée au SIDA et provoquent souvent le décès de l'individu infecté par le VIH.

La pandémie du SIDA qui origine fort probablement des régions subsahariennes de l'Afrique, progresse aujourd'hui de façon exponentielle. On estime que plus de 19 millions d'individus à travers le monde sont maintenant infectés par le VIH et qu'environ un million de ces personnes en sont au stade symptomatique de l'infection (OMS, 1995). Ces statistiques alarmantes rendent la situation critique d'autant plus que les efforts pour trouver un traitement anti-viral pouvant freiner la progression de la pandémie ont été jusqu'à présent peu fructueux. Quelques médicaments dont la plupart présentent une toxicité élevée, se sont avérés efficaces pour prolonger la vie des patients mais aucun n'est curatif. C'est dans le but ultime d'élaborer de meilleurs médicaments et un vaccin efficace contre le VIH, que nous devons approfondir nos connaissances sur le virus et la maladie qu'il cause.

Jamais auparavant un virus n'aura fait l'objet d'études aussi intensives en si peu de temps que le VIH. Le résultat en est aujourd'hui une meilleure compréhension de son cycle de réplication, de son organisation génétique et de la

pathogénèse de l'infection. Beaucoup de questions demeurent cependant sans réponse claire. On sait que la détérioration progressive du système immunitaire se manifeste par une baisse fonctionnelle et une déplétion graduelle des lymphocytes T auxiliaires (Pantaleo *et al.*, 1993a). Par contre, la diminution du nombre de lymphocytes T CD4+ a lieu en dépit d'un faible taux de lymphocytes du sang périphérique (PBL) activement infectés par le VIH (Bagasra *et al.*, 1992). Bien que la charge virale et le taux de réplication soient plus élevés dans les ganglions lymphatiques (Pantaleo *et al.*, 1993b), il semble peu probable que l'effet cytopathogène direct du VIH soit l'unique cause de la déplétion de la population des cellules T CD4+. Divers mécanismes indirects ont alors été suggérés afin d'expliquer cette perte progressive des lymphocytes T CD4+ (Pantaleo *et al.*, 1993a).

En 1991, les Drs Montagnier, Ameisen et Capron proposaient l'hypothèse d'un processus de suicide cellulaire (Montagnier *et al.*, 1991; Ameisen et Capron, 1991). Le VIH provoquerait la mort des lymphocytes T CD4+, non pas en les détruisant directement, mais en envoyant des signaux inadéquats ou incomplets qui entraîneraient l'induction inappropriée d'une mort cellulaire génétiquement programmée, appelée apoptose. L'apoptose se définit comme une mort physiologique qui joue un rôle essentiel dans le renouvellement des tissus embryonnaires et adultes, notamment dans la sélection négative du répertoire des lymphocytes T. On la compare à un véritable suicide cellulaire car cette mort requiert la participation de la cellule qui doit fabriquer les produits lui permettant de s'autodétruire. C'est donc suite à l'observation de ce phénomène avec des PBL de patients séropositifs mis en culture (Gougeon *et al.*, 1991; Meyaard *et al.*, 1992) que l'hypothèse a été formulée.

Notre projet de recherche vise à évaluer le potentiel du VIH à induire le processus d'apoptose chez des cellules provenant d'une lignée cellulaire lymphoblastoïde. De plus, nous avons ciblé la glycoprotéine virale de l'enveloppe, la gp160, comme composante du virus qui, par son interaction connue avec la molécule CD4 à la surface des cellules immunocompétentes, pourrait être responsable de l'induction de l'apoptose. Nous avons donc effectué des expériences avec du virus entier, des Immunosomes-gp160, qui sont des vésicules phospholipidiques à la surface desquelles sont ancrées les glycoprotéines du VIH et finalement, avec de la gp160 purifiée, sous forme de rosette. Ce travail nous a permis essentiellement d'évaluer les conditions dans lesquelles un signal d'apoptose est envoyé et, si tel est le cas, déterminer la proportion de cellules qui ont répondu à ce signal.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025

1.1 LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE (VIH).

1.1.1 Taxonomie.

En 1986, après de nombreux changements de noms, l'abréviation HIV, "Human Immunodeficiency Virus" et l'appellation française VIH pour Virus de l'Immunodéficiency Humaine, ont été adoptées par la communauté scientifique, suite à la recommandation du Comité International de Taxonomie des Virus (ICTV) (Coffin *et al.*, 1986).

Le VIH, agent étiologique du syndrome d'immunodéficiency acquise, fait partie de la famille des *Retroviridae* qui est divisée en sept genres (tableau 1). Le VIH a été classé dans le genre des *Lentivirinae* qui signifie "virus lents". Tous les lentivirus causent des maladies qui évoluent lentement et qui induisent habituellement divers déséquilibres immunologiques et neurologiques (Levy, 1986). Au plan morphologique, les lentivirus se distinguent des autres rétrovirus par leur capsidie distincte en forme de cône tronqué. Ils possèdent un génome d'environ 9,2 kb composé de trois gènes structuraux communs à tous les rétrovirus, et de plusieurs gènes de régulation.

Deux sous-espèces du VIH ont été identifiées à ce jour; le VIH-1, qui se propage à l'échelle planétaire, et le VIH-2, qui est confiné à l'Afrique de l'Ouest. Ce dernier semble moins virulent que le VIH-1. Toutefois, les deux sérotypes ont un tropisme pour les lymphocytes T CD4⁺ et les macrophages et induisent tous deux les mêmes symptômes chez les personnes infectées (revue par Denesvre et Nerrienet, 1992). La différence entre les deux sérotypes se situe

surtout au niveau de l'organisation génomique, plus particulièrement dans la disposition des gènes de régulation. De plus, des divergences existent entre les séquences des gènes structuraux des deux sérotypes, surtout au niveau du gène *env* (Alizon *et al.*, 1986; Clavel *et al.*, 1987). La présente étude porte sur le VIH-1 et par laconisme, le terme VIH sera utilisé dans ce mémoire pour désigner le VIH de type 1.

1.1.2 Morphologie.

Le virion mature présente une forme sphérique et mesure approximativement 100 nm de diamètre. Une représentation schématique du VIH est montrée à la figure 1. L'enveloppe virale, un double feuillet phospholipidique d'origine cellulaire, contient des projections d'environ 10 nm formées de glycoprotéines (gp120), liées aux glycoprotéines transmembranaires (gp41) (Gelderblom *et al.*, 1987; Özel *et al.*, 1988). La surface interne de l'enveloppe est tapissée par des protéines de 17 kDa, la p17, qui forme la matrice (Marx *et al.*, 1988). Plus au centre du virion, on observe une capsid en forme de cône à l'intérieur de laquelle, il y a deux molécules identiques d'ARN de polarité positive, ainsi que les enzymes virales (la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase). Cette capsid est formée d'une protéine de 24 kDa, la p24, qui est phosphorylée et qui s'avère être très immunogène (Veroneze *et al.*, 1988). Les deux molécules d'ARN, auxquelles sont intimement associées les ribonucléoprotéines p7, sont agencées de façon excentrique dans la région élargie de la capsid (Munn *et al.*, 1985).

1.1.3 Génome et protéines virales.

Sur chacune des deux copies de l'ARN simple brin génomique du VIH, long de 9749 nucléotides, les trois gènes classiques des rétrovirus, *gag*, *pol* et *env*, sont présents, ainsi que six gènes non-structuraux (figure 2). Ces six gènes qui seront décrits dans les pages suivantes, sont tous impliqués d'une certaine façon dans la régulation du cycle viral du VIH. Les neuf gènes, dont certains se chevauchent et d'autres sont bipartites, sont encadrés par deux longues régions répétitives non-codantes, les LTR ("Long Terminal Repeats") qui sont situées aux extrémités du génome. Ces régions sont importantes car elles renferment des promoteurs forts qui favorisent la réplication et la transcription du génome viral (Lu *et al.*, 1989; Patarca *et al.*, 1987). De plus, les LTR sont nécessaires pour l'intégration du provirus dans le génome cellulaire (Panganiban et Temin, 1983; Panganiban et Temin, 1984).

Les protéines structurales qui forment la capsid et la matrice située tout juste à l'intérieur de l'enveloppe virale proviennent du gène *gag*. Un précurseur de 55 kDa (Figure 2) est d'abord traduit et myristilé. L'addition de l'acide myristique (un acide gras de 14 carbones) semble jouer un rôle important dans l'attachement du polypeptide à la membrane cellulaire (Gottinger *et al.*, 1989). Le précurseur est clivé en quatre protéines par la protéase virale pendant et après le bourgeonnement du virion. La p24 et la p17 qui sont ainsi générées, représentent les protéines majeures qui composent respectivement la capsid et la matrice (Veronese *et al.*, 1988). La p7 (ou p9), en raison de sa nature basique, est associée à l'acide ribonucléique et, finalement, la p6, qui est située à l'extrémité carboxy-terminale du précurseur, serait

impliquée dans le processus du bourgeonnement viral (Aldovini et Young, 1990).

Occasionnellement (environ 5% des cas), la traduction du précurseur Gag est prolongée due à un décalage du cadre de lecture à la jonction p7/p6, et un polypeptide Gag-Pol de 160 kDa est généré (Jacks *et al.*, 1988). C'est par l'intermédiaire de ce précurseur que les protéines du gène *pol* sont synthétisées. La protéase p10, elle-même présente à l'extrémité N terminal du gène *pol*, clive lorsqu'elle est activée, le polypeptide Gag-Pol. La transcriptase inverse/RNase H (p66/p51) et l'intégrase (p32) qui sont ainsi produites, assurent, respectivement, la rétrotranscription de l'ARN viral (Vamus, 1988) et l'insertion de l'ADN viral dans le génome cellulaire (Park et Morrow, 1991; Khol *et al.*, 1988). Pour être active, la protéase doit être sous la forme d'un dimère. Navia et Mckeever (1990) ont démontré que la dimérisation de la protéase découle des interactions des polyprotéines Gag et Gag-Pol lors de leur assemblage dans les virions.

Le gène *env* code pour les glycoprotéines de l'enveloppe virale (figure 2). Encore une fois, c'est d'abord un précurseur de 160 kDa qui est traduit. Le polypeptide est ensuite glycosylé et scindé par des protéases cellulaires en deux glycoprotéines de 120 kDa et 41 kDa. La gp120 forme des projections à la surface du virion alors que la gp41 est transmembranaire (Montagnier *et al.*, 1985; Özel *et al.*, 1985; Veronese *et al.*, 1985). Ces deux protéines sont associées par des liaisons non covalentes dans les particules virales et forment soit des dimères (gp120-gp41)₂ ou des tetramères (gp120-gp41)₄ (Earl *et al.*, 1990).

Le gène *tat*, composé de deux exons situés de part et d'autre du gène *env*, (figure 2) code pour une protéine de 14 kDa qui stimule l'expression des gènes du provirus (Arya *et al.*, 1985; Sodroski *et al.*, 1985; Muesing *et al.*, 1987). C'est par une interaction en *trans* avec la région TAR, une séquence nucléotidique qui possède une structure en épingle à cheveux et qui se situe à l'extrémité 5' de l'ARN viral, que la protéine Tat augmente de façon considérable l'initiation de la transcription et l'efficacité de l'élongation des ARN (Laspia *et al.*, 1989; Feinberg *et al.*, 1991). De plus, il semble que Tat soit apte à se lier spécifiquement à une kinase cellulaire, connue sous le nom de TAK, la Tat-associated kinase. La TAK phosphorylerait le domaine de l'extrémité carboxylique de la grosse sous-unité de l'ARN polymérase II. Cette phosphorylation permettrait, entre autres, de faire la transition entre l'initiation de la transcription et l'élongation (Herrmann et Rice, 1995). Outre son rôle de régulateur positif, Tat jouerait également un rôle notable dans la neuropathologie liée à l'infection par le VIH (Sabatier *et al.*, 1991), l'immunosuppression (Viscidi *et al.*, 1989) et la stimulation de croissance des cellules du sarcome de Kaposi (Ensoli *et al.*, 1990; Ensoli *et al.*, 1993).

Tout comme pour Tat, le gène codant pour Rev est composé de deux exons localisés aux deux extrémités du gène *env* (Sodroski *et al.*, 1986). Rev, une petite protéine de 116 acides aminés, est essentielle à la réplication virale et à l'expression des protéines structurales (Sadaie *et al.*, 1988; Terwilliger *et al.*, 1988). Lorsque la concentration de la protéine Rev est suffisamment élevée dans le noyau, celle-ci se multimérise au contact d'une région de l'ARN messenger appelée RRE ("Rev Responsive Element"), ce qui permet à ces ARNm viraux d'échapper en partie aux mécanismes d'épissage et d'être

transportés vers le cytoplasme où ils seront traduits en protéines structurales (Malim *et al.*, 1989). Lorsque la concentration intracellulaire de Rev est insuffisante, ces mêmes ARNm sont retenus dans le noyau, épissés et ensuite transportés dans le cytoplasme pour être finalement traduits en protéines dites de régulation (Hadzopoulou-Cladaras *et al.*, 1989). Ce serait donc en contrôlant l'épissage et le transport des ARNm que Rev assure une expression non-simultanée et séquentielle des gènes de régulation et de structure du VIH.

Le gène *nef* a initialement été identifié comme un cadre de lecture ouvert ("open reading frame", ORF) chevauchant le LTR de l'extrémité 3' du génome viral (Allan *et al.*, 1985). Nef est une phosphoprotéine de 27 kDa qui se retrouve principalement dans le cytoplasme ou associée à la membrane cellulaire (Guy *et al.*, 1990), bien que de récentes études aient aussi démontré sa présence dans le noyau (Kienzle *et al.*, 1992; Murti *et al.*, 1993). Quelques 80 % des ARNm transcrits lors de la phase précoce de l'infection sont spécifiques de Nef (Robert-Guroff *et al.*, 1990). Ceci suggère que Nef exerce une fonction fort importante dans la réplication virale. On a tout d'abord cru que Nef réprimait la transcription virale en s'attachant à une séquence appelée NRE ("Negative Regulation Element"), localisée dans le LTR (Ahmad et Vankatesan, 1988). Cette répression, pensait-on, contribuerait à l'établissement de la période de latence observée lors de l'infection (Haseltine, 1988). Cependant, plusieurs études sont venues par la suite contredire ces dernières hypothèses (revue par Hovanessian, 1992). Récemment, de nouvelles publications font état de l'implication de Nef dans la baisse d'expression des molécules CD4 (Garcia et Miller, 1991), IL-2 (Luria *et al.*, 1991) et NF- κ B (Niederman *et al.*, 1992). Fait intéressant, la protéine Nef augmenterait de façon significative l'endocytose

des molécules CD4 (Schwartz *et al.*, 1995) dans le but de protéger la cellule nouvellement infectée de nouvelles infections (surinfection), ce qui s'avérerait toxique pour la cellule. Ainsi, le virus augmenterait l'espérance de vie de la cellule infectée afin de s'assurer d'une plus grande progéniture (revue par Cullen, 1994).

Le gène *vif* ("Viral infectivity factor") code pour une protéine de 23 kDa, présente dans le cytoplasme des cellules infectées mais non dans le virion (Fisher *et al.*, 1987). En plus de multiplier par un facteur de 1000 le pouvoir infectieux du VIH, Vif augmente l'efficacité de transmission du virus d'une cellule à une autre. Son action permet aussi d'obtenir de plus hauts titres viraux. (Fisher *et al.*, 1987). Quant au mode d'action de Vif, rien n'est encore certain. L'ARNm de Vif est traduit lors de la phase tardive du cycle viral (Schwartz *et al.*, 1991) et Vif interviendrait lors de l'assemblage des protéines structurales (Blanc *et al.*, 1993). Guy et collaborateurs (1991) ont d'ailleurs suggéré que Vif est une protéase ayant pour fonction de cliver l'extrémité cytoplasmique de la glycoprotéine de l'enveloppe, la gp41. Ce clivage ferait partie du processus de maturation qui rendrait le virion infectieux. Ceci reste cependant à être confirmé. Par ailleurs, une étude très récente démontre que Vif est requis pour un empaquetage homogène de la nucléoprotéine virale dans la capsid du virion mature (Höglund *et al.*, 1994).

Le gène *vpu*, exclusif au VIH-1, code pour une protéine membranaire de 16kDa (Strebel *et al.*, 1988). La protéine Vpu est requise pour la maturation et le relargage des virions (Klimkait *et al.*, 1990). De plus, elle interfère avec la formation des complexes gp160-CD4 intracellulaires en induisant une dégradation rapide du récepteur CD4 dans le réticulum endoplasmique (Willey

et al., 1992a; Willey *et al.*, 1992b). D'ailleurs, il a été démontré tout récemment par des expériences de co-immunoprécipitation, que la protéine Vpu s'attache à la queue cytoplasmique de la molécule CD4. Cet attachement serait nécessaire mais non suffisant pour causer la dégradation de la molécule CD4 (Bour *et al.*, 1995).

Le gène *vpr*, quant à lui, code pour la seule protéine de régulation présente dans le virion du VIH-1 (Cohen *et al.*, 1990a). Cette protéine qui se retrouve également dans le noyau des cellules infectées (Lu *et al.*, 1993), augmente le taux de réplication virale et accélère l'effet cytopathogène du VIH dans les cellules T (Cohen *et al.*, 1990b). Il semble également, de façon de plus en plus probante, que Vpr est requis pour une réplication virale efficace dans les monocytes/macrophages (Connor *et al.*, 1995).

1.1.4 Variabilité du VIH.

Une caractéristique fondamentale du VIH est sa très grande variabilité génomique (revue par Sonigo, 1992). Les variations observées résultent des erreurs commises par la transcriptase inverse. On estime que cette enzyme, qui est incapable de se relire, introduit une mutation à tous les 10 000 nucléotides, soit à une fréquence de 10^4 à 10^5 fois plus élevée que celle des polymérases cellulaires. Puisque le génome du VIH contient environ 10^4 nucléotides, il se produit donc, en moyenne, une incorporation erronée par cycle de réplication. Ainsi en théorie, chaque génome viral est unique. Un individu infecté est donc l'hôte d'une population hétérogène du virus. De plus, cette hétérogénéité est favorisée par les pressions sélectives exercées par le système immunitaire et

par des substances antivirales administrées aux patients à des fins thérapeutiques.

Certaines parties du génome sont plus variables que d'autres. C'est le cas pour le gène codant pour la glycoprotéine de l'enveloppe (Starcich *et al.*, 1986). Cinq régions bien définies de la gp120, identifiées V1 à V5, se distinguent par leur variabilité (figure 3). Dans ces régions où l'on voit fréquemment, substitutions, délétions, insertions et duplications, moins de 25% des acides aminés sont conservés (Modrow *et al.*, 1986; Simmonds *et al.*, 1990). La boucle V3, longue de 35 acides aminées, est particulièrement hypervariable et constitue, par ailleurs, un des principaux sites inducteurs d'anticorps neutralisants (Goudsmit *et al.*, 1988). Cette séquence hypervariable et immunodominante qu'est la boucle V3, permet donc au VIH d'échapper au contrôle du système immunitaire.

La variabilité au niveau génomique et antigénique du VIH a des répercussions sur les propriétés biologiques du virus. En effet, d'importantes différences existent au sein d'une population virale, notamment en ce qui concerne le tropisme cellulaire, la cytopathogénicité et la vitesse de réplication du virus. En règle générale, les virus ayant un tropisme pour les monocytes/macrophages n'induisent pas de syncytia *in vitro* et se répliquent peu et lentement, tandis que les virus qui ont un tropisme pour les lymphocytes T sont cytopathogènes et beaucoup plus virulents (Schwartz *et al.*, 1989). C'est la région V3 qui influence le tropisme cellulaire du VIH (Chesebro *et al.*, 1992).

1.2 CYCLE RÉPLICATIF DU VIH.

1.2.1 L'attachement du virus.

Normalement, l'étape initiale d'une infection virale est l'attachement de la particule virale au récepteur présent à la surface de la cellule cible. Le récepteur du VIH a été identifié en 1984 comme étant la molécule CD4, surtout présente sur les lymphocytes T auxiliaires matures (Dalglish *et al.*, 1984; Klatzman *et al.*, 1984). D'autres types de cellules, tels que les monocytes/macrophages (Åsjö *et al.*, 1987), les cellules de Langerhans (Rappersberger *et al.*, 1988), les cellules gliales (Funke *et al.*, 1987) et les lymphocytes B (Montagnier *et al.*, 1984) expriment à un moindre degré, la molécule CD4 et sont donc aussi susceptibles à l'infection par le VIH. C'est par la gp120 que le VIH s'attache au récepteur CD4. L'affinité de la gp120 pour le CD4 est d'ailleurs extrêmement élevée; la constante de dissociation, K_d , étant d'environ 4×10^{-9} M (Lasky *et al.*, 1987).

La molécule CD4 est une glycoprotéine membranaire de 433 acides aminés ayant un poids moléculaire de 55 kDa (Maddon *et al.*, 1987). Cette protéine qui fait partie de la superfamille des immunoglobulines, est essentiellement associée au récepteur des cellules T auxiliaires (TcR) et possède une fonction physiologique de co-récepteur pour celui-ci (Janeway, 1989). La protéine CD4 est constituée de trois régions (Maddon *et al.*, 1987). La partie extracellulaire, qui compte 371 acides aminés, possède quatre domaines (les boucles V₁ à V₄); une autre région assure l'ancrage dans la membrane cellulaire et la dernière région est intracytoplasmique. Cette dernière région, riche en acides aminés fortement chargés, est liée physiquement à la tyrosine

kinase p56^{lck} qui est impliquée dans la transduction de signaux provenant du CD4 (Veillette *et al.*, 1989).

Diverses études utilisant la mutagénèse dirigée (Peterson et Seed, 1988), la cartographie d'épitopes à l'aide d'anticorps monoclonaux (Jameson *et al.*, 1988) et la cristallographie (Ryu *et al.*, 1990) ont permis de localiser précisément les sites d'attache de la gp120 au récepteur CD4. Le site principal se trouve dans le premier domaine (V₁) et plus exactement entre les acides aminés 37 à 53 (Jameson *et al.*, 1988). Cette région en forme de doigt, est analogue au CDR2 ("Complementary Determining Region 2") de la chaîne légère des immunoglobulines (Jameson *et al.*, 1988). Outre cette région, il semble que la région avoisinant le CDR3 est également importante pour l'attache de la gp120 (Ohki *et al.*, 1992; Sattentau *et al.*, 1989).

La structure tridimensionnelle de la gp120 n'a pas encore été définie. La principale difficulté réside dans le fait que la gp120 est fortement glycosylée. Ce sont les chaînes oligosaccharidiques attachées à la gp120, et qui représentent 50% du poids moléculaire de la glycoprotéine, qui interfèrent avec une cristallisation uniforme et, par conséquent, une bonne résolution au niveau atomique (McDougal *et al.*, 1991). Néanmoins, la séquence primaire de la gp120 est bien connue.

Les premiers travaux destinés à délimiter les régions impliquées dans l'interaction avec la molécule CD4, ont démontré que l'extrémité carboxy-terminale de la gp120 est importante pour la liaison gp120-CD4 (Kowalski *et al.*, 1987; Lasky *et al.*, 1987). Depuis lors, plusieurs autres régions de la glycoprotéine, importantes pour l'attache au récepteur CD4, ont été

identifiées (Cordonnier *et al.*, 1989; Olshevsky *et al.*, 1990; Syu *et al.*, 1990). Comme ces régions sont discontinues, elles dépendent de la structure tertiaire de la glycoprotéine pour former un site conformationnel capable d'interagir avec la molécule CD4 (McDougal *et al.*, 1991). Finalement, une étude récente a démontré que les chaînes oligosaccharidiques attachées à la gp120 sont nécessaires au repliement correct de la glycoprotéine pour former le site d'attachement à la molécule CD4 (Li *et al.*, 1993).

1.2.2 Fusion et pénétration du virus.

Suite à l'attachement du virus au récepteur CD4, il y a fusion des membranes virale et cellulaire. Cette fusion est médiée par une séquence fusiogène, présente dans la gp41 (figure 3), qui devient accessible suite à l'attachement de la gp120 au récepteur cellulaire (Kowalski *et al.*, 1987). La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire permet l'entrée du matériel viral dans le cytoplasme de la cellule. Callebaut et collaborateurs (1993) ont récemment proposé que l'antigène de surface CD26, aussi connu sous le nom de dipeptidyl peptidase IV (DPP IV), soit un co-récepteur pour le VIH. La peptidase semblerait cliver la gp120 dans la boucle V3 et entraînerait par ce fait, un changement conformationnel de la glycoprotéine qui serait nécessaire pour la fusion entre le virus et la cellule (Callebaut *et al.*, 1993). Toutefois, d'autres résultats sont venus depuis mettre sérieusement en doute l'implication de la molécule CD26 dans les étapes précédant l'entrée du virus dans la cellule (Broder *et al.*, 1994). Fait à noter, le VIH peut aussi être internalisé dans la cellule par endocytose dépendante du récepteur (Pauza et Price, 1988; Grewe *et al.*, 1990; Thibodeau, 1994).

1.2.3 Rétrotranscription et intégration du virus.

Après la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule, l'ARN monocaténaire viral est rétrotranscrit par la transcriptase inverse en ADN double brin. La transcriptase inverse, une enzyme multifonctionnelle d'origine virale assure à elle seule la rétrotranscription du génome viral (revue par Goff, 1990). Une fois la conversion du génome viral en ADN bicaténaire achevée, ce dernier migre complexé à des nucléoprotéines, vers le noyau de la cellule hôte. Le génome viral, flanqué de LTR, est ensuite intégré, probablement au hasard, dans le génome de la cellule infectée avec l'aide de l'intégrase, une des enzymes virales présentes dans la nucléocapside, qui agit de concert avec d'autres enzymes cellulaires (revue par Vaishnav et Wong-Staal, 1991). Toutefois, même en présence de l'intégrase, l'ADN viral ne peut être intégré de façon efficace si la cellule infectée n'est pas dans un état d'activation (Stevenson *et al.*, 1990). L'intégration du génome viral est une étape essentielle dans le cycle répliatif du VIH, car l'ADN viral non-intégré s'avère être un gabarit extrêmement inefficace pour l'expression des gènes viraux (Sakai *et al.*, 1993). Suite à son intégration dans le chromosome de la cellule-hôte, le virus maintenant appelé provirus, demeure latent durant un certain temps ou encore, est transcrit par une polymérase cellulaire, ce qui se traduit par une production massive de virions et par la mort de la cellule.

1.2.4 Réplication et état de latence.

La transcription du provirus est effectuée par l'ADN polymérase II cellulaire qui reconnaît aisément les signaux de transcription provenant des promoteurs forts localisés dans les LTR du provirus. Lors d'une infection productive, les LTR sont très efficaces, et dans certains cas, plus de 10% des ARNm synthétisés par la cellule infectée sont dérivés du provirus (Coffin, 1990).

Les neuf protéines du VIH sont exprimées suite aux différents patrons d'épissage de l'ARNm primaire. Cet épissage différentiel engendre plus de 30 espèces d'ARNm (Schwartz *et al.*, 1990) qui peuvent être classées selon leur taille, en trois catégories (revue par Feinberg et Greene, 1992). On détecte d'abord dans la cellule infectée de petits ARNm d'environ 2 kb qui codent pour les protéines Tat, Rev et Nef. Ces ARNm de petites tailles sont les produits d'épissages multiples de l'ARNm primaire. Avec l'accumulation de la protéine Rev dans le noyau, les ARNm primaires se font moins fréquemment épisser. Les ARNm de 4.5 kb qui sont épissés une seule fois, apparaissent alors dans le cytoplasme, ainsi que les ARNm de la troisième catégorie, longs de 9.2 kb et non-épissés. Les ARNm de 4.5 kb codent pour les protéines Env, Vif, Vpr et Vpu tandis que les ARNm non-épissés sont incorporés dans les virions nouvellement formés ou encore, sont traduits en polyprotéines Gag et Pol.

Vers la fin du cycle de réplication du VIH, le précurseur des glycoprotéines de l'enveloppe est glycosylé dans le réticulum endoplasmique puis clivé à sa sortie de l'appareil de Golgi et les glycoprotéines sont ensuite

transportées à la membrane cellulaire. Fait à noter, une grande proportion des gp160 quittent l'appareil de Golgi et sont dégradées dans les lysosomes (Willey *et al.*, 1988). L'assemblage de la nucléocapside a lieu dans le cytoplasme, sous la membrane cellulaire et l'ARN viral génomique est amené par la protéine p7 (revue par Vaishnav et Wong-Staal, 1991). Finalement, les particules virales bourgeonnent de la cellule avec l'aide de la protéine Vpu (Klimkait *et al.*, 1990) et acquièrent leur enveloppe à laquelle sont associées les glycoprotéines.

En phase de latence, très peu de virions sont formés. La transcription du provirus nécessite la contribution de plusieurs facteurs cellulaires et viraux. Sans l'action concertée des facteurs Tat, Rev, NF- κ B et des composantes de la machinerie cellulaire de transcription, le provirus demeure latent et l'expression des gènes viraux sans être nulle, est à un très bas niveau (Garcia-Blanco et Cullen, 1991; Pomerantz *et al.*, 1992). De plus, des chercheurs ont montré que l'intégration du provirus dans une partie du génome cellulaire n'offrant aucun support à la transcription provirale pouvait être une des causes provoquant la latence du VIH (Winslow *et al.*, 1993). Bien que ces difficultés rencontrées lors de la transcription du provirus apparaissent à prime abord défavorables au VIH, ce dernier semble néanmoins avoir renversé la situation à son avantage. En effet, l'instauration de l'état de latence lui permet de persister dans la cellule durant de très longues périodes de temps et ainsi d'échapper à la supervision du système immunitaire.

1.3 SYNDROME D'IMMUNODÉFICIENCE ACQUISE (SIDA).

1.3.1 Épidémiologie.

Le VIH est l'agent étiologique du Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA). Cette pandémie, qui origine fort probablement des régions subsahariennes de l'Afrique est sans précédent. Depuis la découverte du VIH très tôt dans les années 80, la pandémie a connu un véritable essor et progresse de façon exponentielle. En date du 31 décembre 1994, 1 025 073 cas de SIDA ont été signalés à l'Organisation Mondiale de la Santé depuis le début de la pandémie (OMS, 1995). Ceci représente une augmentation de 20% par rapport aux chiffres obtenus l'an passé. Le nombre de cas rapportés est cependant entaché d'une erreur systématique par suite de mauvais diagnostics, de la sous-notification et des retards dans la déclaration des cas. On estime plutôt que 4.5 millions de cas se sont produits jusqu'à présent à l'échelle mondiale. De plus, ce nombre ne représente qu'un faible pourcentage des 19 millions d'individus infectés par le VIH à travers le monde. Plus précisément, c'est 18 millions d'adultes et plus d'un million et demi d'enfants qui ont été infectés par le VIH (OMS, 1995).

La majeure partie de la population infectée, environ 11 millions d'individus, vit en Afrique subsaharienne, mais on dénombre aussi beaucoup de cas dans les grandes villes d'Amérique et d'Europe (OMS, 1995). Ces dernières années, la pandémie a progressé en Asie et Océanie, deux continents qui représentent ensemble 60% de la population mondiale et qui avaient été jusqu'alors relativement épargnés. L'Asie Sud et Sud-Est est présentement sévèrement touchée avec une prévalence estimée à 3 millions de cas (OMS,

1995). D'après Michael Merson, directeur du Programme Global sur le SIDA de l'Organisation Mondiale de la Santé, l'épidémie en Asie pourrait ultimement surclasser toutes les autres en terme d'envergure et d'impact (Merson, 1993).

1.3.2 Modes de transmission.

Au niveau mondial, le VIH est le plus souvent transmis sexuellement (revue par Brunet, 1992). Aux Etats-Unis et en Europe, le virus est principalement transmis lors de relations homosexuelles chez les hommes, bien que durant les années 90, la progression de l'épidémie chez les hétérosexuels soit non-négligeable (CDC, 1994). En Afrique et en Amérique du Sud, la quasi-totalité des cas de transmissions sont hétérosexuels. Paradoxalement, les chances que le VIH soit transmis lors d'une relation sexuelle sont relativement faibles. En effet, les risques qu'une femme s'infecte lors d'un seul rapport sexuel avec un partenaire mâle infecté par le VIH sont évalués à seulement 0.2%, comparativement à 25% pour la gonorrhé (Holmberg *et al.*, 1989).

La transmission du virus se fait aussi par voie sanguine (revue par Brunet, 1992). Les toxicomanes s'échangeant des seringues contaminées au moment de l'injection de drogues, représentent plus de 60% de l'ensemble des cas de SIDA déclarés en Italie et en Espagne, situation que l'on retrouve, quoiqu' à un moindre degré (30 à 40%), en Thaïlande et dans le sud de la France. La transmission par les produits sanguins (transfusion de sang, facteurs de coagulation pour le traitement de l'hémophilie) a été à toute fin pratique, supprimée en 1985 après l'adoption de procédés d'inactivation virale sur toutes fabrications de produits dérivés du sang.

La transmission de la mère à l'enfant durant la grossesse ou l'accouchement est le troisième mode de contamination. Le risque de transmission d'une mère séropositive à son enfant est approximativement de 20% (Quinn *et al.*, 1992).

Jusqu'à ce jour, aucune autre voie de transmission que les trois évoquées ici-haut n'a été identifiée.

1.3.3 Aspects cliniques.

En 1992, le Center for Disease Control (CDC) a révisé son système de classification pour l'infection au VIH en mettant l'emphase sur l'importance clinique du compte des lymphocytes T CD4+ dans le sang. (CDC, 1992) Ce nouveau système, qui remplace celui de 1986, simplifie la classification des différents stades de la maladie, du point de vue médical, et permet de mieux classer la morbidité liée au VIH (voir **tableau 2**).

On considère maintenant comme sidéen, tout patient dont le compte de lymphocytes T CD4+ est inférieur à 200 / μ L ou encore, si les cellules T CD4+ représentent moins de 14% des lymphocytes et ce, même en phase asymptomatique. Indépendamment de son compte de lymphocytes T CD4+, un patient est également considéré sidéen s'il présente une des 26 conditions cliniques présentes dans la liste des pathologies associées au SIDA (**tableau 3**).

Généralement, lorsque le compte des lymphocytes T CD4+ descend en dessous de 200/ μ l, la fréquence et la sévérité des infections opportunistes associées au SIDA (voir **tableau 3**) augmentent. Pratiquement tous les organes peuvent être une cible d'infection. Les poumons sont toutefois une cible de

choix puisque 65% des infections opportunistes s'y développent (Meduri et Stein, 1992). D'ailleurs, une pneumonie de type rare, causée par le *Pneumocystis carinii* se manifestera chez presque 75% des sidéens ne recevant pas de traitements prophylactiques antipneumocystiques (Kovacs, 1989). Certains néoplasmes, dont le sarcome de Kaposi, sont aussi identifiés comme des manifestations opportunistes reliées à l'infection du VIH (voir tableau 3). Cependant, l'étiologie et la pathogénèse du sarcome de Kaposi demeurent mal comprises (Tirelli *et al.*, 1994)). La prévalence du sarcome de Kaposi est 20 fois plus élevée chez les homosexuels que chez les hémophiles (Beral *et al.*, 1990), ce qui suggère qu'un agent infectieux autre que le VIH, et transmis sexuellement, pourrait être associé au développement du sarcome. Dernièrement, des progrès ont été réalisés lorsqu'un groupe de chercheurs de New York a isolé par PCR, une séquence d'ADN qui semble provenir d'un virus de la famille des Herpesviridae, dans 90% des lésions de sarcome de Kaposi (Chang *et al.*, 1994).

L'infection par le VIH n'a pas que des répercussions sur le système immunitaire, puisqu'en plus, le système nerveux subit habituellement d'importants dommages (revue par Price *et al.*, 1992). Au stade SIDA, près des deux tiers des patients sont affligés d'une détérioration progressive de leurs fonctions mentales; cet état est souvent appelé en anglais comme "AIDS dementia complex" (Price et Brew, 1988). Les complications neurologiques résultent de divers processus pathologiques inflammatoires, démyélinisants et dégénératifs. Le VIH, mais aussi d'autres agents tel que le toxoplasme (Grant *et al.*, 1990), semblent directement et/ou indirectement impliqués dans la pathogénèse de ces maladies neurologiques. Le VIH s'accumule dans les

macrophages présents dans les espaces périvasculaires et infecte aussi les cellules microgliales et les astrocytes (Merrill et Chen, 1991). Finalement, le virus pourrait provoquer une synthèse aberrante de cytokines et autres facteurs solubles, créant ainsi un environnement toxique pour les cellules neurales (Giullian *et al.*, 1990).

1.3.4 Histoire naturelle de l'infection.

Le VIH cause une infection chronique évoluant habituellement pendant plusieurs années et qui mène inexorablement vers un état de profonde immunosuppression laissant libre cours au développement d'infections opportunistes (revue par Pantaleo *et al.*, 1993a).

Lors de la primo-infection, le VIH emprunte le système circulatoire et se dissémine à travers tout le corps. Le virus s'introduit dans les organes lymphoïdes, notamment les ganglions lymphatiques qui sont des sites de prédilection pour la réplication du virus (Pantaleo *et al.*, 1991). Durant cette période caractérisée par une réplication virale intense et une nette diminution du nombre des lymphocytes T auxiliaires (CD4+), une réponse immunitaire contre le VIH parvient tout de même à être organisée (Daar *et al.*, 1991; Clark *et al.*, 1991) Après un laps de temps pouvant varier de dix jours à trois mois, il y a simultanément une baisse considérable de la virémie et l'apparition de hauts titres d'anticorps anti-gp160 et anti-p24 (Clark *et al.*, 1991). Ainsi éliminé du sang périphérique, le virus ne réapparaîtra en aussi grand nombre que de nombreuses années plus tard, lors de la dernière phase de la maladie.

La longue période asymptomatique qui fait suite à la primo-infection et durant laquelle il est difficile de détecter la présence du virus dans le sang (une

cellule mononucléaire infectée sur 10 000 à 100 000), est souvent qualifiée à tort, de période de latence ou période d'incubation pour le virus (Harper *et al.*, 1986; Michael *et al.*, 1992). C'est que, durant cette période asymptomatique, d'une durée moyenne de 10 ans, il y a une détérioration du système immunitaire se manifestant particulièrement par une baisse fonctionnelle ainsi qu'une déplétion graduelle et lente des lymphocytes T auxiliaires périphériques (revue par Pantaleo *et al.*, 1993a). En 1993, Pantaleo, Embretson et collaborateurs ont observé que la charge virale et le taux de réplication dans les ganglions lymphatiques étaient au moins dix fois plus élevés que dans le sang périphérique (Pantaleo *et al.*, 1993b; Embretson *et al.*, 1993). Ainsi, durant cette longue période, l'infection est bien active, mais seulement plus localisée.

Le dénouement inévitable de la détérioration du système immunitaire causée par le VIH est le déclenchement du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise) associé à diverses manifestations cliniques. Le virus qui était "filtré" et séquestré dans les ganglions lymphatiques tout au long de la période asymptomatique, peut maintenant s'échapper des ganglions, dont l'architecture est complètement effondrée, et émerger de nouveau dans le sang (revue par Greene, 1993). Seulement, cette fois-ci, aucune réponse immunitaire n'est possible, vu le faible nombre de cellules T CD4+ (<200/ μ l) circulant dans le sang et la destruction des ganglions (lieu propice pour les interactions entre cellules immunocompétentes).

1.3.5 Immunopathogénèse de l'infection.

La pierre angulaire du système immunitaire, le lymphocyte T CD4+ est la cible principale du VIH. D'ailleurs, cliniciens et chercheurs évaluent périodiquement la décroissance de la population de ces cellules afin de suivre l'évolution de l'infection. Mais, en plus de cette diminution des lymphocytes T CD4+, c'est tout le système immunitaire qui s'affaiblit à mesure que l'infection progresse. Des progrès considérables ont été réalisés ces dernières années quant à la compréhension des mécanismes utilisés par le VIH afin d'induire un état d'immunodéficience chez son hôte.

Les macrophages et cellules dendritiques jouent un rôle important dans la propagation du VIH. Ces cellules servent de réservoir pour le VIH et sont d'excellents véhicules pour la dissémination du virus à travers tout l'organisme (Gartner *et al.*, 1986). De plus, le VIH qui infecte les macrophages est moins virulent et se multiplie plus lentement que celui qui est lymphotrope (Fenyö *et al.*, 1988). Les macrophages et cellules dendritiques infectés survivent donc plus longtemps et par le fait même, perpétuent l'infection en transmettant le virus aux cellules qui migrent dans les ganglions lymphatiques (Embretson *et al.*, 1993). D'ailleurs, il apparaît évident maintenant que c'est dans le microenvironnement des ganglions lymphatiques que le virus prend avantage de la proximité et des multiples échanges entre cellules pour se propager et ainsi, détruire petit à petit le système immunitaire (Pantaleo *et al.*, 1993b; 1994).

Suite à l'infection, les macrophages et les cellules dendritiques seraient également moins efficaces dans leur fonction de présentateur d'antigènes. Leur

production de cytokines deviendrait aussi altérée. Par conséquent, ces changements pourraient instaurer l'état d'anergie observé chez les lymphocytes T CD4+ (Meyaard *et al.*, 1993). En 1994, Akridge et ses collègues ont détecté par PCR, de l'ARNm d'IL-10 dans les ganglions lymphatiques de patients sidéens et non chez des donneurs séronégatifs. L'IL-10 sécrété par les macrophages en réponse à l'infection au VIH, pourrait selon eux, diminuer l'état de fonctionnement des cellules avoisinantes, ce qui contribuerait à la suppression de la réponse immunitaire (Akridge *et al.*, 1994).

Les survivants de longue durée sont des individus infectés depuis au moins 8 ans et qui ne présentent toujours pas de symptômes. Chez ces individus, on a observé de façon constante une réponse antivirale très forte provenant des lymphocytes CD8+ (revue par Levy, 1993). Ces lymphocytes lysent les cellules infectées par un mécanisme dépendant du CMH (Walker et Plata, 1990) ou encore, par un mécanisme indépendant du CMH qui réussit à inhiber la réplication virale sans toutefois tuer la cellule infectée (Mackewicz et Levy, 1992). Une cytokine baptisée CAF pour "CD8-cell Antiviral Factor", serait impliquée dans cette réponse non-cytolytique. Plus spécifiquement, on vient de démontrer que CAF est apte à supprimer la réplication du virus dans les lymphocytes CD4+, en inhibant la transcription virale (Mackewicz *et al.*, 1995). Le système immunitaire semble donc doté d'une arme redoutable en la présence des lymphocytes CD8+, mais tout comme la population des lymphocytes T CD4+, le nombre de cellules T CD8+ et son activité anti-VIH diminue à mesure que progresse l'infection pour atteindre un niveau indétectable au dernier stade de la maladie (Hoffenbach *et al.*, 1989; Mackewicz *et al.*, 1991).

La lymphadénopathie généralisée et l'hypergammaglobulinémie observées chez les individus infectés par le VIH témoignent de l'activation polyclonale des lymphocytes B durant l'infection (Jacobson *et al.*, 1991; Shirai *et al.*, 1992). La façon dont le VIH s'y prend pour générer cette production massive d'anticorps dont seulement une minorité est dirigée contre le virus lui-même (Pahwa *et al.*, 1989) demeure toujours incomprise. Certains ont suggéré que la prolifération polyclonale des lymphocytes B soit la conséquence d'un manque de contrôle de la part des cellules T CD4+. Entre autres, une production anormalement élevée des cytokines IL-10 (Akridge *et al.*, 1994), IL-6 (Breen *et al.*, 1990) et de TNF alpha (Matsuyama *et al.*, 1991) a été démontrée et pourrait expliquer en partie cette hyperactivation des lymphocytes B lors de l'infection.

Pour leur part, les cellules NK perdent graduellement leur pouvoir cytotoxique dès la séroconversion et ce n'est qu'aux derniers stades de l'infection que le nombre de cellules NK chute significativement (Cai *et al.*, 1990). La baisse de l'activité des NK pourrait être attribuable à une diminution de l'IL-2 et de l'interféron alpha observée chez les individus infectés (revue par Sirianni *et al.*, 1990). Malgré de hauts titres d'anticorps présents à tous les stades de l'infection, on a noté que les cellules NK éprouvent une difficulté grandissante à évoquer une réponse ADCC (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity) à mesure que progresse l'infection (revue par Brenner *et al.*, 1991).

1.3.6 Anergie et déplétion de la population de lymphocytes T CD4+.

En 15 ans de recherches intenses, il s'est accumulé une quantité importante d'informations et de données en ce qui a trait au VIH et le

syndrome qu'il cause. Paradoxalement, nous en sommes encore au stade de la vérification des hypothèses quant à la façon dont le VIH rend anergique et décime la population de lymphocytes T CD4+.

Vers le milieu des années 80, des résultats d'hybridation *in situ* démontraient que seulement 1 sur 10^4 à 1 sur 10^5 des leucocytes périphériques d'un individu était infecté et exprimait le VIH (Harper *et al.*, 1986). Toutefois, cette méthode ne pouvait identifier les cellules infectées contenant un provirus défectif ou ne se répliquant pas. Ce n'est que récemment, en utilisant une technique beaucoup plus sensible, un PCR *in situ*, que l'on a réévalué la charge virale à la hausse. En effet, la proportion des cellules mononucléaires périphériques infectées est maintenant estimée de 1 sur 10 à 1 sur 1000 (Bagasra *et al.*, 1992). Les auteurs font cependant remarquer que la très grande majorité des cellules infectées n'exprime pas de virus, suggérant que le provirus soit défectif ou latent.

Tout le monde s'entend pour dire, encore aujourd'hui, que l'effet cytopathogène directe du VIH est important mais ne peut être la seule cause de la déplétion de la population des cellules T CD4+. On s'est donc intéressé à des mécanismes indirects qu'emprunterait le VIH pour parvenir à éliminer toute la population de cellules T CD4+. Plusieurs hypothèses ont été proposées et étudiées. Entre autres, la formation de syncytia, qui résulte de la fusion de cellules infectées et exprimant la gp120 avec des cellules T CD4+ non-infectées, pourrait expliquer la mort de ces dernières (Lifson *et al.*, 1986). Cependant, ce processus maintes fois observé *in vitro* ne semble pas influencer la pathogénèse de l'infection puisque des syncytia ont rarement été observés *in vivo*. Par ailleurs, l'induction inappropriée des lymphocytes T supresseurs

ainsi que de l'ADCC et la présence d'autoanticorps, observées chez les personnes infectées, pourraient tous contribuer à la diminution du nombre de lymphocytes T CD4+ tout au long de l'infection (revue par Weiss, 1993). Également, il a été démontré que la glycoprotéine gp120 du VIH a un effet cytopathogène sur les cellules hématopoïétiques (CD34+) précurseurs des lymphocytes T (Zauli *et al.*, 1992). Ainsi, un ralentissement de la génération des lymphocytes pourrait expliquer la déplétion graduelle des cellules T CD4+.

La défaillance du système immunitaire durant l'infection ne se résume pas à la diminution de la population des cellules T CD4+. En effet, on observe dès le début de l'infection et bien avant que le nombre de cellules T CD4+ ait chuté significativement, une atténuation de la réponse immunitaire (Teeuwsen *et al.*, 1990). Encore une fois, des mécanismes indirects ont été proposés. Par exemple, certains chercheurs proposent que les cellules T CD4+ non-infectées deviennent anergiques suite à une déficience fonctionnelle des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) ou suite à une production inadéquate de cytokines, notamment l'IL-2 (Meyaard *et al.*, 1993). D'autres suggèrent que Tat (Viscidi *et al.*, 1989) ou la gp120 (Mann *et al.*, 1987) pourraient transmettre des signaux d'inhibition qui supprimeraient toute réponse proliférative des lymphocytes T CD4+ normalement induite par des antigènes ou mitogènes. Enfin, d'autres prétendent que la baisse de la réponse immunitaire est due à la perte sélective des cellules T CD4+ de mémoire (CD29+/CD45RO+) qui sont préférentiellement infectées par le VIH (Schnittman *et al.*, 1990).

Une nouvelle théorie a émergé au début des années 90 et a suscité beaucoup d'intérêt et d'enthousiasme dans la communauté scientifique. Montagnier, et par la suite, Ameisen et Capron ont proposé l'idée que l'anergie

et la déplétion des cellules T CD4+ observées chez les patients infectés s'expliquerait par une induction inappropriée dans ces cellules, d'un phénomène physiologique connu sous le nom d'apoptose (Gougeon *et al.*, 1991; Ameisen et Capron, 1991). L'apoptose ou encore, mort cellulaire programmée (MCP) est un processus ubiquitaire chez les eukaryotes qui diffère morphologiquement et biochimiquement de la nécrose. Depuis que l'hypothèse voulant que le VIH induirait de façon inappropriée un signal d'apoptose aux lymphocytes T CD4+ a été émise, un grand nombre d'études ont été entreprises afin de préciser l'implication de ce processus dans la pathogénèse associée à l'infection par le VIH.

1.4 L'APOPTOSE.

Bien que le concept de mort cellulaire physiologique fût connu depuis quelques décennies, c'est en 1972 que Kerr, Wyllie et Currie ont vraiment attiré l'attention de la communauté scientifique sur un processus de mort cellulaire différent de la nécrose et qu'ils ont nommé apoptose. "Apoptose", terme dérivé du grec signifiant "feuilles qui tombent des arbres, en automne", est maintenant utilisé dans la littérature en alternance avec les termes, mort cellulaire programmée et à un moindre degré, mort cellulaire active.

L'apoptose se définit comme un processus par lequel une cellule eukaryote meurt de façon contrôlée et programmée en réponse à un stimulus spécifique (Kerr *et al.*, 1972). La cellule participe activement à sa destruction, d'où les nombreuses allusions à un suicide cellulaire.

1.4.1 Apoptose: une mort cellulaire en tant que phénomènes physiologiques et pathologiques.

Contrairement à la nécrose qui n'est provoquée que par des stimuli pathologiques (infections virales lytiques, expositions à des toxines, conditions non-physiologiques), une cellule meurt par apoptose principalement lors de divers phénomènes physiologiques.

De nombreux exemples de phénomènes physiologiques où l'apoptose joue un rôle prépondérant sont connus. Par exemple, l'apoptose est important dans l'embryogenèse, le renouvellement cellulaire normal d'un tissu, la métarmorphose chez certains insectes et amphibiens, et l'atrophie de tissus qui sont dépendants d'hormones, tel que la prostate (revue par Duvall et Wyllie, 1986). On observe également de l'apoptose lors de la desquamation de la paroi intestinale, de la formation de kératinocytes, de certaines régressions de tumeurs et de la mort des cellules attaquées par les lymphocytes T cytotoxiques et les NK (revue par Carson et Riberio, 1993; Duvall et Wyllie, 1986).

L'apoptose est spécialement important au niveau du système immunitaire (revue par Duvall et Wyllie, 1986). En effet, c'est par apoptose que les neutrophiles matures meurent. De plus, le TNF (facteur de nécrose tumoral), contrairement à ce qu'indique son nom, est capable d'induire en apoptose des cellules tumorales susceptibles. Et finalement, l'apoptose est un phénomène omniprésent dans le thymus où a lieu la sélection négative des lymphocytes T (revue par Duvall et Wyllie, 1986).

En plus d'être impliqué dans des phénomènes physiologiques, on sait aujourd'hui que l'apoptose joue également un rôle dans certaines pathologies.

Des virus, des radiations et plusieurs substances toxiques sont capables d'induire l'apoptose (Wyllie, 1987a). Deux points semblent émerger de toute l'information que l'on possède concernant l'induction de l'apoptose dans des circonstances pathologiques. D'abord, l'induction de l'apoptose nécessite des stimuli de moins grandes amplitudes que ceux qui induisent la nécrose. Deuxièmement, les stimuli pathologiques peuvent seulement induire en apoptose les cellules qui possèdent la capacité d'entrer en apoptose dans des circonstances physiologiques (Wyllie, 1987a).

1.4.2 Caractéristiques cytologiques de l'apoptose.

1.4.2.1 Réduction de volume.

Plusieurs changements surviennent chez une cellule en apoptose. Tout d'abord, la cellule s'arrondit et se détache des cellules voisines due à la rupture de ses desmosomes(s'il y a lieu). La cellule perd rapidement jusqu'à un tiers de son volume initial. D'ailleurs, Kerr en 1970, a été tellement impressionné par cette réduction de volume qu'il a utilisé initialement le terme "shrinkage necrosis" afin de décrire le phénomène d'apoptose (Kerr, 1970). Il a noté aussi que cette réduction de volume est toujours accompagnée par une augmentation de la densité cellulaire. Puisque les membranes sont intactes tout au long du processus et donc, que la cellule conserve son intégrité, la réduction de volume ne peut s'expliquer que par la perte sélective du fluide intracellulaire. Il serait donc intéressant de déterminer les changements de concentration des ions (K, Na...) qui accompagnent cette réduction du volume cellulaire, en début d'apoptose (Wyllie, 1987b).

1.4.2.2 Le calcium et son rôle dans l'apoptose.

La concentration normale de calcium à l'intérieur d'une cellule est de 10^{-7} M tandis qu'à l'extérieur, la concentration est beaucoup plus élevée puisqu'elle se situe à environ 10^{-3} M. Très tôt dans le processus d'apoptose, on observe une nette augmentation de la concentration intracellulaire de calcium. Celle-ci est principalement causée par l'influx de l'ion venant de l'extérieur (Orrenius *et al.*, 1991). Bien que le mécanisme responsable de la dérégulation de l'homéostasie du calcium soit toujours incompris, cette hausse de la concentration cytosolique de Ca^{2+} est maintenant reconnue comme étant un paramètre important dans l'initiation de l'apoptose. De plus, au moins deux enzymes qui ont un rôle prépondérant dans le processus d'apoptose, dépendent de la présence de Ca^{2+} . Elles ont été caractérisées comme étant une endonucléase et une transglutaminase.

1.4.2.3 Condensation de la chromatine et activation d'une endonucléase.

Suite à la réduction de volume de la cellule, le noyau subit des changements qui sont irréversibles. D'abord, la chromatine se condense et forme des agrégats très denses à la périphérie du noyau. Le ou les nucléole(s) se désintègre(nt) et la chromatine condensée finit souvent par occuper toute la place dans le noyau, lui donnant, au microscope électronique, une apparence de trou noir (Cohen, 1993). Un peu plus tard, plusieurs invaginations se développent dans la membrane nucléaire, favorisant ainsi la segmentation du noyau (Duvall et Wyllie, 1986). La cause de ces modifications que subit le noyau est fort probablement liée à l'action d'une endonucléase qui clive la

chromatine aux sites internucléosomaux, générant des fragments distincts d'ADN d'environ 200 paires de bases ou en des multiples de 200 paires de bases (Arends *et al.*, 1990). Cette fragmentation internucléosomale de l'ADN lui donne un aspect caractéristique "en échelle" lorsqu'il est analysé par électrophorèse sur un gel d'agarose. Ceci diffère de la nécrose puisque, lors de ce processus, l'ADN est libéré de ses histones par des protéases et puis complètement dégradé par des nucléases générant ainsi un spectre continu de bandes sur un gel d'agarose (Duvall et Wyllie, 1986).

L'endonucléase n'a pas encore été identifiée. On sait, tout de même, que pour être active, l'enzyme requiert la présence de calcium et de magnésium. Le zinc par contre, l'inactive (Cohen et Duke, 1984). Certains ont d'ailleurs proposé que la concentration de zinc dans le noyau d'une cellule normale soit assez élevée pour garder l'endonucléase sous sa forme inactive et que lors de l'apoptose, il y aurait un échange de zinc pour le magnésium et le calcium (Duvall et Wyllie, 1986). Il semblerait aussi que l'enzyme soit exprimée constitutivement dans certaines cellules tel que les lymphocytes T matures mais qu'elle doit être induite dans la plupart des autres types de cellules.(Wyllie, 1987a)

Par ailleurs, certains chercheurs ont émis l'hypothèse que c'est un changement au niveau de la configuration de la chromatine qui permettrait la digestion internucléosomale par l'endonucléase (Nelson *et al.*, 1986; Arends *et al.*, 1990). D'autres prétendent que l'endonucléase activée dans les thymocytes et les cellules des ganglions lymphatiques chez le rat est la DNase I (Peitsch *et al.*, 1993). Finalement, deux chercheurs américains soutiennent avoir identifié une nucléase qui n'est pas dépendante de $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ et qui est active à un pH

inférieur à 7. Cette nucléase, capable de dégrader l'ADN en fragments nucléosomiques, s'est avérée presque identique à la DNase II dans tous les tests que les auteurs ont effectués. Ils remettent donc en question la prémisse voulant que l'endonucléase qui est dépendante $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ soit la seule nucléase impliquée dans le processus d'apoptose (Barry et Eastman, 1993). Toutes ces informations, dont certaines sont contradictoires, montrent que l'endonucléase responsable de l'étape ultime et irréversible de l'apoptose reste à découvrir.

1.4.2.4 Changements dans le cytoplasme et activation de la transglutaminase.

La réduction de volume ne semble pas affecter l'apparence de la plupart des organites cytoplasmiques, si ce n'est qu'ils sont plus entassés les uns sur les autres. D'ailleurs, la morphologie des ribosomes et des mitochondries est préservée tout au long du processus, ce qui constitue une différence importante avec la nécrose. Par contre, le réticulum endoplasmique se dilate et forme des vésicules qui ont tendance à fusionner avec la membrane de la cellule. Par conséquent, la membrane cellulaire acquiert une apparence cloquée, lorsque observée au microscope électronique à balayage (Duvall et Wyllie, 1986).

On remarque qu'une enzyme, la transglutaminase, et son ARN messager s'accumulent en grande quantité dans le cytoplasme des cellules en apoptose. Cette enzyme qui est dépendante de Ca^{2+} , forme des liens isopeptidiques entre protéines cytosoliques, éléments intermédiaires du cytosquelette et membranes phospholipidiques (Fesus, 1992). La

transglutaminase lie les protéines cytosoliques par des liaisons γ (ϵ -glutamyl)lysine et aussi certains liens γ -glutamyl-bis-spermidine. Ces liaisons sont résistantes à la protéolyse et contribuent à rigidifier le cytoplasme des cellules apoptotiques.

Bien que l'implication de la transglutaminase dans le processus de l'apoptose ne soit plus mise en doute, on spécule toujours sur son rôle exact. Une possibilité serait qu'en stabilisant l'intérieur de la cellule, ceci limiterait la dispersion des composantes intracellulaires dans l'environnement immédiat de la cellule pendant son fractionnement en plusieurs corps apoptotiques (Fesus, 1992). La rétention des composantes intracellulaires par l'action de la transglutaminase expliquerait donc qu'aucune réaction inflammatoire n'est généralement induite lors du phénomène d'apoptose (Fesus *et al.*, 1991).

1.4.2.5 Modification de la membrane cytoplasmique.

Même si la membrane cellulaire conserve son intégrité jusqu'aux stades tardifs du processus d'apoptose, elle subit toutefois très tôt des modifications biochimiques. En effet, la fusion prématurée des membranes du reticulum endoplasmique avec la membrane cytoplasmique abrégait le processus de maturation des sucres. Ceci provoquerait l'apparition de sucres immatures à la surface de la cellule apoptotique. Une étude démontre qu'un sucre ne contenant pas d'acide sialique, le N-acetyl-glucosamine est présent à la surface de la cellule apoptotique (Morris *et al.*, 1984). Normalement, ce sucre se fait couvrir d'acide sialique juste avant son émergence à la surface des membranes cytoplasmiques. La présence de ce sucre modifié rendrait plus facile et rapide la reconnaissance des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires.

D'ailleurs, les macrophages posséderaient à leur surface un récepteur ayant les propriétés de lectines qui aurait une grande affinité pour le N-acetylglucosamine (Duvall *et al.*, 1985). Une fois phagocytés, les corps apoptotiques sont subséquentement dégradés par l'action des lysosymes endogènes aux cellules phagocytaires (Bursch *et al.*, 1990).

1.4.3 Gènes régulateurs de l'apoptose.

L'apoptose est un programme intrinsèque aux cellules eukaryotes qui est essentiel au développement et à l'homéostasie des organismes métazoaires. On ne comprend pas encore très bien les mécanismes qui contrôlent le phénomène d'apoptose, mais on a tout de même identifié de nombreux gènes qui sont impliqués dans sa régulation. Nous nous limiterons ici à présenter ceux qui sont les plus importants.

Le gène *bcl-2* code pour une protéine membranaire de 26 KDa se retrouvant dans les membranes mitochondriales, les membranes périmucléaires et celles du réticulum endoplasmique. Son expression empêche la cellule d'entrer en apoptose lorsqu'elle est privée de facteurs de croissance, irradiée ou encore, mise en contact avec des glucocorticoïdes et autres agents chimiothérapeutiques (Sentman *et al.*, 1991; Nunez *et al.*, 1994). Par contre, Bcl-2 ne protège pas les cellules qui sont la cible des cellules T cytotoxiques (Vaux *et al.*, 1992). Le mécanisme par lequel Bcl-2 prévient l'apoptose n'est pas encore connu mais certains ont suggéré que Bcl-2 est un antioxydant (Hockenbery *et al.*, 1993), un contrôleur du flux de calcium (Lam *et al.*, 1994), ou encore, qu'il interfère directement ou indirectement avec les protéines impliquées dans la transduction des signaux d'apoptose (Nunez *et al.*, 1994).

Bcl-2 a plusieurs homologues. En plus de partager deux régions d'acides aminés très conservées (BH1 et BH2), tous les membres de la famille Bcl-2 sont impliqués dans la modulation de la mort cellulaire. Bcl-x, qui est exprimé dans la cellule en plus grande quantité que Bcl-2, inhibe l'apoptose (Nunez *et al.*, 1994). D'autres agissent à l'opposé. C'est le cas pour Bad qui est un antagoniste de Bcl-x et Bcl-2 et qui, en se liant à ces derniers, favorise l'induction de l'apoptose (Yang *et al.*, 1995). Bax, une protéine de 21 KDa, forme aussi un hétérodimère avec Bcl-2. L'expression de Bax facilite l'induction de l'apoptose en inhibant la fonction de Bcl-2 (Oltvai *et al.*, 1993).

Le gène *bak* a été tout récemment isolé. Jusqu'à 25% de sa séquence d'acides aminés est identique à celle de Bcl-2. On vient de démontrer que Bak, qui est une protéine membranaire, favorise une mort cellulaire par apoptose et annule la protection que procure Bcl-2 lorsque la cellule est privée de facteurs de croissance (Chittenden *et al.*, 1995). Les cellules du foie, du pancréas, du coeur, du rein et du cerveau contiennent tous d'importante quantité d'ARNm du gène *bak* (Kiefer *et al.*, 1995).

D'autres gènes ne faisant pas partie de la famille Bcl-2 sont aussi impliqués dans la régulation du processus d'apoptose. Par exemple, dans certaines circonstances, le déclenchement de l'apoptose est directement relié à l'action de l'anti-oncogène *p53* ou encore, du proto-oncogène *c-myc* (Cohen, 1993; Carson et Ribeiro, 1993). La *p53* induirait l'apoptose en diminuant l'expression de Bcl-2 (Miyashita *et al.*, 1994) et en activant directement la transcription du gène *bax* (Miyashita et Reed, 1995).

Le gène *fas* code pour un récepteur présent à la surface d'une grande variété de cellules. Le récepteur, connu sous les appellations de APO-1, CD95, ou tout simplement Fas, est un membre de la superfamille du récepteur du facteur de nécrose tumoral (TNF), et lorsque son ligand, le FasL s'y attache, la cellule est induite en apoptose. Le FasL est une protéine de surface qui est exprimée principalement par des cellules T activées (revue par Nagata et Golstein, 1995). Le système Fas/APO-1 est un des mécanismes qu'utilisent les cellules T cytotoxiques pour éliminer des cellules infectées (Nagata et Golstein, 1995). Dernièrement, des chercheurs américains et allemands ont publié des résultats démontrant qu'une cellule T activée via son TcR, co-exprimait très rapidement les molécules Fas et FasL. L'interaction de ces deux molécules permettrait à la cellule de s'induire en apoptose d'une manière autocrine (Ju *et al.*, 1995; Dhein *et al.*, 1995). Par ailleurs, certains chercheurs ont noté une différence dans l'expression de Fas et FasL chez les deux sous-groupes de lymphocytes T auxiliaires; Th1 et Th2 (Lynch *et al.*, 1995). Fas est exprimé dans les deux sous-groupes tandis que les cellules Th1 sont les seules à exprimer promptement FasL, après activation. Fait intéressant, l'expression différentielle de FasL par Th1 et Th2 pourrait expliquer la plus grande facilité des lymphocytes Th1 à activer leur programme d'apoptose. Les cellules Th2 sont beaucoup plus résistantes à l'apoptose (Lynch *et al.*, 1995). De ce fait, on peut commencer à comprendre pourquoi le phénotype Th1 prédomine dans les stades précoces de l'infection et que le stade SIDA est souvent associé avec un phénotype Th2 prédominant. En effet, dans les stades avancés de l'infection, seules les cellules T plus résistantes à l'apoptose (en l'occurrence, les Th2) sont encore présentes (Levy, 1993; Clerici et Shearer, 1993).

Un gène, situé sur le chromosome 11q23, code pour une protéase qui a pour fonction de cliver le précurseur de l'IL-1 β (Cerretti *et al.*, 1992). Cette protéase que l'on a nommé ICE pour Interleukin-1 β Converting Enzyme, possède également une activité pro-apoptose, puisque son expression et activation déclenchent le processus d'apoptose (Miura *et al.*, 1993). Tout récemment, on a découvert que l'activité protéolytique de ICE serait requise pour l'induction de l'apoptose par le système Fas/APO-1 (Los *et al.*, 1995). Il est clair que ICE est un rouage important dans la cascade de réactions conduisant à l'apoptose. Toutefois, son substrat, l'IL-1 β n'est pas impliqué dans ce processus de mort programmée (Vaux *et al.*, 1994). On est donc toujours à la recherche d'un second substrat de la protéase qui jouerait un rôle dans l'induction de l'apoptose.

Finalement, une nouvelle enzyme, baptisée Yama, en l'honneur du dieu de la mort des Hindous, vient d'être identifiée comme agissant dans la cascade de réactions conduisant à l'apoptose (Tewari *et al.*, 1995). La Yama, une fois activée, clive une enzyme appelée PARP (poly (ADP-ribose) polymérase) qui est impliquée dans le processus de réparation de l'ADN. Ainsi, lorsqu'une cellule subit d'importants dommages à son ADN, l'enzyme Yama clive l'enzyme PARP et empêche par le fait même, l'activation du système de réparation. La cellule endommagée s'engage donc dans la seule avenue qui lui reste: une mort par apoptose. De plus, dans la discussion de l'article qu'ils ont publié, les auteurs émettent l'hypothèse que Yama est synthétisée d'abord sous une forme inactive et qu'elle serait activée suite à une protéolyse. Ils suggèrent donc que Yama serait le substrat tant recherché de la protéase ICE (Tewari *et al.*, 1995).

Cette brève discussion des gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose nous donne un aperçu de la complexité du système et des stratégies qu'ont élaboré les cellules afin de contrôler le processus d'apoptose. Depuis environ trois ans, un grand nombre de chercheurs travaillent pour identifier les gènes impliqués dans l'apoptose. Plusieurs ont été découverts et caractérisés, mais tous s'accordent pour dire que dans les prochaines années, voire les prochains mois, d'autres gènes viendront s'ajouter à cette liste.

1.4.4 Les signaux d'apoptose.

Le processus d'apoptose est déclenché dans différents types de cellules par différents signaux. Cependant, tous les gènes dont on vient de faire mention dans la section précédente ne sont pas impliqués dans chacune des différentes voies d'induction de l'apoptose. Par exemple, l'anti-oncogène p53 semble être impliqué dans l'induction de l'apoptose causée par des radiations ionisantes, mais il n'est pas requis pour l'induction du processus de mort programmée par les glucocorticoïdes. (Schwartz et Osborne, 1993). Il y a également Bcl-2 qui bloque la plupart des signaux d'apoptose, excepté celui provenant des cellules T cytotoxiques à leurs cellules cibles (Vaux *et al.*, 1992). Chaque signal semble donc être transduit par différents enchaînements de réactions pour activer différentes combinaisons de gènes et finalement aboutir à un seul et même résultat: la mort de la cellule par apoptose (Schwartz et Osborne, 1993).

Lors de la sélection négative, les thymocytes sont induits en apoptose lorsqu'ils sont stimulés via leur récepteur CD3-TCR avec un antigène du soi (Smith *et al.*, 1989). Cette délétion clonale est nécessaire afin de ne pas générer

des lymphocytes T autoréactifs. A l'opposée, les lymphocytes T matures semblent résistants à l'apoptose lorsqu'un signal antigénique est transmis à leur CD3-TCR (McConkey *et al.*, 1990). Cependant, en 1990, Newell et collaborateurs ont démontré, dans un modèle murin, que les cellules T matures entraient en apoptose lorsque le signal reçu par le TcR était précédé d'une ligation du récepteur CD4 (Newell *et al.*, 1990). Toujours au début des années 90, une autre étude venait démontrer qu'un signal transmit via le CD3-TCR et qui était suivi d'un co-signal au domaine α_3 de la molécule CMH de classe I induisait également les cellules matures en apoptose (Sambhara et Miller, 1991). Durant la même année, on découvrait que les lymphocytes T CD4+ et CD8+ matures de souris prétraités avec de l'interleukine-2 meurent aussi par apoptose suite à une stimulation antigénique (Lenardo, 1991).

Pour tenter d'expliquer ces derniers résultats, on peut se référer à une théorie voulant que les lymphocytes doivent toujours recevoir deux signaux pour proliférer ou s'induire en apoptose (revue par Carson et Ribeiro, 1993). Le premier signal, dit de compétence, préparerait la cellule à se répliquer et le second, le signal de progression, donnerait le coup d'envoi à la réplication cellulaire. Toujours selon ce modèle, en l'absence du deuxième co-signal, la cellule devient anergique. Elle ne répond plus à aucun stimulus (Schwartz et Osborne, 1993). Cet état d'anergie n'est cependant pas toujours irréversible (Jenkins, 1992). Finalement, en présence d'un co-signal inapproprié, le programme d'apoptose serait activé. La ligation de la molécule CD4 ou du domaine α_3 de la molécule CMH de classe I seraient donc des exemples de co-signaux inappropriés. Fait intéressant, l'expression de c-Myc augmente lorsque la cellule reçoit un signal via son TCR et, dépendant de la nature du

second co-signal, la cellule serait amenée par l'action de l'oncogène sur la voie de la prolifération ou celle de l'apoptose (Green et Scott, 1994).

1.5 IMPLICATION DU PHÉNOMÈNE D'APOPTOSE DANS LA PATHOGÉNÈSE DU SIDA.

Durant la progression de l'infection par le VIH, on observe d'abord une perte sélective de la capacité des lymphocytes T CD4+ à proliférer en réponse à certains stimuli, suivie d'une réduction progressive du nombre de lymphocytes T CD4+ qui aboutit au SIDA. Le fait que peu de lymphocytes T CD4+ soient activement infectés ont laissé perplexes pour un moment les chercheurs qui n'ont eu d'autres choix que de se tourner vers des mécanismes indirects pour tenter d'expliquer les anomalies qualitatives et quantitatives observées durant la maladie. Montagnier, Ameisen et Capron ont proposé qu'une réémergence innappropriée du programme de mort cellulaire dans l'ensemble de la sous-population lymphocytaire T CD4+ puisse expliquer à elle seule, les deux anomalies (Gougeon *et al.*, 1991; Ameisen et Capron, 1991).

1.5.1 Les fondements de l'hypothèse de l'apoptose.

Cette hypothèse s'appuyait sur plusieurs observations scientifiques faites à ce moment là. D'abord, le groupe de Montagnier rapportait que les lymphocytes de personnes asymptomatiques infectés montraient une rapide perte de viabilité lorsque placés dans un milieu de survie *in vitro*. Les cellules mourraient suite à une fragmentation endonucléosomique de l'ADN. Le phénomène était accentué par des agents activateurs de lymphocytes tel que

des ionophores de calcium. Leurs résultats suggéraient donc qu'*in vivo*, les lymphocytes de patients sont dans un état préapoptotique en raison d'une activation anormale (Gougeon *et al.*, 1991). Deuxièmement, Groux et collaborateurs avaient observé que les lymphocytes T CD4⁺ d'individus asymptomatiques infectés par le VIH, sont induits en apoptose lorsque stimulés *in vitro* par des mitogènes ou superantigènes (Groux *et al.*, 1992). Troisièmement, Meyaard et collaborateurs avaient également réussi à induire en apoptose des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ de patients infectés en les activant *in vitro* avec des anticorps anti-CD3 (Mejaard *et al.*, 1992). Finalement, le groupe d'Hovanessian a démontré que l'effet cytopathogène du VIH *in vitro* est associé au phénomène d'apoptose. L'accumulation des nucléosomes, qui est une des manifestations de l'apoptose, s'est avérée maximale lorsque l'effet cytopathogène (i.e. la formation de syncytia) était maximal (Laurent-Crawford *et al.*, 1991).

1.5.2 Rôle du VIH dans l'induction de l'apoptose chez les lymphocytes T CD4⁺.

En 1990, Newell et ses collègues ont démontré que des lymphocytes T murins sont induits en apoptose lorsqu'une stimulation via le TCR est précédée d'une ligation du CD4 (Newell *et al.*, 1990). Ce résultat suggérait que la molécule CD4, qui est le récepteur cellulaire du VIH, serait impliquée dans l'induction de l'apoptose. Deux ans plus tard, Banda et collaborateurs ont publié des résultats qui, non seulement confirment ceux obtenus par Newell *et al.*, mais font la démonstration pour la première fois d'une implication directe du VIH dans l'induction de l'apoptose. A l'instar des lymphocytes T murins de Newell, des lymphocytes T CD4⁺ humains non-infectés et fraîchement isolés

ont d'abord été prétraités avec des anticorps anti-CD4 et subséquemment induits en apoptose par une stimulation via leur TCR. Dans l'expérience suivante, les anticorps anti-CD4 ont été remplacés par 40 µg/ml de gp120 complexées à des anticorps anti-gp120 et après 60 heures d'incubation, jusqu'à 30% des lymphocytes T étaient apoptotiques, comparativement à un taux de 5% d'apoptose chez les témoins négatifs (Banda *et al.*, 1992). En s'attachant au CD4, la gp120 du VIH semble donc prédisposer à l'apoptose les lymphocytes T non-infectés, qui ont tout de même besoin d'une stimulation via leur TCR afin déclencher véritablement le programme d'apoptose.

En 1993, un groupe de chercheurs a réussi à démontrer que des anticorps anti-CD4 pouvaient à eux seuls, induire en apoptose les lymphocytes T CD4+ lorsque présents dans une population non-fractionnée de cellules mononucléaires humaines. Aucune stimulation n'a été requise pour que les lymphocytes T CD4+ entrent en apoptose, bien que dans ces conditions, la présence des monocytes/macrophages se soit révélée nécessaire puisque lorsque l'expérience a été répétée avec une population de cellules T purifiée, la ligation du récepteur CD4 s'est avérée insuffisante pour enclencher le programme d'apoptose (Oyaizu *et al.*, 1993).

Laurent-Crawford *et al.* ont publié en 1993 des résultats qui démontraient que l'expression du gène *env* du VIH dans les cellules CD4+ est suffisante pour initier une série d'événements conduisant à l'apoptose. De fait, suite à une cinétique d'infection avec la lignée de cellules lymphoblastiques CEM, ils se sont aperçus que toutes les étapes avant la réplication du virus et l'expression de la gp160/120 n'induisaient pas les cellules en apoptose. L'interaction possible de la gp160 avec le récepteur CD4, tous deux exprimés à

la surface de la membrane de la même cellule pourraient selon les auteurs, enclencher le processus d'apoptose. Par ailleurs, le changement conformationnel qui se produit lors du clivage de la gp160 et qui se traduit par la formation du complexe gp120-gp41, semble important dans l'induction du programme d'apoptose. Finalement, les cellules CEM et MOLT4-T4 n'ont pas été induites en apoptose lorsque mises en présence de 2µg/ml de gp120 ou gp160 libres (Laurent-Crawford *et al.*, 1993). Ces résultats suggèrent donc que la présentation de la glycoprotéine virale influence sa capacité d'induire les lymphocytes T CD4+ en apoptose.

1.6 OBJECTIFS DU PROJET.

Depuis la publication de l'hypothèse de l'apoptose par Montagnier, Ameisen et Capron, il y a 5 ans, les résultats de plus de quatre-vingt-dix études traitant spécifiquement de cette théorie ont été publiés. Nous venons de discuter dans la section précédente de cette revue bibliographique, des résultats les plus pertinents qui ont été publiés avant décembre 1993. C'est au cours de l'année 1993 que nous débutons notre projet et récoltions nos premiers résultats. Nos objectifs ont donc été élaborés en fonction de ce qui était connu jusqu'alors. Depuis, des études fort intéressantes ont été publiées et les plus pertinentes seront considérées et comparées à nos résultats, dans la section Discussion de cet ouvrage.

Parmi les protéines virales du VIH, la gp160/120 et Tat sont logiquement deux excellents candidats pour expliquer l'habileté du virus à induire les lymphocytes T non-infectés en apoptose. Ces deux protéines sont sécrétées en

grande quantité par les cellules infectées et peuvent interagir facilement avec d'autres cellules. Tout récemment, on a démontré pour la première fois que Tat, tout comme la gp160/120, est capable de déclencher le programme de suicide cellulaire chez les lymphocytes T non-infectés (Li *et al.*, 1995). Tat augmenterait l'expression de FasL, ce qui rendrait plus facile l'induction de l'apoptose dans ces cellules (Westendorp *et al.*, 1995).

En 1993, Laurent-Crawford *et al.* avaient tenté sans succès d'induire des lymphocytes en apoptose en les infectant avec le virus de la vaccine recombinant dans lequel le gène Tat avait été incorporé. Ainsi, au moment de décider de l'orientation de notre projet, la gp160/120 s'avérait la seule protéine dont la capacité d'induire l'apoptose avait été démontrée et nous avons donc décidé de diriger nos recherches dans le but de savoir sous quelles formes et dans quelles conditions la glycoprotéine agit comme une inductrice d'apoptose.

Nos premières expériences ont été effectuées avec le VIH entier. Nous voulions savoir si l'attachement et l'internalisation du VIH, alors que la gp160/120 présente à la surface du virus interagit avec le récepteur CD4, sont suffisants pour induire les cellules en apoptose. Nous avons également effectué diverses cinétiques avec des cellules T CD4⁺ mises en présence d'Immunosomes-gp160. Ces derniers sont des vésicules à double feuillet phospholipidique sur lesquelles sont ancrées les glycoprotéines du VIH. Les expériences avec les Immunosomes s'avèrent une alternative intéressante à l'utilisation du virus afin d'évaluer si l'attachement de la gp160 à son récepteur peut induire la cellule en apoptose. Un avantage certain à

l'utilisation des Immunosomes est l'absence, à la surface de ceux-ci, de protéines autres que la gp160.

Finalelement, lors d'une étude en 1992, des chercheurs ont identifié la glycoprotéine gp160/120 comme un antigène libre circulant dans le sang de certains patients sidéens (Oh *et al.*, 1992). Il nous paraissaient donc important de déterminer si des glycoprotéines gp160 sous forme de rosette ont le potentiel d'induire une mort cellulaire programmée chez des cellules T CD4+.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 CULTURES CELLULAIRES.

2.1.1 Lignées cellulaires.

Les lignées cellulaires CEM, Raji et deux lignées lymphoblastoïdes de type B transformées par le virus Epstein-Barr (EBV) ont été utilisées dans ce projet. La lignée CEM clone 13 provient du laboratoire du Pr. Luc Montagnier (Institut Pasteur, Paris, France). Les cellules CEM sont des lymphocytes T auxiliaires CD4+ transformés qui ont été isolés à l'origine chez une fillette atteinte d'une leucémie lymphoblastique aiguë (Foley *et al.*, 1965). La lignée Raji est constituée de lymphocytes B isolés en 1963 d'un jeune garçon noir de 11 ans souffrant d'un lymphome de Burkitt (Pulvertalf, 1964). Finalement, les deux lignées lymphoblastoïdes B transformées par le EBV ont été fournies par le Dr. Nicole Sociu-Foca de l'Université Columbia (N.Y., E.U.).

2.1.2 Milieu de culture: RPMI complet.

Les cellules sont cultivées dans le milieu de croissance RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, N.Y., E.U.) additionné de 10% de sérum foetal bovin (SFB: Gibco), 50 µg/ml de gentamycine (Schering, Kenilworth, N.J., E.U.), 2 µg/ml de polybrène (Sigma, St-Louis, MI, E.U.), 2 mM de glutamine (Gibco) et 10⁻⁵M de 2-mercapto-éthanol (ICN, St-Laurent, Qc, Canada).

2.1.3 Passage cellulaire.

Les cellules CEM sont remises en suspension par une légère agitation et un petit volume de la suspension cellulaire est prélevé et coloré avec une solution de bleu trypan 0.5% (Gibco). A l'aide d'un hématimètre, la

concentration et la viabilité de la suspension cellulaire sont déterminées. Ainsi, à tous les 3 ou 4 jours, lors d'un passage cellulaire, la concentration des cellules est ramenée à 4×10^5 cellules/ml et le milieu de culture est renouvelé.

2.1.4 Mesure de l'expression de la molécule CD4 sur les cellules CEM et Raji.

Un million de cellules sont déposées dans des tubes de polystyrène de 15 ml (Corning; Canlab, Qué, Canada) et sont centrifugées à 400 rpm pendant 5 minutes. Les cellules sont lavées une fois au PBS et sont resuspendues dans une solution de PBS froid contenant 3% d'albumine sérique bovin (BSA: Bio-Rad, CA, E.U.) et 0.02% d'azide de sodium (NaN_3 : Boehringer Mannheim, Québec, Canada). Différentes dilutions d'anticorps monoclonaux de souris anti-CD4 humain d'isotype IgG-2a (Cerdalane, Ontario, Canada) sont ensuite ajoutées dans les tubes. Ces anticorps qui sont couplés au FITC se lient à leur cible, le récepteur CD4, lors d'une incubation de 40 minutes, à 4°C et au noir. Par la suite, les cellules sont lavées deux fois et finalement resuspendues dans 1 ml du PBS additionné de BSA et de NaN_3 . Les cellules sont alors prêtes à être analysées en cytofluorométrie.

2.2 PRODUCTION ET PURIFICATION DES GLYCOPROTÉINES VIRALES (GP160/120).

2.2.1 Production du VIH-1.

La gp160/120, nécessaire à la production d'Immunosomes et utilisée dans ce projet, est isolée et purifiée à partir de productions virales. La souche virale LAI provient du laboratoire du Pr. Luc Montagnier. Le virus est produit sur des cellules CEM clone 13 (Institut Pasteur, France).

Les cellules CEM sont cultivées sous agitation constante pendant 3 jours à 37°C, dans une bouteille de culture en pyrex de 4 litres (Bellco Glass, N.J., E.U.). On infecte ensuite 1.8 milliards de cellules avec 360 ml d'une suspension virale, à un indice de multiplicité (MOI) de 0.002 DITC₅₀. Après une heure de contact à 37°C, un volume de 3,6 L de RPMI complet est ajouté. L'incubation se poursuit, dans les mêmes conditions pendant 3 jours. Au troisième jour, l'agitation est interrompue et la moitié du surnageant est récupérée et remplacée par du milieu de croissance frais sans sérum foetal bovin. L'incubation se poursuit durant 24 heures supplémentaires, sans agitation. A la fin, le surnageant est récolté.

2.2.2 Isolement des glycoprotéines virales.

Les virus et les protéines virales présents dans les surnageants récoltés et clarifiés des cellules infectées sont précipités au sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ (BRL, Maryland, E.U.) à 70% de saturation, pendant une heure à 0°C et sous agitation constante. Suite à une centrifugation à 10 000 g pendant 30 minutes, les culots sont dissouts dans l'eau et dialysés avec du PBS pendant au

moins 48 heures. Les échantillons viraux sont alors immédiatement purifiés ou sont conservés à -70°C jusqu'au moment de la purification.

2.2.3 Purification des glycoprotéines virales.

Les échantillons viraux sont mélangés à un tampon Tris 50 mM, pH 7.4, contenant 2% du détergent β -D-octyl-glucoopyranoside (OGP: Boehringer Mannheim, Qué, Canada) et 1% d'acide désoxycholique (DOC: Sigma, St-Louis, MI, E.U.), afin de solubiliser les membranes virales. Les échantillons sont incubés pendant 30 minutes à 25°C et 30 minutes supplémentaires à 10°C . Par la suite, 5 ml d'échantillon sont déposés sur chaque gradient linéaire de saccharose de 60 à 8% (p/v) et centrifugés à 25 000 rpm, à 4°C pendant 45 heures (Beckman L8-80, rotor SW-28). Les gradients sont ensuite fractionnés par le bas en 24 fractions de 1.5 ml. Les glycoprotéines gp160/120 ont une densité de flottaison de 1.12 à 1.16 g/ml et se concentrent dans les fractions 10 à 13. Ces fractions sont regroupées et dialysées d'abord dans de l'eau distillée additionnée d'un inhibiteur de protéase, le PMSF (fluorure de phenylmethylsulfonyl: Boehringer Mannheim), puis contre du PBS dilué par un facteur de 50 et additionnée de PMSF. La dialyse s'échelonne sur quatre ou cinq jours, jusqu'à élimination complète du saccharose et des détergents; les tampons sont renouvelés fréquemment. Les glycoprotéines sont par la suite lyophilisées et conservées dans un dessiccateur à 4°C . Au moment de les utiliser pour des cinétiques avec des cellules CEM ou pour la confection d'Immunosome-gp160, les glycoprotéines sont reconstituées avec de l'eau stérile.

2.2.4 Caractérisation des protéines virales gp160/120.

2.2.4.1 Mesure de la concentration en protéines par spectrophotométrie.

La quantification des protéines est effectuée par la technique colorimétrique de Bradford. Les échantillons de gp160/120 sont mélangés avec une solution acide de bleu de coomassie G-250 (Bio-Rad, CA, E.U.) et incubés pendant 15 minutes à la température de la pièce. L'absorbance est mesurée à 595 nm dans des cuvettes de quartz au spectrophotomètre (PMQ3 Zeiss, Allemagne). La concentration en protéines est ensuite déduite par interpolation des valeurs de densité optique sur une courbe étalon qui est établie pour chaque expérience, à partir de solutions contenant des concentrations connues d'albumine de sérum bovin.

2.2.4.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.

2.2.4.2.1 Préparation des échantillons et des gels.

Deux plaques de verre (18 x 16 cm : Canberra-Packard, Canada) séparées de barres d'espacement de 1.5 mm d'épaisseur sont montées pour obtenir des gels ayant des dimensions de 16 cm x 14 cm x 1.5 mm. Les gels de séparation et de regroupement sont coulés à une heure d'intervalle. La préparation des gels et des différents tampons est détaillée à l'**annexe I**. Une fois les gels polymérisés, ils sont immergés dans un réservoir (Hoefer Scientific Instrument, SE, 600, CA, E.U.) rempli d'un tampon Tris-base 25 mM, pH 8.5, contenant du SDS 0.1% et 192 mM de glycine.

A 5 µg de protéines virales (volume amené à 45 µl avec de l'eau distillée), on ajoute 20 µl d'une solution de saccharose à 40 % et 45 µl du tampon Tris base 5 mM, pH 7.0 contenant du SDS 0.5%, du β-mercaptoéthanol 2.5 % et du glycérol 5 %. Les protéines sont dénaturées par une incubation de 5 minutes à 100°C. Lorsque les échantillons sont refroidis, on ajoute 20 µl d'une solution de bleu de bromophénol 0.005 % dilué dans du saccharose 40 %. Ils sont par la suite déposés dans les puits du gel. Des standards de masse moléculaire (Bio-Rad) sont déposés dans les puits de chaque extrémité du gel.

2.2.4.2.2 L'électrophorèse.

La migration des protéines se fait en fonction de leur poids moléculaire, sous l'influence d'un champ électrique. Un voltage constant de 100 volts (générateur de puissance: Pharmacia EPC 500/400) est initialement appliqué à travers le gel pendant une heure dans le but de regrouper les protéines. Le voltage est ensuite baissé à 65 volts et l'électrophorèse se poursuit pendant une durée approximative de 15 heures, jusqu'à ce que le front de migration ait atteint 1 cm du bas du gel.

2.2.4.2.3 Révélation des protéines par coloration à l'argent.

Les gels sont colorés par la méthode de coloration à l'argent telle que décrite par Merrill *et al.* (1981). La coloration se déroule sous agitation constante et à l'abri de la lumière dans des plateaux en polyéthylène. Les gels sont fixés durant 60 minutes dans une solution de méthanol 50 % et d'acide acétique 10% et sont par la suite lavés à trois reprises avec 200 ml d'une solution d'éthanol 10 % et d'acide acétique 5% pendant 60 minutes. Les gels sont alors immergés durant 10 minutes dans une solution oxydante contenant 3.4 mM de

dichromate de potassium et 3.2 mM d'acide nitrique. Après deux rinçages de 5 minutes à l'eau distillée-déionisée, les gels sont placés dans 200 ml d'une solution de nitrate d'argent 12 mM durant 30 minutes, et ensuite, de nouveau rincés à l'eau distillée-déionisée pendant 3 périodes d'une minute.

Enfin, la révélation des protéines s'effectue en plaçant les gels dans une solution fraîchement préparée de carbonate de sodium 280 mM à laquelle 500 ml de formaldéhyde 37 % sont ajoutés. Les gels sont immergés dans cette solution pendant une quinzaine de secondes et ce, à trois reprises pour finalement demeurer dans un quatrième bain de cette même solution pendant 5 à 15 minutes selon l'intensité de la coloration désirée. On arrête la coloration en plongeant les gels dans une solution d'acide acétique.

2.3 PRÉPARATION DES IMMUNOSOMES.

Notre laboratoire a développé une expertise dans la fabrication d'Immunosomes-gp160 (IMS) qui se fait en deux étapes. D'abord, on forme des liposomes qui sont des vésicules à double feuillet phospholipidique de taille déterminée. Les glycoprotéines gp160 sont par la suite ancrées à la surface des liposomes pour ainsi former les IMS.

2.3.1 Préparation des liposomes.

Les liposomes sont composés de phosphatidylcholine et de cholestérol (Avanti Biochemicals Inc. Birmingham, Alabama, E.U.) dans un rapport molaire 7:1. Ainsi, neuf μ moles de cholestérol et 63 μ moles de phosphatidylcholine sont préparées séparément avec une solution de PBS sans

Ca^{++} ni Mg^{++} , pH 7.4 et qui contient 200 mM de détergent OGP. Les deux solutions sont par la suite mélangées et le volume est complété à 6 ml avec la solution d'OGP de façon à obtenir une concentration en lipides de 12 $\mu\text{mol/ml}$. Le mélange lipidique est chauffé à 40°C et injecté à l'aide d'une seringue hypodermique dans la chambre à dialyse d'un appareil Lipoprep (Dianorm, Munich, Allemagne) dont la température est réglée à 40°C. Le retrait du détergent du mélange lipides-détergent s'effectue graduellement durant une dialyse de 24 heures contre 4 litres de PBS sans Ca^{++} ni Mg^{++} et permet ainsi aux liposomes de se former. Au terme de la dialyse, les liposomes sont récupérés de la chambre à dialyse, puis sont centrifugés pendant 10 minutes à 1000 rpm et à 4°C (Sorvall RC-5B, rotor SS-34) afin d'éliminer les substances insolubles. Les liposomes sont conservés à 4°C.

2.3.2 Préparation des Immunosomes.

Les liposomes et les protéines sont utilisés dans un rapport de 3 μmoles de liposomes pour 500 μg de protéines. Le détergent (OGP) est d'abord ajouté dans les liposomes à une concentration finale de 3 mM et de 80 mM dans l'échantillon contenant les glycoprotéines purifiées. En se liant aux régions hydrophobes des lipides et des protéines, le détergent fluidifie les liposomes et dissocie les rosettes de glycoprotéines. Après 30 minutes d'incubation à la température de la pièce, les complexes protéines-détergent sont combinés aux liposomes fluidifiés. Ce mélange est dialysé pendant 24 heures, à 4°C contre un gradient linéaire décroissant de 10 mM à 0 mM d'OGP dilué dans du PBS sans Ca^{++} ni Mg^{++} . Pour former le gradient, un générateur de gradient à deux chambres communicantes a été utilisé. L'élimination du détergent se fait donc progressivement, ce qui permet aux glycoprotéines de s'incorporer dans le

double feuillet phospholipidiques des liposomes. Finalement, les IMS sont dialysés de nouveau durant une période variant de 48 à 72 heures contre du PBS sans Ca^{++} ni Mg^{++} , afin d'éliminer toute trace de détergent.

La morphologie des IMS est ensuite évaluée par microscopie électronique, leur pureté par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, leur concentration par la méthode de dosage des protéines de Bio-Rad et finalement, leur antigénicité par un test immunoenzymatique ELISA en utilisant des sérums humains séropositifs pour le VIH.

2.4. EVALUATION DU NOMBRE DE PARTICULES VIRALES.

Deux échantillons viraux, l'un dilué 10 fois avec du PBS et l'autre, non-dilué sont fixés pendant 90 minutes à la glutaraldéhyde (concentration finale est de 4%), tout en étant exposés aux rayons ultraviolets sous une hotte laminaire. Dans un petit tube (Airfuge), 50 μl de l'échantillon viral sont par la suite mélangés avec 50 μl d'une solution contenant 3.35×10^8 billes de latex au ml. Une grille enrobée de Formvar est alors placée au fond du tube. Après une centrifugation de 5 minutes à 20 psi (Airfuge), la grille est récupérée et séchée.

Afin de visualiser les particules virales et les billes, la grille est déposée dans une goutte d'acide phosphotungstique (PTA) 3 %, pH 6.3, pendant deux périodes d'une minute chacune. L'excès de liquide est enlevé au moyen d'un papier filtre et la grille est examinée au microscope électronique. En comptant le nombre de billes et de virus sur des régions de la grille choisies

aléatoirement, on détermine par la suite la concentration virale de notre échantillon.

2.5 QUANTIFICATION DE L'APOPTOSE.

2.5.1 Cytométrie en flux.

Les cellules sont centrifugées à 750 rpm pendant 5 minutes dans des tubes de 15 ml (Corning). Le culot de cellules est resuspendu dans 1.35 ml d'un tampon hypotonique constitué d'eau distillée contenant 0.1% de citrate de sodium et 0.1% de Triton X-100. Afin de bien isoler les noyaux des cellules, les échantillons sont agités légèrement à l'aide d'un appareil Vortex. On ajoute ensuite 50 µg/ml d'iodure de propidium. Les échantillons sont de nouveau agités délicatement afin d'assurer une bonne distribution du fluorochrome. Après une incubation d'une nuit, à 4°C et au noir, les échantillons sont prêts pour l'analyse cytofluorométrique à l'exception des échantillons contenant du virus qui doivent être fixés avec une solution de glutaraldehyde 1.5%, au moins une heure avant d'être analysés.

L'appareil EPICS C de la compagnie Coulter (Hialah, Floride, E.U.) a été utilisé pour effectuer les analyses cytofluorométriques des échantillons. Le débit de passage des noyaux à travers le rayon laser a été réduit à 100 noyaux/sec plutôt que 200 tel que suggéré par Nicoletti (Nicoletti *et al.*, 1991). Ainsi, un plus faible débit permet à l'appareil de mieux détecter tous les noyaux qui passent et de bien quantifier leur fluorescence. La réduction du débit augmente cependant le risque qu'il y ait obstruction dans le tuyau où passe les noyaux, ce qui

entraîne inévitablement un débit inégal et donc un résultat erroné. Durant l'analyse, il faut donc toujours surveiller l'oscilloscope afin de s'assurer que le débit est constant et que, par le fait même, les noyaux ne forment pas de bouchon.

Le cytofluoromètre est programmé à ne lire que les noyaux et à ne pas tenir compte des débris cellulaires qui sont facilement reconnaissable dû à leur petite taille et leur très faible fluorescence. Ainsi, en établissant un seuil de détection de la fluorescence, les débris cellulaires sont exclus du comptage. Dix mille noyaux par échantillon sont comptés et compilés selon leur taille, granulosité et leur fluorescence. Pour des raisons qui sont expliquées dans la section des résultats, le pourcentage de noyaux se trouvant dans la région hypodiploïde nous donne le pourcentage exact de noyaux apoptotiques. La longueur d'onde du laser est de 488 nm et celle émise par l'iodure de propidium, et captée par les détecteurs de l'appareil cytofluorométrique, est de 590 nm et plus.

2.5.2 Microscopie électronique.

2.5.2.1 Préparation des échantillons .

Quatre à cinq millions de cellules sont centrifugées pendant quelques secondes dans un Eppendorf de 1.5 ml. Après avoir éliminé le surnageant, le culot de cellules est resuspendu et fixé dans 1 ml de PBS-Glutaraldehyde 2.5% pendant une heure à la température de la pièce. Les cellules sont centrifugées à 13 000 rpm durant 20 minutes afin que les cellules forment un culot compact. Le culot, sans être défait, est ensuite lavé trois fois avec du PBS contenant 3% de sucrose afin d'enlever toute trace de glutaraldehyde.

Le culot est postfixé dans une solution de tetroxide d'osmium 1.33% pendant deux heures, à 25°C, sous une hotte chimique. Les cellules sont ensuite déshydratées graduellement avec de l'acétone, puis sont incubées une nuit dans un mélange 1:1 d'acétone-Spurr. Par la suite, le culot est transféré dans un bain de résine pur (Spurr) pendant trois heures et est ensuite divisé en blocs de 1 mm³ à l'aide d'un scalpel. Les blocs sont déposés au fond des moules BEEM à fond conique et sont recouverts de Spurr pur. L'imprégnation se poursuit durant une nuit sous une hotte chimique. Le lendemain, les moules sont déposés dans un four à 60°C pour une incubation de 24 heures dans le but de favoriser la polymérisation de la résine.

Les échantillons sont démoulés et préparés afin d'être coupés avec un ultramicrotome (Ultratome de LKB, Stockholm-Bromma, Suède). Des coupes ultra-fines de 50 à 70 nm d'épaisseur sont obtenues et déposées sur des grilles de cuivre recouvertes d'une membrane de Formvar. Les coupes sont finalement colorées à l'acétate d'uranyle 5% pendant 20 minutes, au noir, et au citrate de plomb durant 5 minutes. Les grilles sont rincées généreusement à l'eau tridistillée à la suite de chaque étape de la coloration.

2.5.2.2 Examen au microscope électronique.

Les grilles sont examinées à l'aide d'un microscope électronique EM 300 (Philips, Eindhoven, Hollande) à une tension de 80 kV. Pour chaque échantillon, 400 cellules sont examinées et classées comme étant vivantes, apoptotiques ou mortes de façon autre que par apoptose. La condensation de la chromatine est un des critères importants utilisés lors du comptage afin de

déterminer si une cellule est en apoptose. Les microphotographies sont prises sur pellicule Kodak 35 mm.

2.5.3 Electrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose.

Trois à quatre millions de cellules sont centrifugées à 750 rpm pendant 5 minutes et sont ensuite resuspendues dans 2 ml d'un tampon de lyse constitué de 5 mM Tris-Cl, 2 mM EDTA et 0.5% de SDS. La protéinase K (Boehringer Mannheim) est ajoutée aux cellules lysées à une concentration de 0.25 mg/ml. Après une incubation de deux heures, à 56°C, 0.05 mg de RNase A (Boehringer Mannheim) est ajouté et l'incubation se poursuit pendant deux heures additionnelles. L'ADN est ensuite extrait trois fois avec un mélange 1:1 de phénol et chloroforme et deux autres fois au chloroforme. On ajoute ensuite 0.3 M d'acétate de sodium, et l'ADN est précipité dans deux volumes d'éthanol 100% et incubé durant la nuit à -20°C. L'ADN est ultracentrifugé à 27 000 g pendant 20 minutes, puis lavé à l'éthanol 70%. L'ADN est finalement asséché et resuspendu dans 100 µl d'un tampon TE (10 mM Tris-Cl et 1 mM EDTA, pH 8.0).

Un gel d'agarose à 1.5% est placé dans le bassin d'un appareil à électrophorèse (Bethesda Research Laboratories Inc, Maryland, E.U.) qui est rempli de tampon TAE (40 mM de Tris-acetate, 1 mM d'EDTA et 0.001% de bromure d'éthidium). Dix µl de chaque échantillon d'ADN sont mélangés à 1 µl d'un tampon de chargement composé de 0.25% de bleu bromophénol, de 0.25% de xylène cyanol FF et de sucrose 40% (p/v). Les échantillons sont ensuite déposés dans les puits du gel submergé de tampon et un voltage de 100 V est

appliqué à travers le gel pendant 2 heures. A la fin de l'électrophorèse, le gel est examiné sous une lumière UV et est photographié.

2.6 INDUCTION DE L'APOPTOSE CHEZ LES CELLULES CEM.

2.6.1 Par privation de sérum foetal bovin (SFB).

Dix millions de cellules CEM sont d'abord lavées une fois au PBS et sont ensuite resuspendues dans 10 ml de milieu RPMI non-additionné de SFB. Le milieu contient par ailleurs tous les autres ingrédients décrits plus tôt dans le paragraphe 1.2.1. La suspension cellulaire est déposée dans un flacon de polystyrène de 25 cm² (F25) (Corning, Canlab, Québec, Canada). Dix millions de cellules sont également resuspendues dans 10 ml de milieu RPMI complet (témoins négatifs). Tous les flacons sont placés dans un incubateur à 37°C, sous atmosphère de CO₂ à 5%, pendant 4 jours.

2.6.2 Avec du dexaméthasone.

Deux millions de cellules CEM resuspendues dans du RPMI complet sont déposés dans chaque puit d'un plateau en polystyrène à six puits (Linbro, Flow Laboratories Inc., E.U.). Dans les puits du haut, du dexaméthasone (ICN) dilué dans de l'éthanol 100% est ajouté à une concentration finale de 10⁻⁶ M à la suspension cellulaire. Dans les puits du bas qui sont les témoins négatifs, les cellules sont mises en contact avec un volume équivalent d'éthanol 100%, mais sans dexaméthasone. Le plateau est placé dans l'incubateur à 37°C, 5% CO₂ pour une durée de 4 jours. La viabilité et le pourcentage d'apoptose sont

mesurés au jour 3 et 4 de l'incubation, par l'exclusion de bleu trypan et par cytofluorométrie, respectivement.

2.7 CINÉTIQUES DE 90 MINUTES AVEC LE VIH.

Trois millions de cellules par tubes sont d'abord centrifugées à 750 rpm pendant 5 minutes et resuspendues dans 1 ml de milieu RPMI complet. On ajoute, par la suite, différentes préparations virales aux cellules. Certains échantillons viraux proviennent de surnageant de cellules à 4 jours post-infection, d'autres échantillons sont composés de virus ultracentrifugés. Pour certaines cinétiques, les virions ont été inactivés à la chaleur en les incubant pendant 45 minutes dans un bain-marie à 56°C.

L'incubation se déroule dans des tubes de 15 ml (Corning), placés dans un bain-marie dont la température est ajustée à 37°C. A toutes les 30 minutes, un million de cellules par échantillon sont prélevées. La viabilité est déterminée par exclusion de bleu trypan et le pourcentage d'apoptose est mesuré par cytométrie en flux.

2.8 INCUBATIONS AVEC LES IMMUNOSOMES.

Dix millions de cellules CEM par échantillon sont centrifugées pendant 5 minutes à 750 rpm et resuspendues dans un volume minimal de RPMI complet. On ajoute ensuite les IMS à des concentrations variant de 400µg/ml à 40µg/ml. Les échantillons sont incubés sous légère agitation, à 37°C pendant une période pouvant varier de 6 heures à 24 heures. A noter que, pour les incubations de 24 heures, les cellules sont d'abord incubées dans un volume

minimal de PBS afin d'assurer un bon contact avec les IMS. Après les 3 premières heures d'incubation, on ajoute du RPMI complet frais à la suspension cellulaire afin que les cellules ne meurent pas avant la fin de l'incubation par carence de facteurs nutritifs.

Pour les témoins négatifs utilisés dans la plupart des incubations, des liposomes à 0.6 $\mu\text{mol/ml}$, de la BSA ou du milieu de croissance sont ajoutés aux échantillons de cellules CEM.

Lorsqu'une incubation est terminée, la viabilité et le pourcentage d'apoptose des cellules de chaque échantillon sont déterminés tels que décrits dans les paragraphes précédents, par exclusion au bleu trypan, cytofluorométrie et microscopie électronique.

2.9 CINÉTIQUE AVEC LA GLYCOPROTÉINE VIRALE GP160/120.

2.9.1 Cinétiques de 6 heures avec la gp160.

Dix millions de cellules par échantillon sont centrifugées pendant 5 minutes à 750 rpm. Les culots sont resuspendus dans 1 ml de RPMI complet ou de PBS et 50 ou 100 μg de gp160 purifiées sont, par la suite, ajoutés. Les témoins négatifs contiennent de la BSA, plutôt que de la gp160. Les échantillons sont incubés à 37°C, sous légère agitation. A la troisième et sixième heure d'incubation, un million de cellules sont récupérées afin de déterminer le pourcentage d'apoptose par cytofluorométrie. Cinquante μl de chaque échantillon sont aussi prélevés et mélangés à une solution de bleu trypan afin de vérifier la viabilité des cellules. Le pourcentage d'apoptose à la sixième

heure d'incubation est également évalué par microscopie électronique. Les résultats de microscopie sont ensuite comparés avec ceux de la cytométrie en flux.

2.9.2 Cinétiques de 25 heures avec la gp160.

Pour chaque échantillon, 10 millions de cellules sont centrifugées et resuspendues dans divers milieux, tels que le RPMI avec ou sans SFB et le PBS additionné ou non de SFB. Dans tous les cas, la concentration de la glycoprotéine gp160 est de 100µg/ml. La viabilité est vérifiée à la troisième, sixième, vingtième et vingt-cinquième heure de l'incubation. De plus, à la sixième et vingt-cinquième heure, un million de cellules par échantillon sont prélevées et analysées par cytofluorométrie afin de déterminer le pourcentage de cellules en apoptose. Des cellules de chaque échantillon sont également récupérées pour être examinées au microscope électronique afin de valider les résultats obtenus à la cytométrie en flux.

Dans le but de vérifier si les effets observés sont spécifiques à la gp160, celle-ci a été pré-incubée pendant deux heures avec des anticorps de souris anti-gp160 avant d'être mise en contact avec les cellules. Les anticorps proviennent de sérums de souris immunisées avec de la gp160 purifiée et le sérum utilisé a été titré par ELISA à plus de 1/200 000. L'incubation s'est poursuivie durant 25 heures de façon similaire aux autres cinétiques. Comme témoin négatif, des anticorps anti-gp160 ont été ajoutés aux cellules en absence de la gp160. La glycoprotéine du virus de l'influenza (HA) a également été utilisé plutôt que la gp160 comme autre témoin de spécificité.

2.9.3 Cinétiques avec sérums humains.

Dans le but de vérifier si des sérums humains peuvent protéger des cellules CEM de l'apoptose induite par la gp160, les cellules ont été incubées avec 100 µg/ml de la glycoprotéine en présence de sérums humains séronégatifs ou séropositifs préparés à 10% dans du PBS. Tout au long de la cinétique, les pourcentages de viabilité et d'apoptose ont été mesurés de la même façon que décrite plus haut.

3.1 LES CELLULES CEM.

Dans la très grande majorité des cinétiques effectuées au cours de ce projet, nous avons utilisé la lignée de cellules CEM. Avant d'entreprendre les cinétiques avec les Immunosomes (IMS), le VIH et la glycoprotéine gp160, il nous apparaissait important de déterminer certains paramètres spécifiques de ces cellules, notamment, la courbe de croissance, le taux d'expression du récepteur CD4 à la surface des cellules et finalement la capacité des cellules à s'engager dans le processus de mort programmée ou apoptose. De plus, il était important de mettre au point les techniques de détection de l'apoptose.

3.1.1 La courbe de croissance des cellules CEM.

Dix-sept courbes de croissance ont été effectuées à partir desquelles un indice de multiplicité moyen des cellules CEM a pu être dérivé. Chaque incubation a été effectuée dans des conditions similaires. La concentration cellulaire initiale était de 400 000 cellules/ml de RPMI complet. On peut noter, à la **figure 4**, que la population de cellules est en phase de croissance exponentielle entre la deuxième et quatrième journée d'incubation et que, par la suite, elle amorce un plateau. Ce ralentissement de la croissance au quatrième jour, s'explique par l'encombrement cellulaire, l'appauvrissement progressif du milieu en facteurs de croissance et l'accumulation de déchets provenant du métabolisme des cellules. Nous avons généralement utilisé des cellules de 3 jours, soit au milieu de la phase exponentielle, au cours des cinétiques de ce projet.

3.1.2 L'expression du récepteur CD4.

Suite à une incubation avec des anticorps anti-CD4, conjugués à la FITC, les cellules ont été analysées par cytofluorométrie. On peut voir à la **figure 5b** que plus de 96% des cellules CEM expriment à leur surface le récepteur CD4. En comparant les **figures 5c et 5d**, on note par contre, que les lymphocytes B (lignée Raji) expriment très peu de molécules CD4 puisqu'il n'y a pas d'augmentation de la fluorescence lorsque ces cellules sont mises en présence d'anticorps fluorescents. Fait à noter, les cellules sont en soi faiblement fluorescentes dû à la présence dans leur cytoplasme de flavines tel que les riboflavines. L'autofluorescence des cellules est démontrée dans les graphiques de gauche, aux **figures 5a et 5c**.

3.1.3 Induction de l'apoptose chez les cellules CEM.

Tel que décrit dans la section Matériel et Méthodes, les cellules CEM ont été induites en apoptose, soit par privation de sérum foetal bovin (SFB), soit en les incubant en présence de dexaméthasone. Plus de 14 incubations d'une durée de 4 jours dans un milieu sans SFB ont été effectuées. Dans ces conditions, environ 35% de la population de cellules ont été induits en apoptose. La viabilité, mesurée à l'aide d'une coloration au bleu trypan, était en moyenne de 46% après 4 jours d'incubation. Lors des incubations en présence de dexaméthasone à une concentration de $10^{-6}M$, jusqu'à 45% de la population a été induite en apoptose. Ces valeurs représentent les plus hauts pourcentages d'apoptose que nous ayons observés. Ainsi, dans une population donnée de cellules CEM, il semble y avoir au moins la moitié de la population qui soit

réfractaire à l'apoptose, du moins, dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées.

3.1.3.1 Mesure de l'apoptose par cytofluorométrie.

On peut observer à la **figure 6**, deux graphiques typiques dont chacun regroupe quatre histogrammes. La population de cellules CEM de la **figure 6a** a été incubée 4 jours dans du milieu de croissance RPMI additionné de 10% de SFB. La viabilité, mesurée par une coloration au bleu trypan, est excellente. A l'opposé, la population de cellules CEM qui a été privée de SFB pendant 4 jours (**figure 6b**) montre une mortalité de 50 %. A l'aide des histogrammes inférieurs de droite (H4) de chaque graphique, on est en mesure de calculer le pourcentage d'apoptose dans la population de cellules. L'axe des abscisses représente l'intensité de la fluorescence et l'axe des ordonnées, le nombre de noyaux. Les deux axes sont à l'échelle logarithmique.

Les cellules ont un cycle de vie composé des phases G_0/G_1 , S, G_2 et M et, dans les phases G_0/G_1 , les cellules possèdent $2N$ chromosomes. Ce chiffre passe à $4N$ dans les phases G_2 et M. Durant la phase S, la cellule réplique son ADN et ainsi, on retrouve des noyaux ayant entre $2N$ et $4N$ chromosomes. Plus un noyau contient de l'ADN, comme en phase G_2 , plus il y a de sites où le fluorochrome peut aller se fixer et ainsi, ce noyau qui est plus fluorescent, se déplace vers la droite sur l'axe des abscisses de l'histogramme.

En suivant cette logique, aucun noyau de cellules vivantes ne devrait se trouver dans la région hypodiploïde ($<2N$) de l'histogramme puisqu'une cellule somatique vivante possède toujours un minimum de $2N$ chromosomes. C'est ce qui est illustré à la **figure 6a** (H4) puisqu'on ne voit

aucun noyau dans la région à gauche du grand pic de G_0/G_1 . Il en va tout autrement pour la population de la **figure 6b** et ceci s'explique par le fait que des noyaux apoptotiques sont moins fluorescents que les noyaux normaux pour diverses raisons. D'abord, la condensation de la chromatine empêche une bonne pénétration du fluorochrome. Deuxièmement, l'ADN est coupé par une endonucléase en de multiples fragments. Ceci diminue le nombre de site où le fluorochrome, qui est un intercalant, peut se lier. Finalement, les noyaux apoptotiques sont souvent fragmentés; des fragments de noyau ne peuvent contenir qu'une partie plus ou moins importante du contenu normal d'un noyau. Pour toutes ces raisons, les nombreux noyaux dans la région hypodiploïde (voir A_0) de la **figure 6b** sont dit être en apoptose et en délimitant cette région avec des barrières (absentes sur cette figure), on règle le cytofluoromètre de manière à calculer le pourcentage de noyaux s'y retrouvant. Ici, à la **figure 6b**, il y a 35 % des noyaux qui sont apoptotiques.

Les trois autres histogrammes contiennent des renseignements complémentaires qui ont été surtout utiles afin de s'assurer de la bonne qualité de nos échantillons. En outres, en demandant à l'appareil d'effectuer quelques calculs à partir de ces histogrammes, on peut vérifier que les noyaux sont saturés de fluorochrome, qu'aucun gros agrégat de débris ne vient fausser les résultats et qu'il y a bel et bien 10 000 noyaux de comptés par échantillon. D'autres paramètres, tel que la taille et la granulosité des noyaux peuvent être aussi vérifiés.

3.1.3.2 Évaluation du pourcentage d'apoptose par comptage au microscope électronique.

Suite à une privation de SFB, les cellules CEM ont été préparées et examinées au microscope électronique. Nous avons donc pu étudier directement la morphologie des cellules CEM vivantes et apoptotiques. La **figure 7** montre une cellule vivante d'apparence normale. On peut noter le noyau en forme de fer à cheval qui occupe une grande partie de la cellule; c'est l'hétérochromatine qui donne au noyau une allure marbrée. On peut voir quelques nucléoles. La membrane cellulaire est intègre et les mitochondries sont normales.

De nombreux changements morphologiques surviennent lorsqu'une cellule reçoit un signal d'apoptose. D'abord, la chromatine se condense et apparaît très dense au microscope. La chromatine condensée peut, par ailleurs, n'occuper qu'une partie du noyau, souvent à la périphérie, ou encore, peut s'accaparer toute la place, donnant au noyau l'apparence d'un trou noir lorsque regardé au microscope. Un peu plus tard, il n'est pas rare de voir des noyaux fragmentés en plusieurs parties. La membrane cellulaire tend à se rompre et le réticulum endoplasmique se dilate. Le cytoplasme a également tendance à se condenser dû à l'action de la transglutaminase. Les mitochondries et les ribosomes conservent leur morphologie normale jusqu'à très tard dans le processus d'apoptose. Comme on peut le voir sur les différentes microphotographies de la **figure 8**, les cellules apoptotiques sont souvent facilement identifiables par l'apparence de leur noyau. C'est donc en nous basant principalement sur l'apparence des noyaux que nous avons pu différencier les cellules apoptotiques des autres, lors du comptage.

Par ailleurs, afin d'être le plus objectif possible, les comptages en microscopie électronique ont été effectués au moins un mois après l'analyse cytofluorométrique. Ainsi, nous avons effectué les comptages en microscopie sans avoir en tête les résultats des analyses de cytométrie en flux. Dans la très grande majorité des cas, la corrélation des résultats obtenus en utilisant les deux techniques a été excellente.

3.1.3.3 Mesure qualitative par électrophorèse de l'apoptose.

La cytométrie en flux et la microscopie électronique nous a permis de mesurer quantitativement la proportion de cellules en apoptose dans une population de cellules donnée. Bien que moins utilisé lors de ce projet, l'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN cellulaire nous a aussi permis de confirmer le phénomène d'apoptose par la fragmentation internucléosomique de la chromatine.

En effet, l'ADN d'une cellule apoptotique se fait cliver aux sites internucléosomiaux par une endonucléase, ce qui génère des fragments d'ADN d'environ 200 paires de bases (pb) ou de multiples de 200 bp. La **figure 9** nous montre des bandes d'ADN sur un gel d'agarose, suite à une électrophorèse. Ces bandes sont espacées de façon régulière puisqu'elles sont composées de fragments d'ADN longs de 200 ou de multiple de 200 pb. Cet aspect "en échelle" de l'ADN sur le gel nous signale donc que certaines cellules sont mortes par apoptose. L'intensification des bandes à mesure que progressait la cinétique démontre que le phénomène de l'apoptose s'intensifiait dans cette population de cellules privées de SFB.

3.2 PRÉPARATION ET CARACTÉRISATION DES GLYCOPROTÉINES GP160 ET DES IMMUNOSOMES-GP160.

Les conditions expérimentales pour obtenir un rendement optimal de gp160/120 ont été préalablement définies dans notre laboratoire. La production de la glycoprotéine a été effectuée dans des cellules CEM infectées par le VIH et la purification a été réalisée par ultracentrifugation sur un gradient de densité de saccharose 60 à 8%. Cinq μg de glycoprotéines purifiées ont été appliqués sur un gel de polyacrylamide à 8%. Le profil électrophorétique est présenté à la figure 10. La bande correspondant à la gp160 est beaucoup plus importante que les autres et représente en fait, environ 80 % du produit purifié. Cette solution de glycoprotéines a été d'ailleurs visualisée au microscope électronique suite à une coloration négative avec 3 % d'acide phosphotungstique (PTA). Les glycoprotéines sont agencées en rosettes dû à leur domaine hydrophobe (figure 11a).

Suite à l'addition du détergent OGP, les rosettes sont désassemblées et ceci permet à la gp160 de s'insérer dans les vésicules lipidiques pour former les IMS-gp160. Le profil électrophoretique de ces IMS-gp160 est identique à celui des glycoprotéines purifiées (figure 10). A la figure 11b, on observe après une coloration au PTA 3%, un IMS d'un diamètre approximatif de 80 nm. Les multiples projections que l'on aperçoit à la surface de l'IMS indiquent que la glycoprotéine s'est bien intégrée dans le double feuillet phospholipidique.

3.3 CINÉTIQUES AVEC LE VIH.

Nous avons d'abord cherché à savoir si l'attachement et l'entrée du VIH enclencheraient le programme d'apoptose dans des cellules CEM. Les cellules ont d'abord été incubées avec un surnageant de cellules infectées qui a été récolté à 4 jours post-infection (p.i.), au moment où la concentration virale du surnageant est maximale. Le titre viral d'un surnageant de 4 jours p.i. d'une cinétique d'infection de cellules CEM par le VIH a été calculé antérieurement dans notre laboratoire, selon la méthode de Kärber, à environ 10^6 DICT₅₀/ml (Chagnon, 1990). Trois millions de cellules de 4 jours après un passage (phase plateau), ont donc été incubées avec un surnageant inactivé par la chaleur et dilué par un facteur de 10 ou 20 avec du RPMI complet. A trois reprises, à toutes les 30 minutes, le niveau d'apoptose a été vérifié et, comme on peut le voir à la figure 12, aucun surnageant viral n'a induit d'apoptose durant les 90 minutes de l'incubation.

L'expérience a été répétée dans des conditions similaires à la précédente mais en utilisant une population de cellules en phase exponentielle (3 jours après un passage cellulaire) ainsi que des cellules récoltées 4 jours après un passage. La figure 13 nous montre que les cellules n'ont pas été induites en apoptose puisque le pourcentage d'apoptose n'a pas dépassé le niveau des 6 %. La très légère augmentation du niveau d'apoptose de l'échantillon des cellules de 4 jours incubées avec un surnageant dilué par un facteur de 10, n'est pas significative puisqu'elle se produit en concomitance avec l'augmentation également observée des deux témoins négatifs (voir lignes pointillées, figure 13).

Pour l'étape suivante, nous avons incubé des cellules CEM récoltées 3 jours après un passage, avec un échantillon de virus concentré par ultracentrifugation. La concentration virale a été déterminée par un comptage au microscope électronique, à l'aide de billes de latex (voir section 2.4), et se situait à 2×10^9 particules virales/ml. Pour la première cinétique de 90 minutes, le VIH ultracentrifugé a été inactivé par la chaleur avant d'être mis en présence des cellules. La **figure 14**, montre qu'il ne semble pas y avoir de différence entre les cellules incubées avec le VIH et les témoins négatifs; le pourcentage d'apoptose demeure stable à 5%. Finalement, pour la dernière cinétique, le VIH ultracentrifugé n'a pas été inactivé et c'est donc des virions intacts et infectieux qui ont été ajoutés aux cellules. Le résultat, cependant, ne diffère pas des autres et tel que montré à la **figure 15**, le pourcentage d'apoptose se situe aux alentours de 6 % tout au long des 90 minutes d'incubation. On peut donc conclure que le VIH n'induit pas d'apoptose chez les cellules CEM dans les conditions expérimentales que nous avons choisies.

Il faut prendre note que pour les cinétiques avec le VIH, nous n'avons pas poursuivi l'incubation au delà de 90 minutes car nous avons voulu évaluer seulement l'effet de l'attachement et de l'internalisation du virus sur l'intégrité de la cellule. De plus, nous avons voulu conserver un ratio élevé de particules virales:cellules. C'est pourquoi si peu de cellules (3 millions par échantillon) ont été utilisées. De là, l'obligation à mesurer le pourcentage d'apoptose seulement par cytométrie en flux. Toutefois, et bien que les résultats présentés aux **figures 12 à 15** n'ont pu être confirmés par un comptage en microscopie électronique, la constance des pourcentages obtenus nous permet de croire en l'exactitude de ceux-ci.

3.4 INCUBATION DES CELLULES CEM AVEC LES IMMUNOSOMES.

Les IMS ont été évalués pour leur capacité à induire de l'apoptose chez des cellules T CD4 positives.

La **figure 16** montre que les IMS, même à une concentration de 400 µg/ml n'induisent pas d'apoptose après 6 heures d'incubation. Les cellules avaient été récoltées 4 jours après un passage cellulaire, d'une population de cellules qui venait d'entrer dans une phase plateau, si on se réfère à la courbe de croissance présentée à la **figure 4**. Bien que le signal d'apoptose soit probablement donné dans les premières heures de l'incubation, il se peut que les premiers signes de l'apoptose tardent à se manifester. Ainsi, dans une expérience ultérieure, les cellules ont été mises en contact avec les IMS dans 1 ml de PBS afin que le signal d'apoptose, s'il y a en un, soit envoyé et reçu par les cellules. A la troisième heure de l'incubation, 14 ml de RPMI complet ont été ajoutés et l'incubation s'est poursuivie pendant 24 heures supplémentaires. La **figure 17a** montre que même après 27 heures d'incubation, le taux d'apoptose dans les échantillons contenant 50 et 100 µg/ml d'IMS se situe au niveau des témoins négatifs, soit la BSA, les liposomes et le RPMI. On note aussi à la **figure 17b**, une baisse non-significative de 5 % de la viabilité, survenant surtout dans les trois premières heures de l'incubation, lorsque l'encombrement des cellules était maximal. Les cellules provenaient également d'une population dont la croissance avait atteint un plateau (4 jours après un passage).

Afin de vérifier si des cellules provenant d'une population en phase exponentielle pouvaient répondre au signal d'apoptose de façon plus convaincante, une autre expérience a été conduite dans les conditions

similaires à la précédente. Une population de cellules CEM de trois jours après un passage, ont été incubées avec 100 ou 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'IMS et, tel que présenté à la **figure 18**, ni la viabilité, ni le taux d'apoptose n'ont varié de façon significative.

Ainsi, comme pour le VIH, les IMS se sont montrés totalement incapables d'induire les cellules CEM en apoptose dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées. Nous avons, par ailleurs, préalablement investigué et conclu que d'incuber des cellules avec les IMS dans du PBS plutôt que du RPMI pendant les 3 premières heures de l'incubation, ne modifiait en rien le résultat final. Pour ces incubations, le milieu choisi n'avait donc pas d'impact sur les cellules (résultats non montrés).

3.5 CINÉTIQUES AVEC LA GLYCOPROTÉINE GP160.

3.5.1 Cinétiques de 6 heures avec différentes concentrations de gp160.

Dix millions de cellules ont été incubées dans 1 ml de PBS durant 6 heures avec 50, 100 μg de gp160, ou 100 μg de BSA. On peut voir à la **figure 19a**, qu'entre la troisième et sixième heure d'incubation, la viabilité des cellules a chuté dans les échantillons contenant la gp160, contrairement aux témoins négatifs (BSA et RPMI). La baisse de viabilité a été plus importante pour l'échantillon contenant la plus grande concentration de gp160 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), passant de 96 à 56%, comparativement à 96 à 84% pour les cellules incubées avec la gp160 à 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La **figure 19b** nous montre également que le pourcentage d'apoptose a augmenté dans la population de cellules incubée avec 100 μg de gp160, atteignant 15.6% après 6 heures d'incubation. Ce résultat est significativement

plus élevé que les témoins négatifs, dont aucun ne dépasse 8% d'apoptose. Il apparaît donc que la gp160 soit capable d'induire l'apoptose dans une population de cellules CEM, en seulement 6 heures. Cette cinétique a été répétée 3 fois et la **figure 19** présente la moyenne des pourcentages de viabilité et d'apoptose pour chaque échantillon. Les taux d'apoptose ont été mesurés par cytométrie en flux. Le comptage au microscope électronique (résultats non-montrés) est venu par la suite confirmer ces résultats.

3.5.2 Cinétiques de 25 heures avec de la gp160 dans différents milieux.

Afin d'avoir une vue plus globale de la situation et pour vérifier si, après 6 heures, le pourcentage de cellules apoptotiques avait atteint un plateau, la durée des cinétiques a été prolongée jusqu'à 25 heures. De plus, nous avons voulu vérifier si différents milieux pouvaient influencer d'une certaine façon l'induction de l'apoptose.

Les résultats de la première expérience sont montrés à la **figure 20**. D'abord, les cellules incubées avec 100 µg de gp160 dans du PBS (gp160:PBS) ou du RPMI sans SFB (gp160:RPMI-SFB) ont montré une importante perte de viabilité (**Figure 20a**). En effet, après 25 heures d'incubation il ne restait que 10% de cellules vivantes. Les cellules témoins, qui étaient incubées soit dans du RPMI complet (RPMIc.) ou du RPMI sans SFB (RPMI-SFB) et en l'absence de gp160, ont conservé le meilleur taux de viabilité (entre 71 et 88%). Il est à noter que malgré la présence de la gp160 (100µg/ml), les cellules dans le RPMI avec SFB (gp160: RPMIc.) ont survécu de façon remarquable (viabilité de 66% après 25 heures d'incubation).

Nous avons ensuite quantifié le pourcentage d'apoptose par cytofluorométrie. La **figure 20b**, nous montre que, déjà après six heures d'incubation, 29% des cellules ont été induites en apoptose par la gp160 dans du PBS (gp160:PBS) tandis que le taux d'apoptose s'élevait à 14.3% lorsque les cellules ont été incubées dans du RPMI-SFB avec la gp160 (gp160:RPMI-SFB). L'échantillon de cellules avec la gp160 dans du RPMI complet (gp160:RPMIc.) montre seulement 5.5 % d'apoptose, ce qui est comparable aux pourcentages des trois témoins (BSA:PBS, RPMIc. et RPMI-SFB). Après 25 heures, les taux d'apoptose les plus élevés ont été observés avec les cellules qui ont été incubées avec la gp160 dans le RPMI-SFB et dans le PBS (gp160:RPMI-SFB et gp160:PBS) . Les trois témoins et les cellules incubées avec la gp160 dans du RPMI complet (gp160:RPMIc.) ont vu leur taux d'apoptose s'élever au-dessus des 15% tout en ne dépassant pas les 20 %.

Trois points émergent donc de ces résultats. Premièrement, les conditions optimales pour induire l'apoptose sont d'incuber des cellules dans du PBS en présence de 100 µg/ml de gp160. Le taux d'apoptose augmente rapidement pour ensuite se stabiliser aux alentours de 25%. Deuxièmement, la gp160 dans du RPMI sans SFB semble aussi propice à l'induction d'apoptose bien que les cellules aient besoin de plus de 6 heures pour atteindre un taux d'apoptose semblable aux cellules incubées dans du PBS avec de la gp160. Troisièmement et de façon tout à fait inattendue, l'addition de 10 % de SFB au RPMI prévient l'apoptose induite par la gp160 et permet de conserver une très bonne viabilité des cellules tout au long de la durée d'incubation (voir **figure 20a** et **20b**: gp160:RPMIc.).

Dans le but de vérifier si le sérum foetal bovin était responsable de la protection de l'apoptose induite par la gp160, nous avons effectué des cinétiques de 24 heures dans lesquelles du SFB a été ajouté au PBS en présence de 100µg/ml de gp160. A titre de témoin positif, 100 µg/ml de gp160 a également été additionné aux cellules incubées dans du PBS (gp160:PBS). La **figure 21a** confirme qu'une grande proportion de cellules meurent lorsque incubées dans du PBS en présence de la gp160 (viabilité de 11.3 % après 24 heures d'incubation). Quant aux cellules mises en présence de la gp160 dans du PBS additionné de SFB (gp160:PBS+SFB), la viabilité se situe aux environs de 35 % après 24 heures. A noter cependant, qu'après six heures d'incubation, la viabilité était encore excellente et se comparait aux cellules témoins (RPMIc.) tandis que la baisse de la viabilité dans l'échantillon gp160:PBS était déjà très marquée (58 % de viabilité).

En ce qui concerne l'apoptose, la **figure 21b** montre clairement que l'addition de SFB au PBS protège les cellules de l'apoptose induite par la gp160. En effet, on observe que seulement 6 et 8.8 % de cellules sont en apoptose dans l'échantillon gp160:PBS+SFB, après 6 et 24 heures d'incubation. Également, le pourcentage d'apoptose de l'échantillon RPMIc. qui contient aussi du sérum foetal bovin, est au même niveau, soit 7 et 7.9 % d'apoptose après 6 et 24 heures d'incubation. Ces résultats contrastent avec les 31.5 et 28.9 % d'apoptose obtenus à 6 et 24 heures, avec les cellules incubées dans du PBS avec la gp160. Il devient donc évident que lorsque le PBS est additionné de 10 % de SFB, les cellules résistent à l'action de la gp160 et l'apoptose n'a pas lieu.

3.5.3 Rôle de la gp160 dans l'induction de l'apoptose.

Dans le but de recueillir des preuves supplémentaires et de mieux définir le rôle de la gp160 dans l'induction de l'apoptose, deux expériences additionnelles ont été entreprises. D'abord, la gp160 a été complexée à des anticorps anti-gp160 avant d'être incubée avec les cellules CEM. Dans la deuxième expérience, la gp160 a été incubée avec des cellules humaines lymphoblastiques de type B isolées d'un lymphome de Burkitt (lignée Raji).

Cent $\mu\text{g/ml}$ de gp160 ont été complexés pendant 2 heures avec des anticorps de souris anti-gp160. Les complexes ont ensuite été ajoutés aux cellules et l'incubation s'est poursuivie durant 25 heures. La **figure 22** nous présente les profils de cytofluorométrie des 5 échantillons, après 6 heures d'incubation. Les axes gradués à l'échelle logarithmique des histogrammes 1 (H1), représentent la fluorescence versus la taille des noyaux. Ceux des histogrammes 2 (H2), aussi à l'échelle logarithmique, représentent la fluorescence versus le nombre de noyau. Les pourcentages d'apoptose sont mesurés à partir des histogrammes 2, qui nous montrent la distribution des noyaux selon l'intensité de leur fluorescence. Ainsi, dans le premier échantillon (gp160:PBS), 29 % des noyaux se sont retrouvés dans la région hypodiploïde A_0 (fig. 22a). Dans le second échantillon, où la glycoprotéine a été pré-incubée avec des anticorps anti-gp160, le pourcentage d'apoptose est passé de 29 à 9.5% (fig. 22b). Ce résultat est néanmoins légèrement plus élevé que les 5 à 6% d'apoptose des témoins négatifs (fig. 22c, d, e). Une explication logique à cette légère augmentation du taux d'apoptose, serait qu'une quantité insuffisante d'anticorps a été utilisée et que la gp160, étant en surnombre, est parvenue à induire un petit pourcentage de cellules en apoptose. L'expérience

est tout de même significative car elle démontre que les cellules échappent à l'apoptose lorsqu'on empêche la gp160 d'interagir avec les cellules CEM.

Un témoin additionnel de spécificité a été utilisé dans ces expériences. Il s'agit de la glycoprotéine du virus de l'influenza (gpInfl.) qui a remplacé la BSA. La glycoprotéine de l'influenza s'apparente mieux que la BSA, à la gp160, car, comme celle-ci, elle est multimérique, glycosylée et se présente sous forme de rosettes. Ainsi, le fait qu'il n'y a que 6.31% d'apoptose dans l'échantillon contenant la gpInfl. (gpInfl:PBS) (fig. 22d) comparativement au 29% d'apoptose avec la gp160 vient consolider encore plus notre hypothèse que la gp160 induit les cellules susceptibles en apoptose. Ces résultats laissent croire que l'induction de l'apoptose doit se faire via la molécule CD4, qui est le récepteur cellulaire pour la gp160. La glycoprotéine du virus de l'influenza s'attache plutôt à un acide sialique.

En considérant tous les résultats accumulés jusqu'ici avec la glycoprotéine de l'enveloppe du VIH et sur la base de l'hypothèse que c'est l'interaction de la gp160 avec le CD4 qui induit un signal d'apoptose, il est logique de croire que des cellules n'exprimant pas ou très peu la molécule CD4 à leur surface, ne devraient pas répondre aux signaux d'apoptose donnés par la gp160. Pour vérifier cet énoncé, des cellules Raji qui, on l'a vu à la figure 5, n'expriment pas de molécule CD4, ont été incubées pendant 6 heures avec la gp160 dans des conditions optimales pour l'induction de l'apoptose. La figure 23 nous montre que, contrairement aux cellules CEM, les cellules Raji sont réfractaires à l'apoptose lorsqu'elles sont en présence de la gp160 dans le PBS. Les pourcentages demeurent aux alentours de 8 %. Observées au microscope électronique, les cellules Raji ont une chromatine plus dense que les cellules

CEM. Le comptage nous a donné des pourcentages d'apoptose analogues à 2 ou 3% près, des résultats obtenus par cytométrie en flux. Ces résultats nous suggèrent fortement que c'est l'interaction de la gp160 avec le récepteur CD4 qui est responsable de l'induction de l'apoptose chez les cellules CEM.

3.5.4 Sérums humains.

Nous avons précédemment démontré que le sérum foetal bovin protégeait les cellules de l'apoptose induite par la gp160. Nous avons donc voulu voir si des sérums humains de personnes séronégatives ou séropositives à différents stades de l'infection, pouvaient avoir un effet analogue au SFB. Nous avons utilisé deux sérums de personnes séropositives asymptomatiques et deux sérums de patients sidéens. Finalement, deux sérums proviennent de donneurs séronégatifs.

La **figure 24a** montre la viabilité et la **figure 24b**, le taux d'apoptose de chaque échantillon, lors d'une cinétique de 24 heures. Cinq millions de cellules ont été incubées dans 0.5 ml de PBS auquel on avait ajouté 100 µg/ml de gp160 (sauf pour le témoin négatif) ainsi que 10% des différents sérums humains. Après 24 heures, les cellules incubées avec les sérums séronégatifs (SN) ont conservé la meilleure viabilité (moyenne de 53 % de viabilité). Quant aux sérums séropositifs (patients asymptomatiques et sidéens), la viabilité des cellules se situait après 24 heures d'incubation, à 38.4 et 30.9 %. On peut voir à la **figure 24a** qu'après 20 et 24 heures d'incubation, la viabilité de ces échantillons (SP et S) était très semblable (aux alentours de 35 %) et qu'ainsi regroupés, ils se distinguaient de façon évidente des sérums séronégatifs dont le taux de viabilité avoisinait les 70% après plus de 20 heures d'incubation. A

titre de témoin positif, des cellules ont été incubées avec la gp160 dans le PBS sans sérum. Déjà après 7 heures d'incubation, on a noté qu'un peu moins de 50% des cellules étaient vivantes, et que presque toutes les cellules étaient mortes après 24 heures d'incubation.

La figure 24b nous montre le taux d'apoptose après 7 heures d'incubation. Le taux d'apoptose chez les cellules témoins (gp160:PBS) se chiffrait à plus de 19%. Les sérums séronégatifs ont conservé un taux d'apoptose au même niveau que le témoin négatif (PBS), soit environ 9%. Les sérums positifs, se sont montrés moins efficaces que les sérums séronégatifs à protéger les cellules de la gp160, puisque le niveau d'apoptose était en moyenne, de 12.83 % (gp160:SP) et 13.38 % (gp160:S). Ces expériences tendent donc à démontrer que, tout comme le sérum foetal bovin, les sérums humains sont capables de freiner l'induction d'apoptose causée par l'action de la gp160. De plus, les sérums provenant de patients séropositifs ont tendance à être moins efficaces que les sérums séronégatifs à protéger les cellules de la gp160 (Voir annexe II pour les analyses statistiques).

DISCUSSION

4.1 LES CELLULES CEM.

Le but premier de ce travail était d'évaluer la capacité de la gp160/120 sous diverses formes, à induire des cellules T CD4+ en apoptose, dans différentes conditions. Les cellules CEM ont été choisies pour plusieurs raisons. Tel que mentionné plus tôt, les cellules CEM sont des lymphocytes T CD4+ transformés provenant d'une fillette atteinte d'une leucémie lymphoblastique aiguë. Tel que constaté par cytofluorométrie, ces cellules forment une population très homogène. Plus de 96% de la population cellulaire exprime le récepteur CD4 (figure 5). De plus, des expériences préliminaires avec ces cellules nous ont permis de constater qu'elles réagissent promptement au dexaméthasone ou à une privation de facteurs de croissance en activant le processus d'apoptose. Les cellules CEM ont donc été induites en apoptose par privation de facteurs de croissance afin de mettre au point nos techniques qui nous ont permis, par la suite, de bien quantifier le phénomène d'apoptose dans chacune de nos expériences. Pour ce qui est de la microscopie électronique, ces cellules possèdent un gros noyau et ceci s'est avéré un atout lors du comptage, afin de différencier les cellules apoptotiques des cellules normales.

Les cellules CEM ont également été choisies parce qu'elles expriment un taux élevé de CD4 et qu'elles sont très susceptibles à l'infection par le VIH. De plus, ces cellules se multiplient rapidement, sans adhérer au flacon de polystyrène. Lors d'un passage cellulaire, il suffisait d'agiter brièvement le flacon pour remettre en suspension les cellules. Aucun traitement à la trypsine qui altère les récepteurs et autres protéines à la surface des cellules n'était donc requis pour la resuspension des cellules.

4.2 CINÉTIQUES AVEC LE VIH.

Les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH sont en très grande majorité présentes à la surface du virus sous la forme d'un hétérodimère gp120-gp41. C'est par l'entremise de certaines régions de la gp120 que le VIH s'attache d'abord à son récepteur cellulaire (Olshevasy *et al.*, 1990; Syu *et al.*, 1990). La fusion des membranes virales et cellulaires qui s'ensuit requiert l'intervention de la gp41 (Kowalski *et al.*, 1987). Lors de ces deux étapes initiales de l'infection, nous avons tenté de savoir si les complexes gp120-gp41 présents à la surface du virus pouvaient faire également parvenir aux cellules un signal d'apoptose.

Les cinétiques effectuées avec le VIH (voir **figures 12-15**) indiquent que l'attachement et l'entrée du virus ne provoquent pas l'enclenchement du programme d'apoptose dans ces cellules. Le fait que les virus proviennent d'un surnageant de cellules infectées, ou d'un échantillon viral ultracentrifugé n'a eu aucun impact observable sur le taux d'apoptose. Pourtant, dans les cinétiques où le virus ultracentrifugé a été utilisé, le ratio de virus:cellules a pu être augmenté par un facteur d'au moins 50 comparativement aux échantillons de virus provenant d'un surnageant de cellules infectées. L'absence d'induction d'apoptose n'est donc pas relié au fait d'avoir utilisé une quantité insuffisante de virus mais bien parce que l'attachement et l'internalisation du VIH n'induisent pas les cellules en apoptose. Il est à noter que si toutes les cinétiques effectuées avec le VIH ont été d'une durée n'excédant pas les 90 minutes, c'était pour éviter que le virus ait le temps d'amorcer son processus de réplication, ce qui aurait pu rendre les résultats difficiles à interpréter. Par ailleurs, un examen de l'échantillon viral par

microscopie électronique nous a informés quant au bon état de conservation des virus utilisés pour les cinétiques. Seulement quelques virus observés étaient abîmés, probablement par la préparation de l'échantillon viral pour la microscopie électronique.

Laurent-Crawford *et al.* (1993) ont démontré que l'entrée du virus dans les cellules CEM n'était pas suffisant pour induire l'apoptose. Lors d'une infection synchronisée, l'addition de l'AZT en même temps que le virus n'a pas empêché l'entrée du virus mais a plutôt bloqué la transcription inverse de son ARN. Une inhibition significative de la production virale, de la formation de syncytia et de l'enclenchement de l'apoptose ont pu alors être observées. De ces observations, ils ont conclu que sans répllication, le virus ne peut par lui-même induire le processus d'apoptose (Laurent-Crawford *et al.*, 1993). En fait, selon eux, le virus doit se répliquer au moins une fois pour que la cellule puisse exprimer à la surface de sa membrane, la glycoprotéine virale de l'enveloppe. C'est seulement suite à son expression sur la membrane cellulaire que la glycoprotéine virale devient une puissante inductrice d'apoptose pour les cellules CD4+ non-infectées. Les chercheurs ont également démontré que la glycoprotéine doit être exprimée sous la forme de l'hétérodimère gp120-gp41 pour induire l'apoptose. L'expression exclusive de la gp120 ou de la gp41 n'induit pas d'apoptose dans les cellules CD4+ cibles (Laurent-Crawford *et al.*, 1995).

Corbeil et Richman (1995) ont effectué une cinétique de 3 jours avec un échantillon de virus infectieux et un autre de virus non-infectieux suite à un traitement avec un agent anti-viral en combinaison avec une irradiation aux ultraviolets. Après trois jours d'incubation, le pourcentage de cellules en apoptose avec le virus infectieux a augmenté à plus de 50% comparativement aux 5%

d'apoptose pour les cellules incubées avec le virus non-infectieux ainsi que pour les cellules témoins (Corbeil et Richman, 1995). En accord avec les résultats de Laurent-Crawford et al. (1993), les auteurs ont conclu que le virus doit donc se répliquer au moins une fois pour qu'apparaisse la glycoprotéine virale à la surface de la cellule infectée afin de pouvoir induire les cellules T CD4+ avoisinantes en apoptose.

4.3 INCUBATIONS DES CELLULES CEM AVEC LES IMMUNOSOMES.

Dans les années 80, notre laboratoire a développé une méthode qui permet l'insertion de glycoprotéines virales dans le double feuillet phospholipidique de liposomes préformés. Les glycoprotéines de l'enveloppe des virus de la rage, de l'influenza et du VIH ont toutes été ancrées avec succès par leur région hydrophobe dans la membrane des liposomes. Ces liposomes recouverts de glycoprotéines virales, maintenant connu sous l'appellation d'Immunosomes, ressemblent beaucoup aux particules virales, à la différence près qu'ils ne contiennent pas d'acide nucléique et de protéines autres que la gp160.

La technologie des IMS s'avère une approche très intéressante dans l'élaboration de vaccins sûrs et efficaces. Les résultats ont d'ailleurs démontré que les glycoprotéines virales deviennent beaucoup plus immunogéniques lorsqu'elles sont ancrées à la surface des IMS (Thibodeau, 1991). La membrane lipidique de l'IMS semble assurer la conformation native des glycoprotéines présentes et jouerait donc le rôle de l'enveloppe virale.

L'utilisation de l'IMS-gp160 dans ce projet, nous apparaissait très attrayant pour diverses raisons. D'abord, les IMS ont une structure analogue à la particule virale. Deuxièmement, seule la glycoprotéine du VIH est présente à la surface des IMS. Elle est donc présentée aux cellules CD4+ de façon spécifique. De plus, la gp160 est présentée sous sa conformation native. Troisièmement, les IMS ne contiennent pas d'acide nucléique et d'enzymes pouvant la répliquer. Ainsi, les temps d'incubation ont pu être prolongés à 24 et 27 heures sans crainte d'y voir apparaître de réplication virale.

L'IMS représentait donc une nouvelle approche pour vérifier si l'attachement et l'entrée du virus induisent les cellules en apoptose. En effet, lors de ces deux premières étapes de l'infection, la gp160 habituellement ancrée à l'enveloppe virale, interagit avec la molécule CD4 qui est présente à la surface des cellules. Nous pensons que les IMS nous ont permis de reproduire cette interaction entre la glycoprotéine et son récepteur. Ainsi, le fait que les IMS-gp160 se soient montrés incapables d'induire les cellules CEM en apoptose, constitue une preuve supplémentaire que l'attachement et l'entrée du virus n'induisent pas l'apoptose. De plus, l'absence d'apoptose malgré les différentes concentrations d'IMS utilisées et les temps d'incubation relativement longs apporte plus de poids à notre conclusion. Rappelons également que nos résultats avec les IMS sont en accord avec les conclusions de Laurent-Crawford *et al.* (1993) à l'effet que les premières étapes de l'infection ne sont pas suffisantes pour enclencher le programme d'apoptose.

4.4 CINÉTIQUES AVEC LA GLYCOPROTÉINE GP160.

L'agencement en rosette de la glycoprotéine gp160 tel qu'on peut l'observer à la figure 11a, s'explique par le fait que la gp160 n'est pas complètement soluble. Une région hydrophobe située près de l'extrémité carboxylique de la glycoprotéine assure habituellement l'ancrage de la glycoprotéine dans la membrane virale. Lorsque les glycoprotéines sont en solution aqueuse, cette région transmembranaire de la glycoprotéine attire la région homologe des gp160 avoisinantes pour ainsi former des sortes de micelles que l'on appelle rosettes de glycoprotéines. Ces rosettes de glycoprotéines ont été incubées avec des cellules CEM dans différentes conditions expérimentales toujours dans le but d'évaluer leur pouvoir d'induire en apoptose des cellules T CD4+ non-infectées.

On sait depuis plusieurs années que la gp160 subit un clivage protéolytique intracellulaire pour générer les gp120 et gp41 matures (Willey *et al.*, 1988). Par ailleurs, la gp160 peut emprunter plusieurs voies métaboliques à l'intérieur de la cellule, si bien que finalement, on estime que seulement 10 à 20% de la gp160 est converti en gp120 et gp41 (McKeating et Willey, 1989). Les autres gp160 synthétisées par la cellule sont soit dégradées dans les lysosomes ou encore, sécrétées à l'extérieur de la cellule (Kalyanaraman et Gallo, 1988). Cette sécrétion de la glycoprotéine précurseur est suffisamment importante pour que des concentrations en picomolaire de la gp160 soient détectées dans le sang de patients sidéens (Oh *et al.*, 1992). Étant au courant des ces dernières données, il nous apparaissait pertinent de planifier et d'effectuer des cinétiques avec la glycoprotéine virale afin d'évaluer son effet sur des cellules T CD4+.

Des cinétiques de 6 heures ont d'abord été effectuées avec différentes concentrations de gp160. Puisque la durée des cinétiques n'excédait pas 6 heures, nous avons opté pour un milieu d'incubation des plus élémentaires afin que les rosettes de gp160 interagissent avec les cellules sans qu'il y ait d'interférence de la part d'une composante protéique ou autre provenant du milieu. Comme il est donné de voir à la **figure 19**, les cellules qui ont été incubées dans du PBS en présence de 100 µg/ml de gp160 ont très rapidement réagi. Une baisse considérable de la viabilité et un taux d'apoptose deux fois plus élevé que les témoins ont été observés dans cette population de cellules, après seulement 6 heures d'incubation. Pour exclure la possibilité qu'un encombrement protéique trop grand pourrait être la cause de ces phénomènes, 100 µg/ml de BSA (l'albumine bovine sérique) ont été ajoutés dans un échantillon témoin de cellules. Comme on peut le noter à la **figure 19**, la BSA n'a pas diminué la viabilité ou augmenté le taux d'apoptose, ce qui confirme que la gp160, sous forme de rosette, induit spécifiquement des cellules T CD4+ non-infectées, en apoptose.

Pour faire suite à cette première série d'expériences, d'autres cinétiques de plus longue durée ont été réalisées. Outre le PBS, les cellules CEM ont été incubées pendant 25 heures avec du RPMI additionné ou non de 10% de SFB. La gp160 a été ajoutée à une concentration de 100µg/ml. Les résultats montrés à la **figure 20** confirment que la gp160 dans du PBS induit les cellules en apoptose en seulement 6 heures d'incubation. De plus, on a noté que les milieux dans lesquels sont incubées les cellules influencent jusqu'à un certain point, l'induction de l'apoptose. A remarquer tout spécialement que, lorsque les cellules sont incubées en présence de la gp160 dans du RPMI complet, c'est-à-dire additionné de 10% de SFB, les taux d'apoptose après 6 et 25 heures d'incubation se maintiennent au niveau de ceux

des cellules témoins (BSA:PBS, RPMIc. et RPMI-SFB). Il en va tout autrement pour les cellules incubées avec la gp160 dans du RPMI sans SFB et dans du PBS. A priori, ces résultats suggèrent que le sérum foetal bovin contient des facteurs susceptibles d'accroître la résistance des cellules CEM à entrer en apoptose, suite à une incubation avec la gp160.

Un autre phénomène sur lequel nous aimerions attirer l'attention concerne le très court laps de temps entre le début de l'incubation et l'induction en apoptose d'une proportion significative de la population. En moins de 6 heures, le taux maximal d'apoptose est atteint dans la population de cellules incubées dans du PBS en présence de la gp160. Pour ce qui est des cellules incubées dans du RPMI sans SFB, l'augmentation du taux d'apoptose se fait plus lentement mais atteint tout de même son maximum à l'intérieur des 24 premières heures. Ces données nous permettent de croire que c'est la gp160 et non une privation de facteurs de croissance qui cause l'apoptose dans ces populations. L'induction de l'apoptose par une privation de facteurs de croissance s'effectue beaucoup plus graduellement et s'échelonne sur une période de 3 à 4 jours plutôt qu'en 6 heures.

Par ailleurs, on s'explique mal le fait qu'on ait obtenu un plateau à seulement 30% d'apoptose dans une population de cellules aussi homogène. Les cellules sont peut-être susceptibles à entrer en apoptose seulement lorsqu'elles sont dans une phase spécifique du cycle cellulaire. La phase G₁ a dernièrement été suggérée (Corbeil et Richman, 1995).

Quoi qu'il en soit, un fait demeure: en l'absence de SFB dans le milieu d'incubation, la gp160 induit en apoptose, en moins de 6 heures, jusqu'à 30% d'une population de cellules CEM. Afin de confirmer que le SFB empêche l'induction

d'apoptose dans les conditions décrites précédemment, une autre cinétique de 24 heures a été effectuée. Lors de cette expérience, le SFB a été ajouté dans du PBS. Les expériences précédentes nous ont montré que la gp160 dans du PBS induisait les plus hauts pourcentages d'apoptose. Il nous apparaissait donc dans l'ordre des choses d'évaluer l'effet sur le taux d'apoptose que produirait l'ajout de SFB dans le PBS. Les résultats, qui sont présentés à la **figure 21b**, démontrent clairement l'efficacité du SFB à protéger les cellules de l'apoptose induit par la gp160. En effet, les taux d'apoptose sont ramenés à un taux de base avec l'ajout de SFB dans le PBS.

Le sérum foetal bovin est très riche en cytokines et facteurs de croissance. Il serait très intéressant de déterminer le ou les composantes du sérum qui sont responsables de la sauvegarde des cellules d'une mort par apoptose. Cependant, en considérant le nombre important de substances présentes dans le SFB et considérant que l'identification du ou des facteurs protecteurs de l'apoptose dépasse largement le cadre de ce projet, nous sommes restreints, pour l'instant, à faire de la spéculation. Dans ce sens, l'interleukine 2 et l'interleukine 1 nous apparaissent comme d'excellents candidats. Gougeon et collaborateurs (1993) ont d'ailleurs noté que l'addition d'un mélange d'IL-2 et d'IL-1 α était suffisant pour prévenir l'apoptose induit par l'ionomycine dans une population de lymphocytes fraîchement recueillie de patients infectés par le VIH. Ils ont par contre noté que sans l'IL-1 α , l'ajout simple de l'IL-2 ne bloquait pas le processus d'apoptose. Aucune des autres cytokines testées (IL-4, IL-5, IL-6 et TNF α) n'a été en mesure de prévenir l'apoptose dans les lymphocytes T (Gougeon *et al.*, 1993). Plus récemment, Chia *et al.* (1995), ont démontré que le simple ajout d'IL-2 recombinant protégeait de l'apoptose, les lymphocytes T cytotoxiques prélevés de patients séropositifs asymptomatiques.

Les résultats obtenus avec la gp160 nous apparaissaient convainquants. Nous avons trouvé des conditions expérimentales dans lesquelles une induction de l'apoptose par la glycoprotéine gp160 dans une population de lymphocytes T CD4+ avait pu être démontré. En consultant la littérature, nous avons constaté que nos résultats contredisaient quelques résultats déjà publiés. Laurent-Crawford *et al.* (1993) ont d'abord rapporté que des cellules CEM et MOLT4-T4 n'étaient pas affectées significativement après plusieurs jours d'incubation avec 2 µg/ml de gp160 ou gp120 recombinantes. Ils ont tout de même noté qu'en présence de la gp160 et non de la gp120, les cellules forment des agrégats. Ils ont conclu que leurs résultats constituent une preuve supplémentaire à l'effet qu'il était nécessaire que la glycoprotéine de l'enveloppe soit associée à la membrane cellulaire pour être en mesure d'induire l'apoptose (Laurent-Crawford *et al.*, 1993). Pour notre part, nous pensons que les quantités utilisées lors de leurs expériences étaient en dessous du seuil critique pour induire les cellules en apoptose. Il n'y avait aucune mention dans leur article, de la concentration cellulaire ainsi que le milieu de culture utilisés lors de leurs expériences.

Un an plus tard, une étude démontrait également que 1 µg/ml de gp120 soluble sous forme de monomère, était incapable d'induire de façon significative un clone de cellules T CD4+ humaines (SPB21) en apoptose (Schwartz *et al.*, 1994). Ce résultat n'est pas tout à fait en contradiction avec les nôtres, puisque c'est de la gp120 et non de la gp160 qui a été utilisée. De plus, leur glycoprotéine était monomérique alors que la nôtre est polymérique. Il aurait été tout de même intéressant de voir quel effet une plus grande quantité de gp120 aurait pu avoir sur les cellules. Finalement, une étude de Martin *et al.* (1994) montre l'absence d'apoptose dans des cultures de cellules T (clone H9 ou des cellules T du sang

périphérique) traitées avec de la gp120 soluble. La gp120 a été ajoutée en quantité suffisante pour saturer les cellules. Bien que cet enrobage des cellules T CD4+ du sang périphérique par la gp120 ne les aient pas induites en apoptose, une baisse de la réponse proliférative suite à une stimulation via le TcR a pu être observée (Martin *et al.*, 1994). A noter qu'encore une fois, il s'agit de la gp120 et non pas de la gp160.

A la recherche de preuves supplémentaires qui pourraient venir appuyer, nos premières observations avec la gp160, nous avons procédé à une autre incubation de 25 heures avec de la gp160 qui avait été, au préalable, complexée à des anticorps anti-gp160. La figure 22 nous présente les pourcentages d'apoptose après 6 heures d'incubation. En comparant la gp160 dans le PBS (fig. 22a) avec gp160 préincubée avec un anticorps anti-gp160 (fig. 22b), on en vient rapidement à la conclusion que lorsque les anticorps se complexent à la gp160, celle-ci perd son potentiel d'induire l'apoptose et les cellules demeurent vivantes. Les anticorps anti-gp160 nous ont donc permis de démontrer que la gp160 induit les cellules en apoptose de manière spécifique. De plus, la gp160 semble également être responsable de la mort des cellules qui périssent autrement que par apoptose puisque la viabilité passe de 22% à 90.3% lorsque les anticorps anti-gp160 ont été ajoutés et que l'apoptose ne peut expliquer à elle seule, le taux de mortalité si élevé des cellules incubées avec la gp160 sans anticorps (fig. 22a). Les cellules incubées avec 100 µg/ml de glycoprotéine du virus de l'influenza (HA) n'ont pas été induites en apoptose, ce qui démontre que ce n'est pas la présentation sous forme de micelles ou l'encombrement stérique qui confère à la gp160 le pouvoir d'induire cette population de cellules en apoptose.

Théoriquement, des cellules qui n'expriment pas ou peu le récepteur de la gp160 ne devraient pas être affectées par la présence de la glycoprotéine du VIH. Des cellules Raji qui sont des lymphocytes B transformés et qui expriment très peu le récepteur CD4 (voir figure 5), ont donc été évaluées pour leur susceptibilité à être induites en apoptose par la gp160. Comme nous pouvons l'observer à la figure 23, l'absence d'apoptose après 6 heures d'incubation avec la gp160 dans du PBS confirme que la gp160 est sans effet sur ces cellules, fort probablement dû à l'absence de récepteurs CD4 à la surface de leur membrane.

A travers les différentes expériences effectuées avec la gp160 lors de ce projet, nous avons cherché à aborder la problématique de différents points de vue, de façon à bien cerner la situation et de donner plus de crédibilité à nos résultats. Tous nos résultats sans exception tendent vers une seule conclusion. A notre avis, il ne fait plus aucun doute que la gp160 sous forme de rosettes, a la capacité d'induire en apoptose des cellules T exprimant à leur surface le récepteur CD4, lorsqu'elles sont incubées dans des conditions permissives; c'est-à-dire, en l'absence des cytokines et autres facteurs de croissance que procure le sérum foetal bovin. Tous nos résultats proviennent d'expériences effectuées *in vitro* avec des cellules provenant d'une lignée cellulaire. Cependant, des résultats plus récents obtenus dans notre laboratoire montrent que la gp160 induit l'apoptose dans des lymphocytes T humains (PBL) provenant de donneurs séronégatifs (Thibodeau *et al.*, 1995) Il est donc très tentant de se servir de tous ces résultats comme toile de fond pour spéculer sur les événements se produisant *in vivo* chez des individus infectés par le virus.

Mentionnons d'abord, que des scientifiques ont démontré, en 1994, qu'en injectant des anticorps anti-CD4 à des souris, on observait après seulement 4

heures, une déplétion maximale et massive des lymphocytes T CD4⁺ localisés dans les ganglions lymphatiques périphériques et dans la rate (Howie *et al.*, 1994). En utilisant un nouveau système informatisé d'analyse d'images de microscopie, le microscope HOME, ils ont découvert que cette déplétion de lymphocytes T CD4⁺ était causée par l'induction du processus d'apoptose dans ces cellules. Aucune évidence de nécrose ou d'inflammation n'a pu être détectée dans les ganglions. Sept jours après l'injection intraveineuse d'anticorps anti-CD4, le niveau d'apoptose dans les ganglions lymphatiques des souris était toujours plus élevé que la normale. Ces résultats sont fort intéressants dans le contexte du SIDA puisqu'on sait maintenant que le virus est séquestré dans les ganglions tout au long de la phase asymptomatique de l'infection (Pantaleo *et al.*, 1993b; Embretson *et al.*, 1993).

Ceci étant dit, et à la lumière de nos résultats, nous avons pensé à un scénario des événements qui pourrait se dérouler *in vivo* lors de l'infection par le VIH. Au tout début de l'infection, le virus se dissémine partout dans l'organisme et s'implante de façon permanente dans les ganglions lymphatiques. Dans ces lieux de prédilection pour le virus, les cellules dendritiques et les macrophages constituent les réservoirs assurant la continuité et la progression de l'infection vers un état d'immunodéficience (Spiegel *et al.*, 1992). Même infectées, ces cellules survivent longtemps et pourraient donc relarguer dans le microenvironnement des ganglions lymphatiques, d'importantes quantités de glycoprotéines gp160 non-clivées. Rappelons ici trois faits. Premièrement, seulement 10 à 20% de la gp160 synthétisée est clivée en gp120 et gp41. Le reste de la glycoprotéine est dégradée ou sécrétée par les cellules infectées (McKeating *et al.*, 1989). Deuxièmement, la glycoprotéine sécrétée par les cellules infectées a été détectée dans le sang de

sidéens (Oh *et al.*, 1992). Les chercheurs suggèrent dans une de leurs conclusions que les concentrations de gp160 dans les tissus lymphatiques seraient supérieures à celles obtenues dans le sang périphérique. Troisièmement, les lymphocytes dans le sang ne représentent que 2% de la population totale des lymphocytes, ce qui signifie que plus de 98% de la population des lymphocytes réside à tout instant dans les organes lymphatiques et autres organes tel que le poumon. (revue par Westermann et Pabst, 1990). Ainsi, la glycoprotéine du virus, sans quitter les ganglions, pourrait interagir avec la très grande majorité des lymphocytes T CD4+.

Tout récemment, on a mesuré un niveau d'apoptose de trois à quatre fois plus élevé dans les ganglions lymphatiques d'individus séropositifs que dans ceux d'individus séronégatifs (Muro-Cacho *et al.*, 1995). L'apoptose détectée dans les ganglions normaux était confinée aux centres germinatifs tandis que chez les patients infectés par le virus, les cellules apoptotiques étaient localisées en quantités appréciables dans tous les compartiments fonctionnels du ganglion lymphatique (i.e. cortex, paracortex et sinus). Finalement, les chercheurs ont rapporté qu'il existait une bonne corrélation entre l'intensité du phénomène d'apoptose et la proportion des cellules activées dans les tissus lymphatiques. Le stade de la maladie ou la charge virale n'influenceraient pas le niveau d'apoptose dans ces tissus. La gp160 pourrait donc pré-programmer les cellules à l'apoptose en interagissant avec le récepteur CD4. Les cellules seraient ensuite induites en apoptose par une stimulation antigénique via leur TcR, ce qui expliquerait que le taux d'apoptose semble être relié à l'état général d'activation dans les tissus lymphatiques. Fait à noter, déjà en 1991, Gougeon *et al.* suggèrent qu'une fraction importante des lymphocytes de patients sont engagés vers un état de préapoptose en raison d'une activation anormale.

Un autre scénario possible qui serait plus compatible avec nos résultats ainsi que ceux de Howie *et al.* (1994) obtenus avec leur traitement anti-CD4 chez les souris, serait que la gp160 sécrétée dans les ganglions induirait directement les lymphocytes T CD4+ en apoptose. Pour que ceci se réalise, nos résultats ont démontré qu'il doit y avoir cependant, une absence de certaines cytokines ou/et facteurs de croissance que procure le sérum. Il est intéressant de noter que Fan et collaborateurs (1993) ont détecté une baisse d'expression d'IL-2 associée à l'infection au VIH. De plus, un groupe de chercheurs et de médecins viennent tout juste de publier une étude démontrant les bienfaits d'une thérapie intermittente par l'interleukine 2 chez dix patients volontaires ayant un taux de lymphocytes CD4+ plus élevé que 200 cellules/ μ l (Kovacs *et al.*, 1995). Chez 6 des 10 patients, une augmentation de plus de 50% du nombre de lymphocytes T CD4+ par μ l de sang a été observée, un et deux mois après le début du traitement.

Finalement, nous sommes conscients que les quantités de gp160 utilisées dans ce projet ne sont pas négligeables et qu'elles dépassent sûrement celles présentes *in vivo*, dans les ganglions. Une quantité plus modeste mais constamment présente de la glycoprotéine dans les ganglions ainsi qu'un renouvellement de la population de lymphocytes T CD4+ pourraient expliquer que la déplétion de cette population soit plus graduelle et se fasse sur une période de plusieurs années plutôt que de se produire en l'espace de quelques heures, comme dans nos expériences.

4.5 SÉRUMS HUMAINS.

Ayant observé à maintes reprises au cours de ce projet l'efficacité du sérum foetal bovin à protéger les cellules T de l'apoptose, nous nous sommes demandés si

des sérums humains contenaient un ou des facteurs capables de prévenir l'émergence du processus de l'apoptose lorsque les cellules sont incubées avec la gp160.

Nos résultats avec le SBF ainsi que ceux obtenus par les groupes de chercheurs travaillant sur l'IL-2 (Fan *et al.*, 1993; Kovacs *et al.*, 1995) font état d'un appauvrissement possible de cytokines dans les sérums d'individus infectés par le VIH. Nous formulons donc l'hypothèse que ces sérums seraient moins efficaces à prévenir l'induction d'apoptose. Nous avons donc effectué une dernière cinétique où les cellules CEM incubées avec la gp160 dans du PBS pendant 24 heures ont été mises en présence de différents sérums humains. La **figure 24** montre que les cellules incubées avec les sérums provenant d'individus séropositifs (gp160:SP et gp160:S) ont une moins bonne viabilité et un plus haut taux d'apoptose que celles incubées avec les sérums provenant de personnes séronégatives.

Ces observations sont donc compatibles avec l'hypothèse que le sérum des personnes infectées par le VIH pourrait manquer de certains facteurs capables de protéger les cellules de l'apoptose induite par la gp160. De plus, nous pensons que cette carence de facteurs n'est pas un phénomène survenant seulement dans le sérum mais se manifesterait également dans les ganglions. C'est dans ces sites importants pour les lymphocytes ainsi que pour le virus, que l'absence des facteurs protégeant contre l'apoptose serait le plus dommageable puisqu'elle laisse la porte ouverte à une apoptose accrue induite par la gp160. Dans ce sens, nos observations avec les sérums humains sont donc intéressantes puisqu'elles pourraient expliquer en partie ce qui se passe dans les ganglions lymphatiques des patients séropositifs.

CONCLUSION

Au cours de ce projet, nous avons démontré que les étapes initiales de l'infection, soit l'attachement et l'internalisation du VIH, n'induisent pas les lymphocytes T CD4+ en apoptose. Ainsi, dans des incubations d'une durée de 90 minutes, le VIH, inactivé ou non, n'a pas fait augmenter le taux d'apoptose dans les populations de cellules CEM. De plus, des incubations de 24 et 27 heures avec des IMS-gp160 n'ont également eu aucun impact sur le niveau d'apoptose dans les populations de cellules CEM. Nous en concluons que la gp160/120, présente à la surface du VIH ou des IMS, n'a pas le potentiel d'induire les cellules CD4+ en apoptose. Sans réplication, le virus ne semble donc pas en mesure d'induire l'apoptose.

Par contre, après que le virus se soit répliqué, une quantité importante de gp160 est produite et relarguée par les cellules infectées (McKeating *et al.*, 1989; Oh *et al.*, 1992). Nos résultats font alors la démonstration du potentiel de la gp160, agencée en rosette, à induire les cellules en apoptose. Après une incubation de seulement 6 heures, 30% de la population de cellules CEM était en apoptose. On a également montré que l'action de la gp160 est inhibée par une préincubation avec des anticorps anti-gp160 ou par l'ajout de sérum foetal bovin (SFB) dans le milieu d'incubation. Par ailleurs, les lymphocytes B de la lignée cellulaire Raji se sont montrés résistants à l'apoptose induite par la gp160. Globalement, ces résultats indiquent clairement que la gp160, sous forme de rosette, induit les cellules en apoptose lorsqu'elle interagit avec la molécule CD4 qui est le récepteur reconnu du VIH.

Dans la dernière partie de ce projet, nous avons démontré que les sérums humains, provenant d'individus séropositifs, semblent offrir une moins

bonne protection aux cellules CEM contre l'apoptose induite par la gp160 que les sérums humains séronégatifs. L'absence, ou du moins, une diminution de la concentration de certains facteurs sériques capables de protéger contre l'apoptose pourrait expliquer la protection moins efficace offerte par les sérums de patients séropositifs. Ainsi, le sérum étant moins compétent à contrer l'effet de la gp160, une induction accrue de l'apoptose *in vivo* pourrait donc contribuer à la déplétion de la population de lymphocytes T auxiliaires chez les personnes infectées par le VIH.

Dans un prochain projet, il sera intéressant de poursuivre les expériences avec la gp160 purifiée. Il sera notamment important d'évaluer le potentiel de la glycoprotéine à induire en apoptose des lymphocytes (PBL) prélevés d'individus séropositifs. Ces résultats pourront alors être comparés à ceux obtenus avec les cellules CEM. Il sera également intéressant d'évaluer l'efficacité des sérums humains à protéger des PBL contre l'apoptose induite par la gp160.

Ce projet nous aura donc permis de mettre en évidence le potentiel de la gp160, agencée en rosette, à induire en apoptose des cellules T CD4+. L'avenir nous dira quelle importance l'apoptose occupe dans la pathogénèse du SIDA, sachant que la gp160 circule dans le sang et est présente dans les ganglions lymphatiques.

REMERCIEMENTS

Je veux d'abord remercier le Dr Thibodeau pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour m'avoir confié un projet qui m'a emballé dès les premiers instants. Travailler sur un sujet aussi passionnant que l'apoptose dans le contexte du SIDA m'a aidé grandement à surmonter les difficultés que peut rencontrer un étudiant à la maîtrise qui apprend les rudiments du travail de recherche. Je désire également remercier le Dr. Thibodeau pour sa précieuse aide lors de la réalisation de ce projet ainsi que pour l'écriture de ce mémoire.

Je veux remercier Claude Lavallée et Céline Tremblay pour leurs nombreux conseils judicieux. Ça été un plaisir que de travailler à leur coté.

Mes remerciements pour leur assistance technique, s'adressent également à M. Marcel Desrosiers, du service de cytofluométrie, M. Robert Alain, du service de microscopie électronique, M. André Levac et Ginette Larose, du centre audiovisuel et à tout le personnel de la bibliothèque et du service de l'informatique.

Finalement, je tiens à remercier mes parents pour leur appui inconditionnel tout au long de ce projet. Merci également à mes soeurs et le reste de la famille pour leurs encouragements.

TABLEAUX

TABLEAU 1: La famille des Rétroviridae.

Genre:

1. Rétrovirus mammalien de type B
2. Rétrovirus mammalien de type C
3. Rétrovirus aviaire de type C
4. Rétrovirus de type D
5. Rétrovirus BLV-HTLV
6. Lentivirus

Espèces:

- | | |
|------------------|---|
| 6.1 bovin: | BIV (bovine immunodeficiency virus) |
| 6.2 équin: | EIAV (equine infectious anemia virus) |
| 6.3 félin: | FIV (feline immunodeficiency virus) |
| 6.4 ovin/caprin: | CAEV (caprine arthritis encephalitis virus) |
| 6.5 primate: | HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) |
| | HIV-2 (human immunodeficiency virus type 2) |
| | SIV (simian immunodeficiency virus) |
7. Spumavirus
-

TABLEAU 2: Système de classification révisé pour l'infection du VIH.

Catégories de lymphocyte T CD4+:

Catégorie 1: >500 cellules/ μ L

Catégorie 2: 200-499 cellules/ μ L

Catégorie 3: <200 cellules/ μ L

Ces catégories correspondent au nombre de lymphocytes T CD4+ par microlitre de sang.

Catégories cliniques: pour personnes de 13 ans et plus.**Catégorie A:**

- infection du VIH asymptomatique
- lymphadénopathie persistante et généralisée
- primo-infection du VIH (phase aiguë)

Catégorie B:

- Conditions cliniques attribuables à l'infection au VIH et qui est indicatif d'une défaillance du système immunitaire cellulaire.
- Ex: candidiase, dysplasie cervicale, fièvre et diarrhée persistantes, zona, purpura thrombocytopénique, neuropathie périphérique.

Catégorie C:

Toutes les conditions cliniques présentées au tableau 3.

TABLEAU 3: Liste des conditions cliniques associées au SIDA.

- Candidiase des bronches, trachée, poumons ou œsophage
 - Cancer cervical, invasif
 - Coccidioidomycosite, disséminée ou extrapulmonaire
 - Cryptococcosite, extrapulmonaire
 - Cryptosporidiosite, intestinale et chronique (durée > 1 mois)
 - Maladies causées par le cytomégalo virus (ailleurs qu'au foie, rate et ganglion)
 - Rétinite causée par le cytomégalo virus (avec perte de vision)
 - Encéphalopathie, reliée au VIH
 - HSV: ulcère chronique (>1 mois), bronchite, pneumonie ou œsophagite
 - Histoplasmosite, disséminée ou extrapulmonaire
 - Isosporiasite, intestinale et chronique (> 1 mois)
 - Sarcome de Kaposi
 - Lymphome de Burkitt
 - Lymphome, immunoblastique (ou terme équivalent)
 - Lymphome primaire du cerveau
 - *Mycobacterium avium* ou *M. kansasii*, infection disséminée ou extrapulmonaire
 - *Mycobacterium tuberculosis*, pulmonaire et extrapulmonaire
 - *Mycobacterium*, toutes autres espèces, disséminée ou extrapulmonaire
 - Pneumonie au *Pneumocystis carinii*
 - Pneumonie, à répétition
 - Leukoencéphalopathie multifocale progressive
 - Septicémie à la Salmonelle, à répétition
 - Toxoplasmosite du cerveau
 - " Wasting syndrome" causée par le VIH
-

FIGURES

Figure 1. Représentation du VIH.

Une coupe transversale du VIH montre l'organisation structurale du virus. A son centre, deux molécules d'ARN monocaténares de polarité positive sont intimement liées aux polypeptides p6/p7 et à la transcriptase inverse. La capside qui est composée de la protéine p24 protège l'acide nucléique. Une matrice formée de la p17 tapisse la surface sous-jacente de l'enveloppe virale qui est la couche externe du virion. Cette enveloppe virale est composée d'un double feuillet phospholipidique contenant à sa surface des spicules de glycoprotéines. Ces projections représentent la gp120 qui est liée à la gp41. Cette dernière se projette à travers l'enveloppe virale et sert d'ancrage à la gp120.

La représentation schématisée du VIH provient d'une conception par ordinateur d'un schéma fourni par Dr. Thibodeau et exécutée par Mme Ginette Larose, du service de l'audiovisuel.

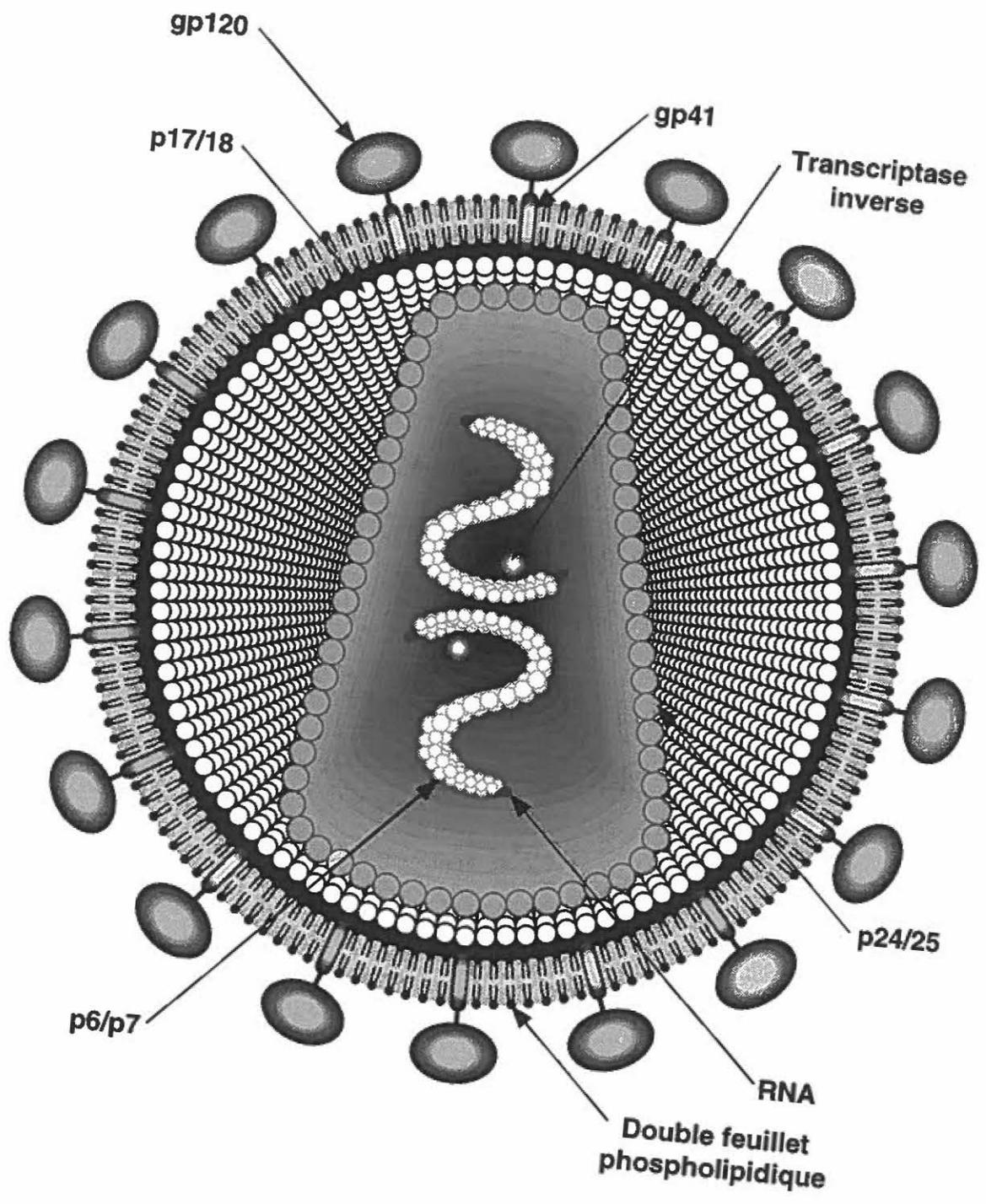


Figure 2. Génome du VIH.

Neuf régions codantes sont agencées entre deux séquences répétitives (LTR) qui bordent le génome du VIH. Les trois gènes structuraux, *env*, *pol*, et *gag* sont communs à tous les rétrovirus. Les autres gènes, plus petits et dont certains sont bipartites, codent pour des protéines reconnues pour exercer une fonction de régulation (*tat*, *rev*, *vif*, *vpu*, *vpr*, *nef*).

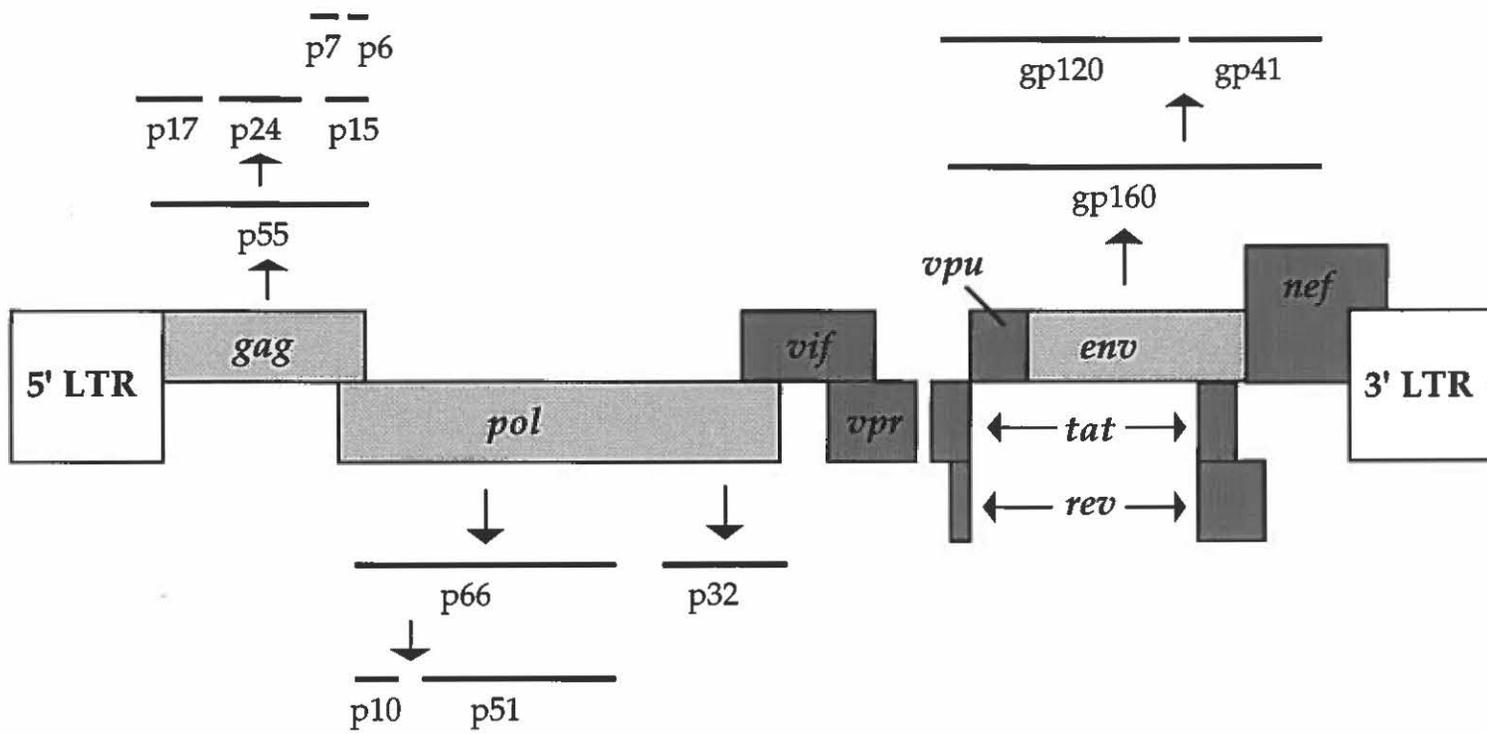


Figure 3. Les glycoprotéines de l'enveloppe du VIH.

La glycoprotéine présente à la surface du virion (gp120) et la glycoprotéine transmembranaire (gp41) proviennent d'un précurseur (gp160), long de 863 acides aminés. La gp160 est clivée en deux par des protéases cellulaires à l'acide aminée 519. Les régions conservées (C) et variables (V) sont représentées par les rectangles C1 à C5 et V1 à V5, respectivement. A noter que la région V3 constitue un site immunodominant. La gp41 est conservée dans sa totalité, à l'exception près des régions semi-variables (régions en gris pâle). Les rectangles gris foncé représentent les régions identifiées comme responsables de la formation de syncithium, la liaison avec la molécule CD4, la fusion et l'ancrage dans la membrane virale.

Acides aminés:

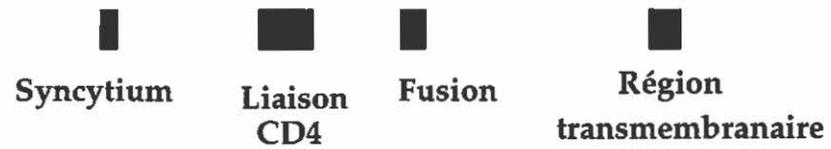
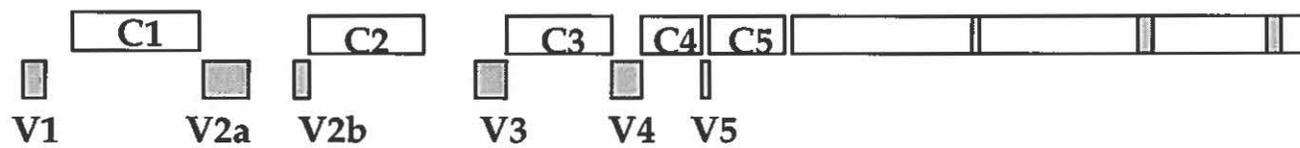
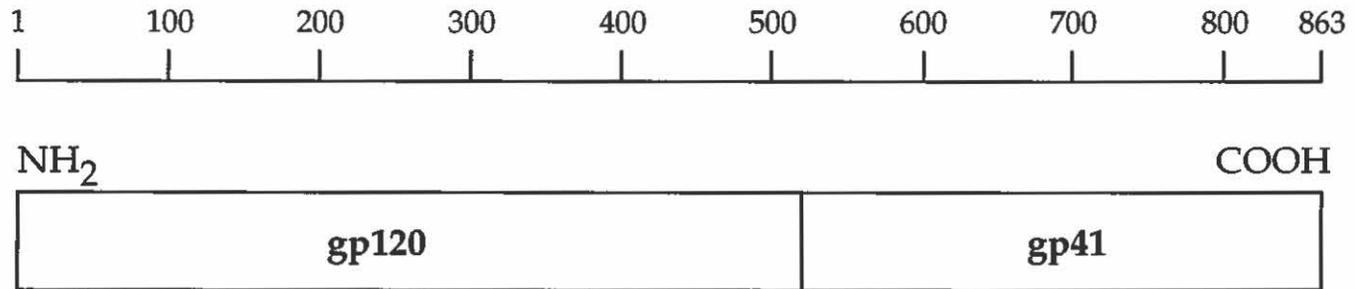


Figure 4. Courbe de croissance des cellules CEM.

Les cellules CEM ont été incubées dans du RPMI additionné de 10% de sérum foetal bovin. La concentration initiale de la suspension cellulaire a été ajustée à 400 000 cellules au ml. Les incubations d'une durée de 5 jours se sont déroulées dans des flacons de polystyrène F25 (Corning), à 37°C sous atmosphère de CO₂ à 5%. L'indice de multiplication des cellules CEM a été calculée à chaque jour de l'incubation. La courbe présentée ici, représente une moyenne de 17 incubations effectuées dans des conditions similaires.

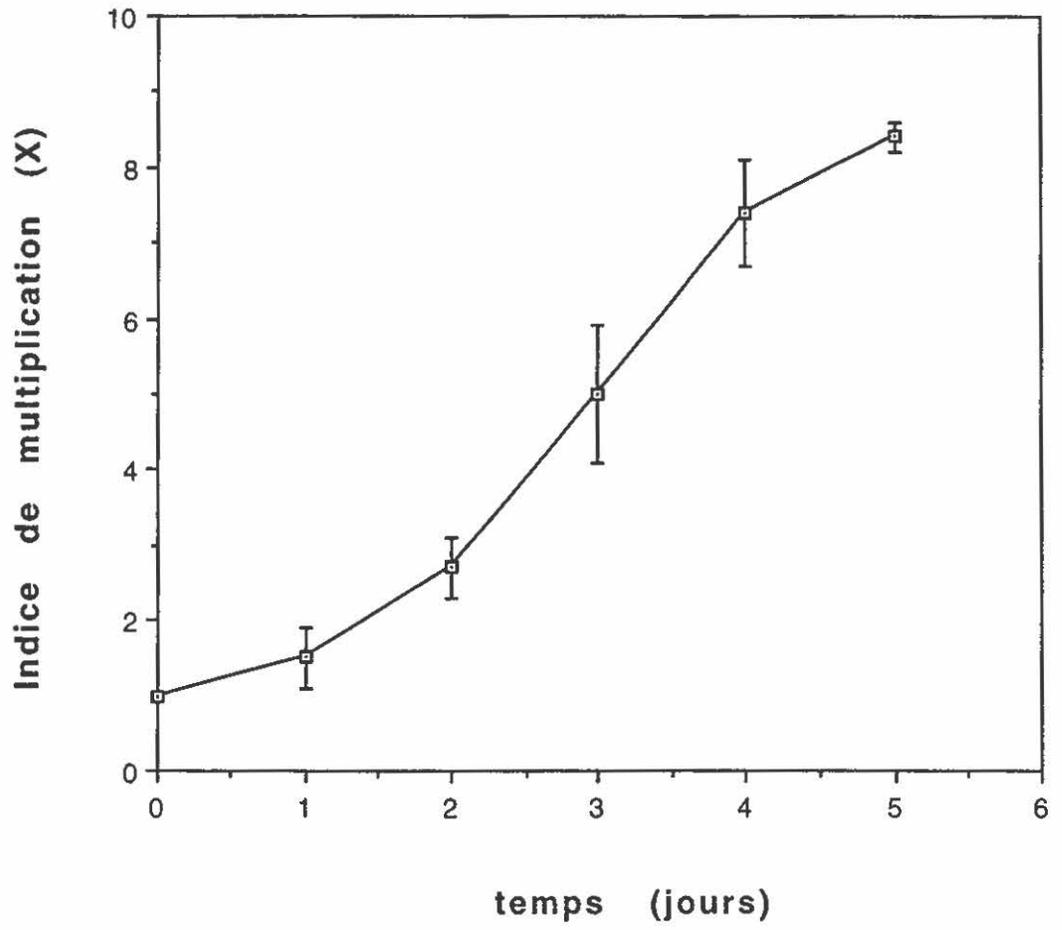




Figure 5. Expression de la molécule CD4.

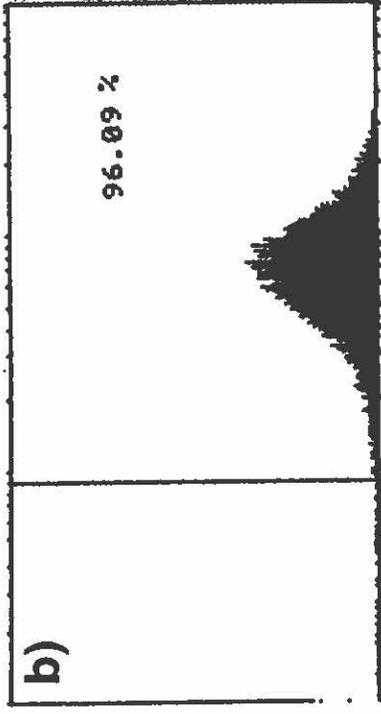
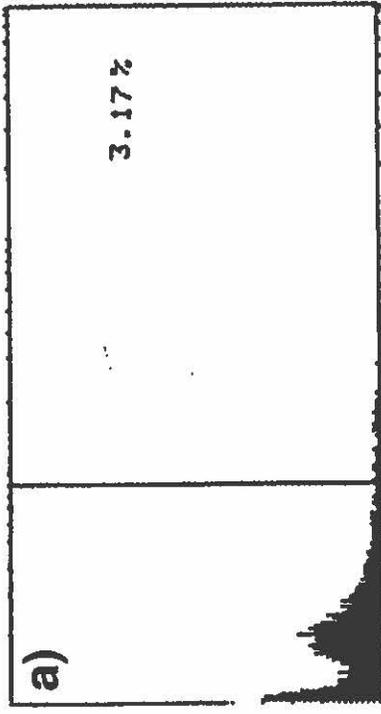
Un million de cellules CEM ont été saturées d'anticorps anti-CD4. Pour ce faire, 5 μ l d'un lot dilué par un facteur de 8, d'anticorps monoclonaux dirigés contre l'antigène CD4 humain et conjugués à la FITC ont été ajoutés aux cellules. Après une incubation de 40 minutes à 4°C dans l'obscurité, les cellules ont été lavées et resuspendues dans du PBS additionné de 3% de BSA et 0.02% d'azide de sodium.

L'axe des abscisses est subdivisé en 256 canaux, ce qui signifie que le cytofluoromètre est capable de détecter 256 intensités différentes de fluorescence. Une barrière a été tracée au canal 80 et le pourcentage de cellules a été calculé dans les deux fenêtres adjacentes. Les cellules CD4+ se déplacent dans la fenêtre de droite (canaux 80 et plus) suite à une incubation avec les anticorps fluorescents anti-CD4. L'axe des ordonnées correspond au nombre de cellules par canal.

Sans anticorps
(Autofluorescence)

Avec anticorps anti-CD4
(FITC) 5 μ l

CEM



RAJI

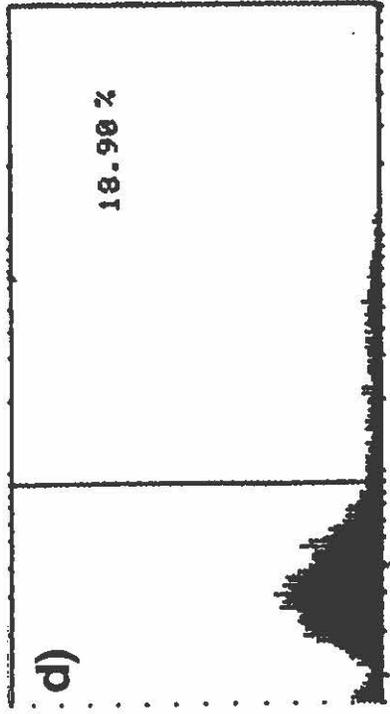
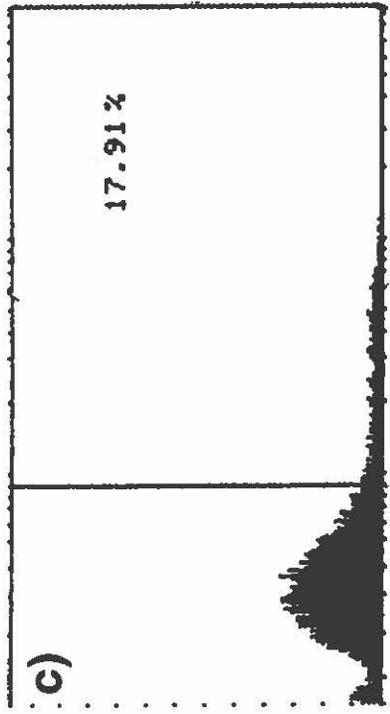


Figure 6. Analyse de cytométrie en flux.

Un million de cellules ont été lysées dans une solution hypotonique contenant 0.1% de Triton X-100 et 0.1% de citrate de sodium. Cinquante µg/ml d'iodure de propidium a ensuite été ajouté et les échantillons de noyaux ont été incubés à 4°C pendant une nuit à l'obscurité. Lors de l'analyse, le débit des noyaux passant au travers le rayon du laser a été réglé à 100 à la seconde. 10 000 noyaux ont été calculés par échantillon.

H1 = granulosité vs taille des noyaux. Les noyaux apoptotiques sont habituellement perçus plus granuleux et de plus grosses tailles.

H2 = fluorescence vs la taille des noyaux. Les noyaux apoptotiques étant moins fluorescents, ils se déplacent vers la gauche (voir population B).

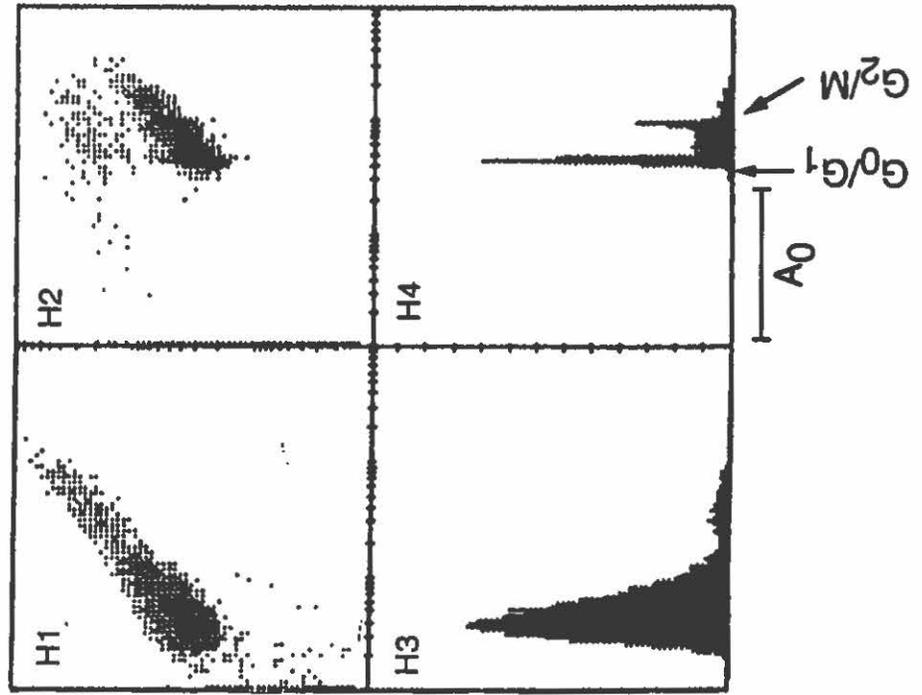
H3 = profil de la granulosité des noyaux. Pas très pertinent.

H4 = profil de la fluorescence des noyaux. C'est à partir de cet histogramme que le pourcentage d'apoptose est déterminé.

Population A = population de cellules incubées 4 jours dans du RPMI additionné de 10% de SFB. Le quatrième histogramme (H4) confirme que peu de noyaux sont apoptotiques puisque la très grande majorité des noyaux sont situés dans le pic G₀/G₁ ou à la droite de celui-ci (>2N).

Population B = population de cellules incubées 4 jours dans du RPMI sans SFB. Les cellules sont induites en apoptose. Le quatrième histogramme confirme que 35 % des noyaux sont dans la région hypodiploïde (A₀) et sont donc en apoptose.

a) Population A
viabilité = 96 %



b) Population B
viabilité = 50 %

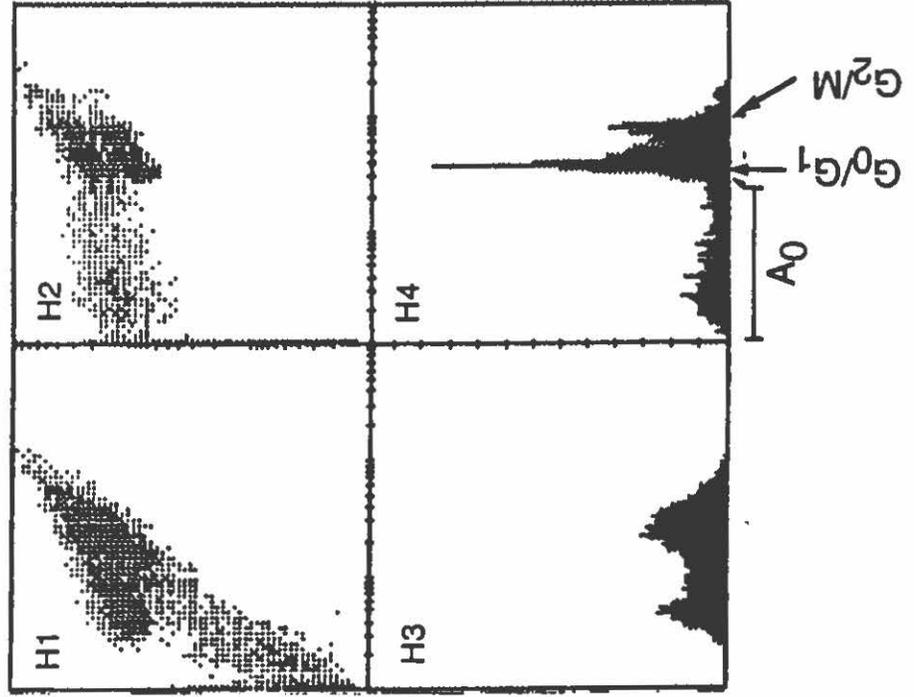


Figure 7. Microphotographie d'une cellule CEM vivante.

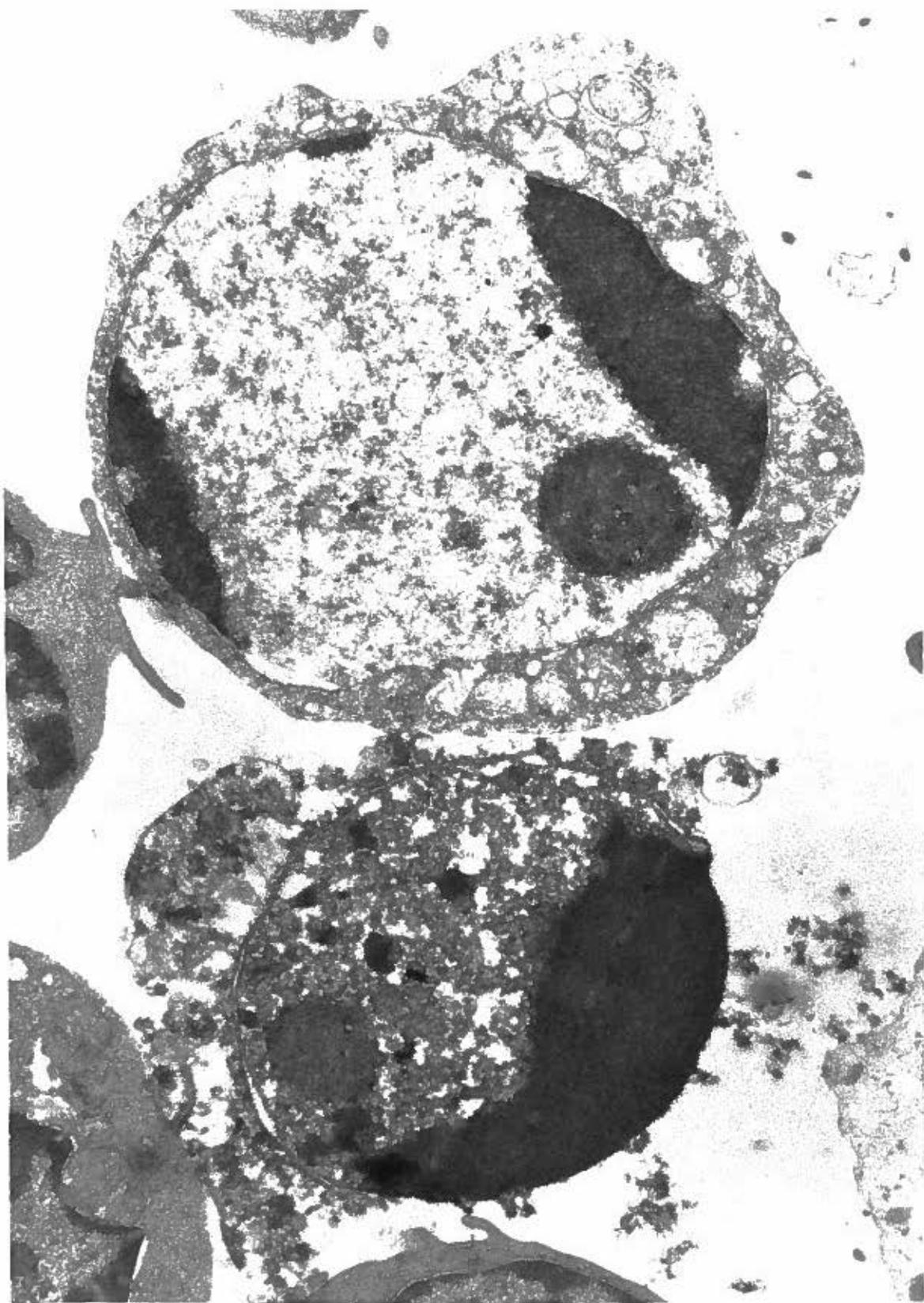
Cellule saine observée au microscope électronique (Philips 300), après une coupe ultra-mince et une coloration au citrate de plomb et à l'acétate d'uranyle (Grossissement de 13 000 X).



Figure 8. Microphotographies de cellules CEM apoptotiques.

Des cellules CEM induites en apoptose par privation de sérum. Coupes ultra-minces et coloration au citrate de plomb et à l'acétate d'uranyle.

- a) Au centre de la photo, deux cellules apoptotiques dont la cellule du haut est à un stade plus avancé que celle du bas. Notez les différentes configurations que peut prendre une chromatine condensée dans un noyau. (Grossissement: 16 000 X)
- b) Fragmentation du noyau d'une cellule apoptotique (23 000 X)
- c) Chromatine condensée prenant toute la place dans le noyau d'une cellule apoptotique. Notez aussi à la droite du noyau (et un peu en bas), un réticulum endoplasmique dilaté. De plus, la membrane cytoplasmique est rupturée (haut de la cellule). (Grossissement de 23 000 X)



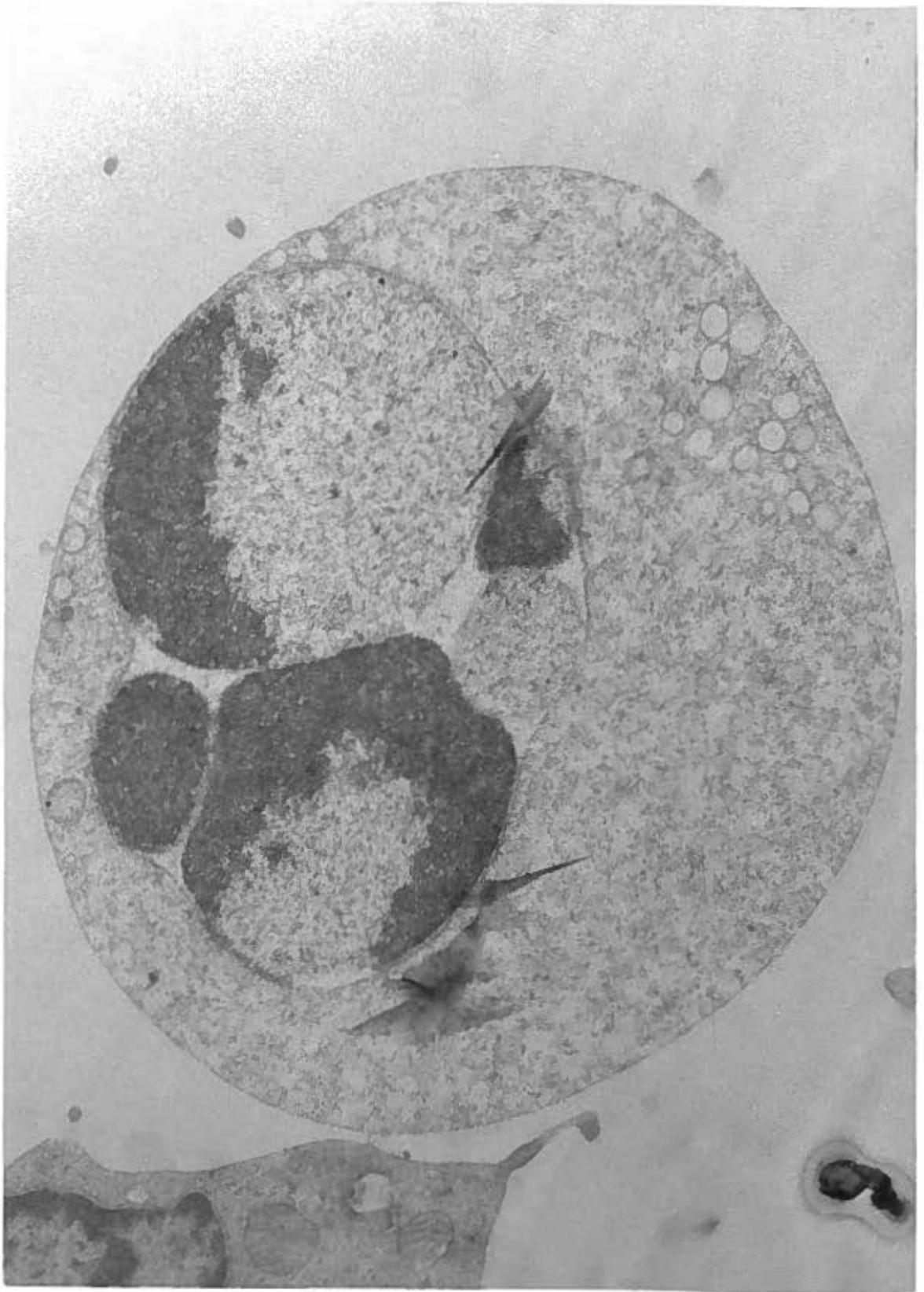




Figure 9. Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN provenant de cellules apoptotiques.

Une population de cellules CEM a été incubée dans du RPMI sans SFB durant 4 jours. L'ADN de 3 à 4 millions de cellules a été extrait et resuspendu dans 100 μ l d'un tampon TE. Dix μ l de chaque échantillon d'ADN a ensuite été déposé dans les puits d'un gel de 1.5% d'agarose. Le bromure d'éthidium a été incorporé dans le gel et dans le tampon TAE. Cent volts ont été appliqués à travers le gel pendant 2 heures. Les bandes d'ADN ont été révélées par illumination aux ultraviolets.

Puit 1 = 10 μ l de cellules CEM à 48 heures d'incubation

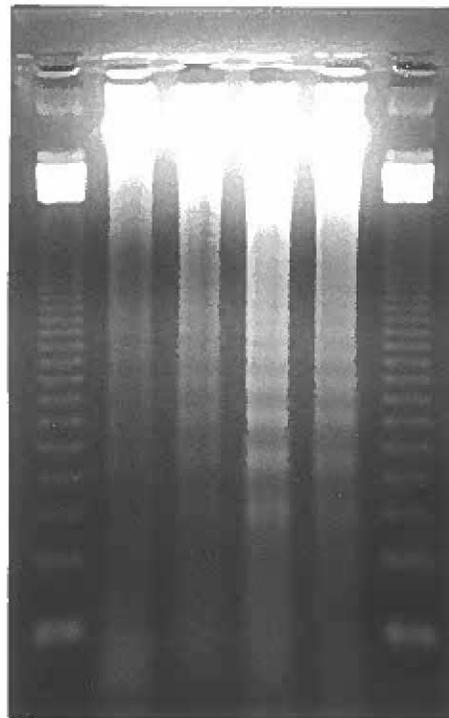
Puit 2 = 10 μ l de cellules CEM à 72 heures d'incubation

Puit 3 = 10 μ l de cellules CEM à 96 heures d'incubation

Puit 4 = 10 μ l d'un autre échantillon de cellules CEM à 96 heures d'incubation

St = marqueurs de masse moléculaire (échelle de multiple de 123 pb)

St 1 2 3 4 St
48h 72h 96h 96h



≡≡≡≡ 1599
≡≡≡≡ 984
≡≡≡≡
≡≡≡≡
≡≡≡≡ 492
≡≡≡≡ 369
≡≡≡≡ 246
≡≡≡≡ 123
(pb)

Figure 10. Profil électrophorétique sur gel de polyacrylamide 8% de glycoprotéines purifiées et d'Immunosomes.

Les glycoprotéines purifiées par une ultracentrifugation sur un gradient de densité de saccharose 8-60% sont montrées dans le puit 1. Les IMS qui sont préparés par l'ancrage des glycoprotéines dans le double feuillet phospholipidique de liposomes, sont représentés dans le puit 2. Les puits St correspondent aux marqueurs de masse moléculaire. Les protéines ont été colorées au nitrate d'argent. Notez la bande prédominante de la gp160 qui est présente dans les puits 1 et 2. On peut observer également des bandes de plus faible intensité au niveau 120 kDa et 65 kDa.

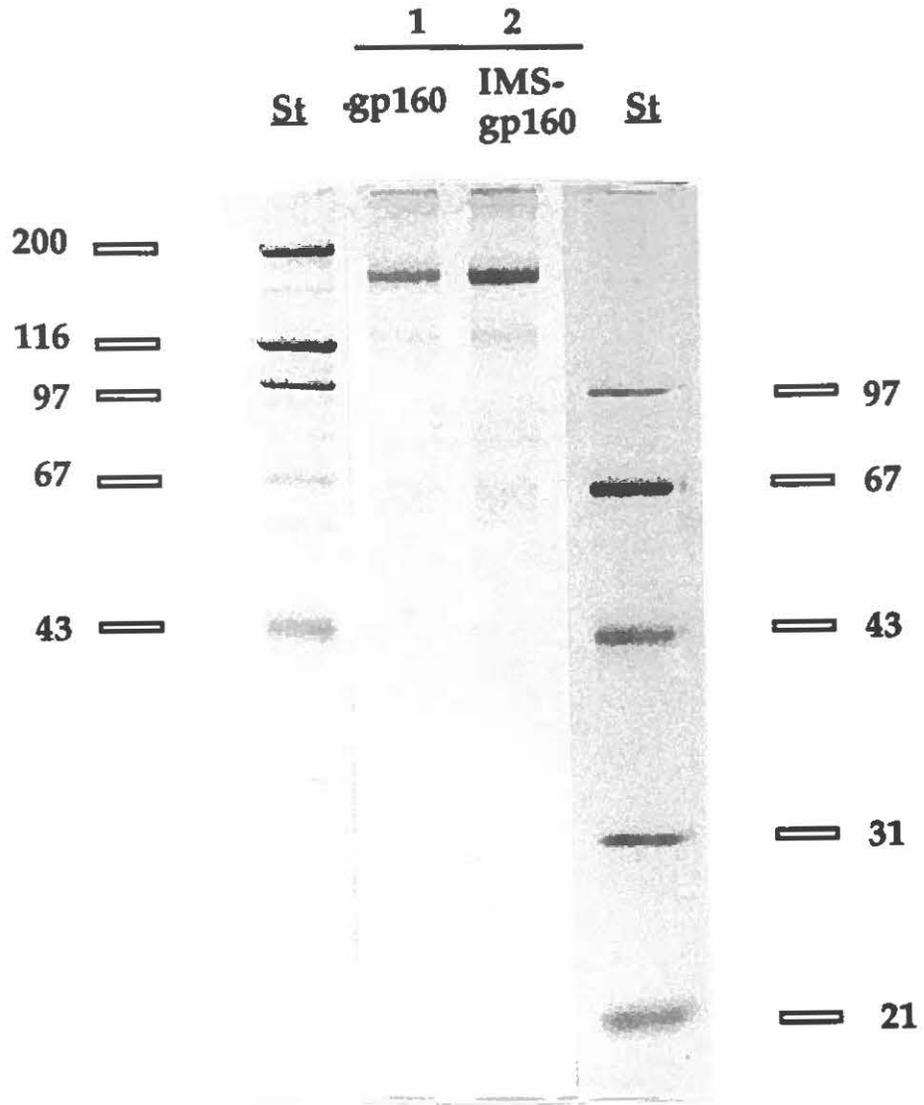


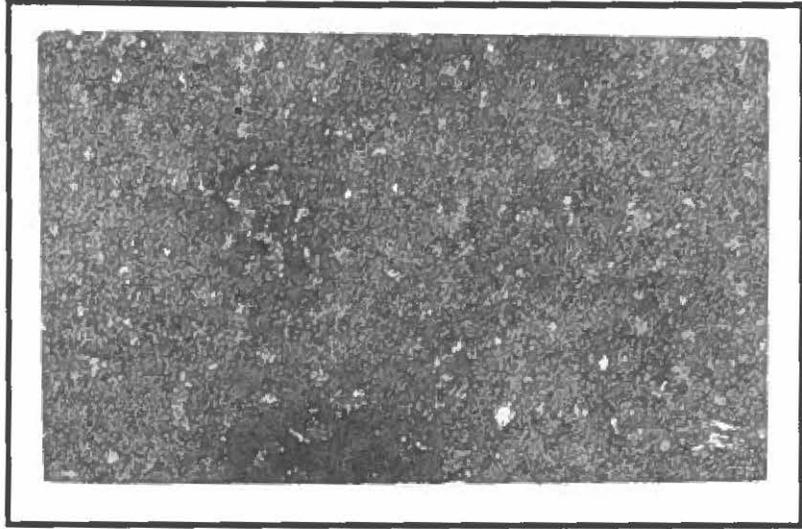
Figure 11 a) Microphotographie de rosettes de glycoprotéines gp160.

Après une purification par ultracentrifugation sur un gradient de saccharose 8-60%, les glycoprotéines du VIH ont été adsorbées à une grille de cuivre et colorées négativement avec 3% d'acide phosphotungstique (PTA), pH6.3. On peut observer sur la photographie, un tapis homogène de glycoprotéines, agencées sous forme de rosettes. (Grossissement de 182 000 X)

b) Microphotographie d'un Immunosomes-gp160.

Les IMS ont été préparés à partir de liposomes et de glycoprotéines gp160. On peut noter, sur cet IMS, que son contour est irrégulier. Ceci s'explique par la présence des glycoprotéines ancrées dans le double feuillet phospholipidique de la membrane. Cette photographie a été prise à l'aide du microscope électronique et suite à l'imprégnation négative de l'échantillon au PTA 3%, pH 6.3 . (Grossissement de 482 000 X)

a)



b)

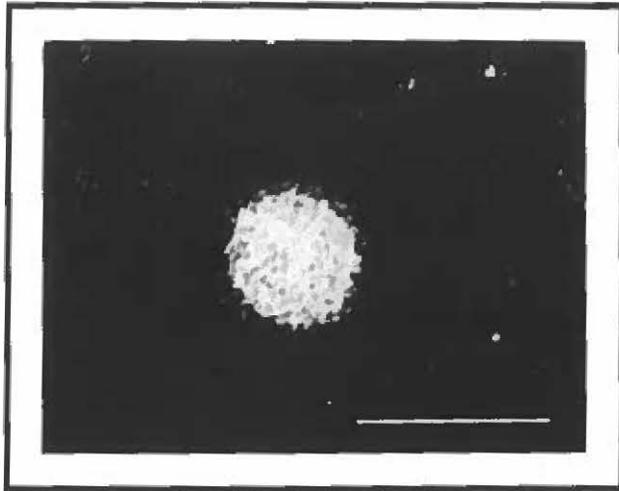
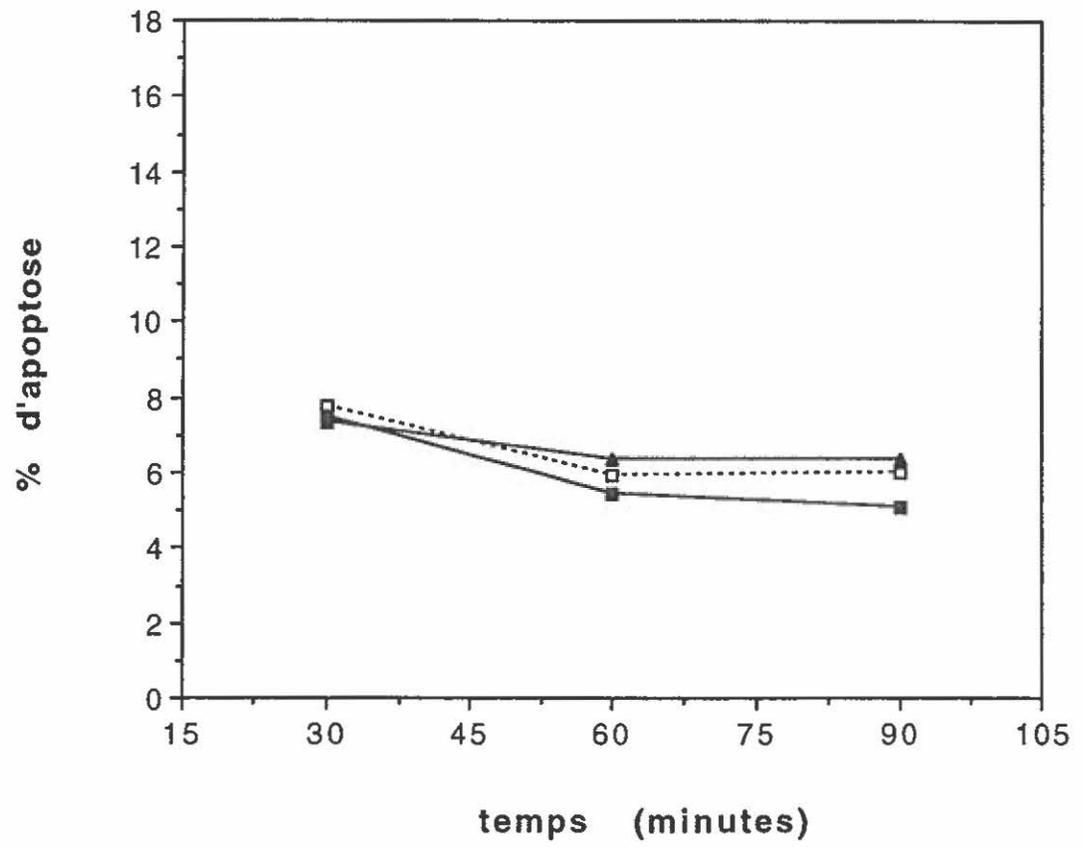


Figure 12. Pourcentages d'apoptose lors d'une incubation de 90 minutes de cellules CEM avec un surnageant viral inactivé.

Trois millions de cellules récoltées 4 jours après un passage cellulaire, ont été incubées à 37°C dans 1.2 ml de RPMI avec différentes dilutions d'un surnageant de cellules CEM infectées par le VIH. Le surnageant a été, au préalable inactivé par la chaleur (56°C pendant 45 minutes).

Nombre d'expériences = 1



—■— VIH dil 10

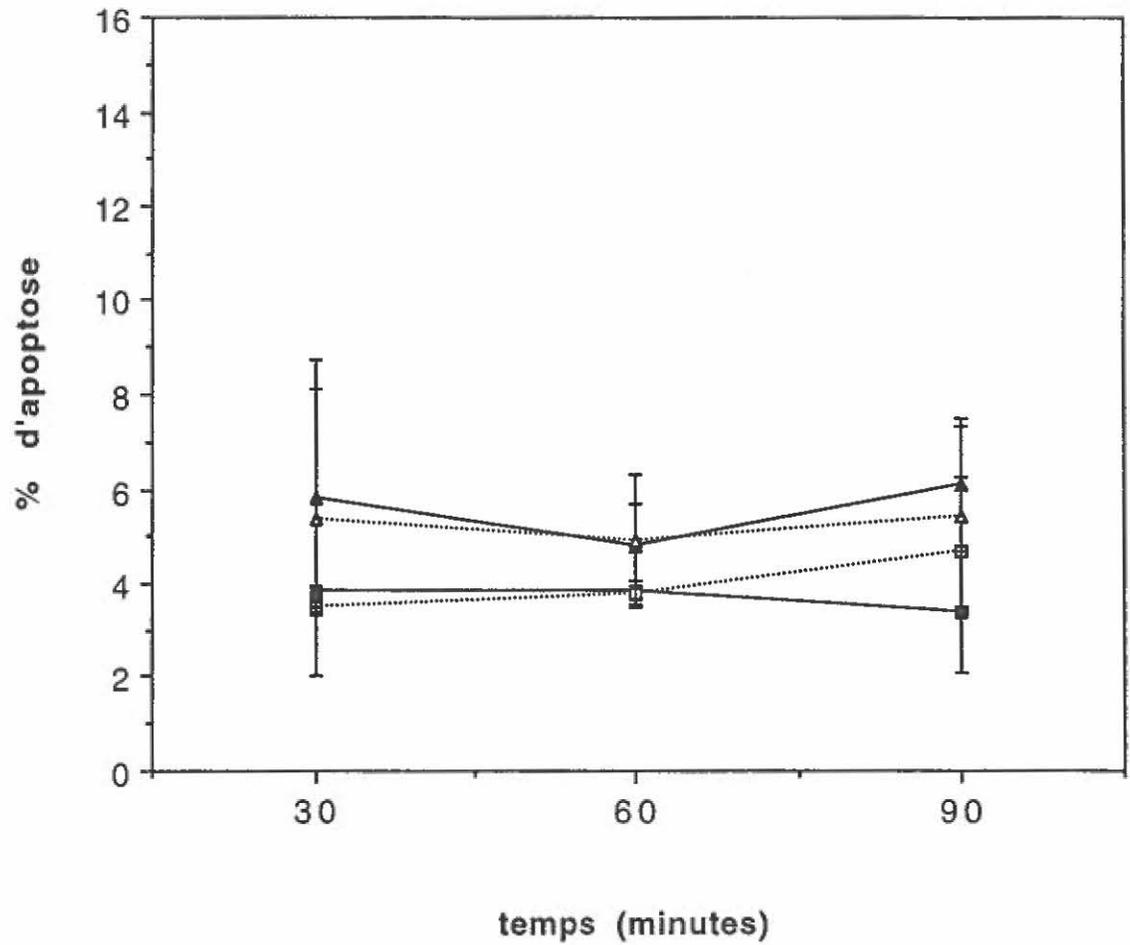
—▲— VIH dil 20

---□--- RPMI

Figure 13. Pourcentages d'apoptose lors d'une incubation de 90 minutes de cellules CEM récoltées d'une population en phase exponentielle (3 jours) ou en phase plateau (4 jours après un passage) avec un surnageant viral inactivé.

Trois millions de cellules récoltées 3 ou 4 jours après un passage cellulaire, ont été incubées à 37°C dans 1.2 ml de RPMI auquel était dilué par un facteur de 10, un surnageant de cellules CEM infectées par le VIH. Le surnageant a été, au préalable inactivé par la chaleur (56°C pendant 45 minutes).

Nombre d'expériences = 2

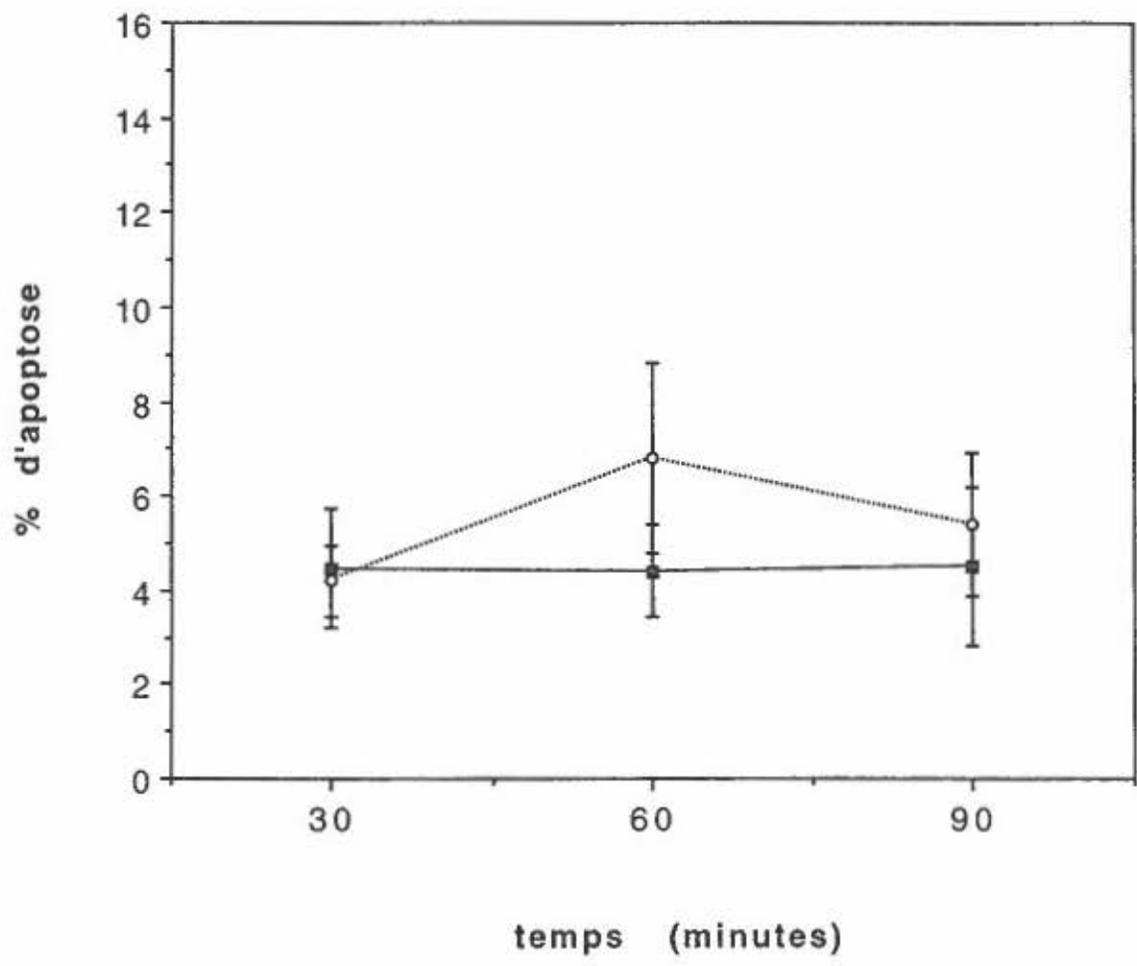


- CEM 3jrs: VIH dil 10
- ▲— CEM 4 jrs: VIH dil 10
-□..... CEM 3 jrs: RPMI
-▲..... CEM 4 jrs: RPMI

Figure 14. Pourcentages d'apoptose lors d'une incubation de 90 minutes de cellules CEM avec un échantillon de VIH ultracentrifugé et inactivé.

Trois millions de cellules récoltées 3 jours après un passage cellulaire, ont été incubées à 37°C dans 1.2 ml de RPMI auquel était dilué par un facteur de 10, un échantillon de VIH ultracentrifugé et inactivé à la chaleur.

Nombre d'expériences = 2



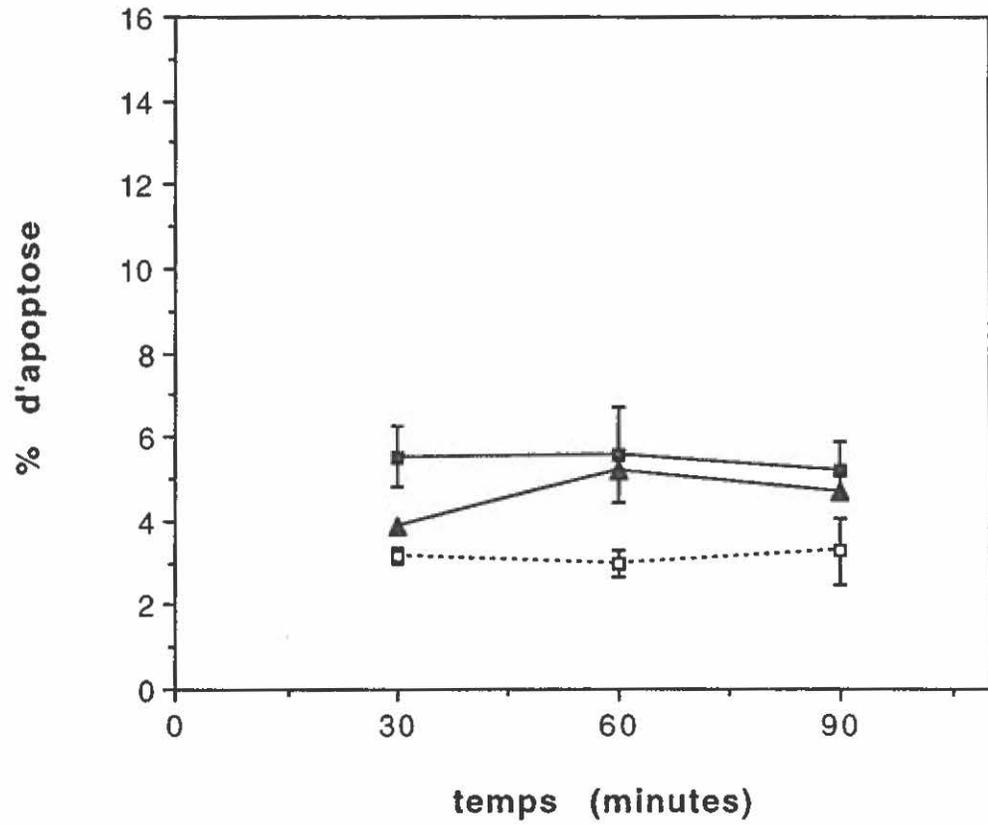
—■— VIH dil 10

—○— RPMI

Figure 15 . Pourcentages d'apoptose lors d'une incubation de 90 minutes de cellules CEM avec différentes dilutions d'un échantillon de VIH ultracentrifugé et non-inactivé.

Trois millions de cellules récoltées 3 jours après un passage cellulaire, ont été incubées à 37°C dans 1.2 ml de RPMI auquel était dilué par un facteur de 10 ou de 20, un échantillon de VIH ultracentrifugé.

Nombre d'expériences = 2



—■— VIH dil 10

—▲— VIH dil 20

.....□..... RPMI

Figure 16. Incubation de 6 heures de cellules CEM avec différentes concentrations d'Immunosomes-gp160.

Vingt millions de cellules récoltées 4 jours après un passage cellulaire, ont été incubées à 37°C, pendant 6 heures avec 40 et 400 µg/ml d'IMS dans du RPMI. Les échantillons contenant de l'albumine bovine (BSA) et du RPMI sont les témoins négatifs.

Nombre d'expériences = 1

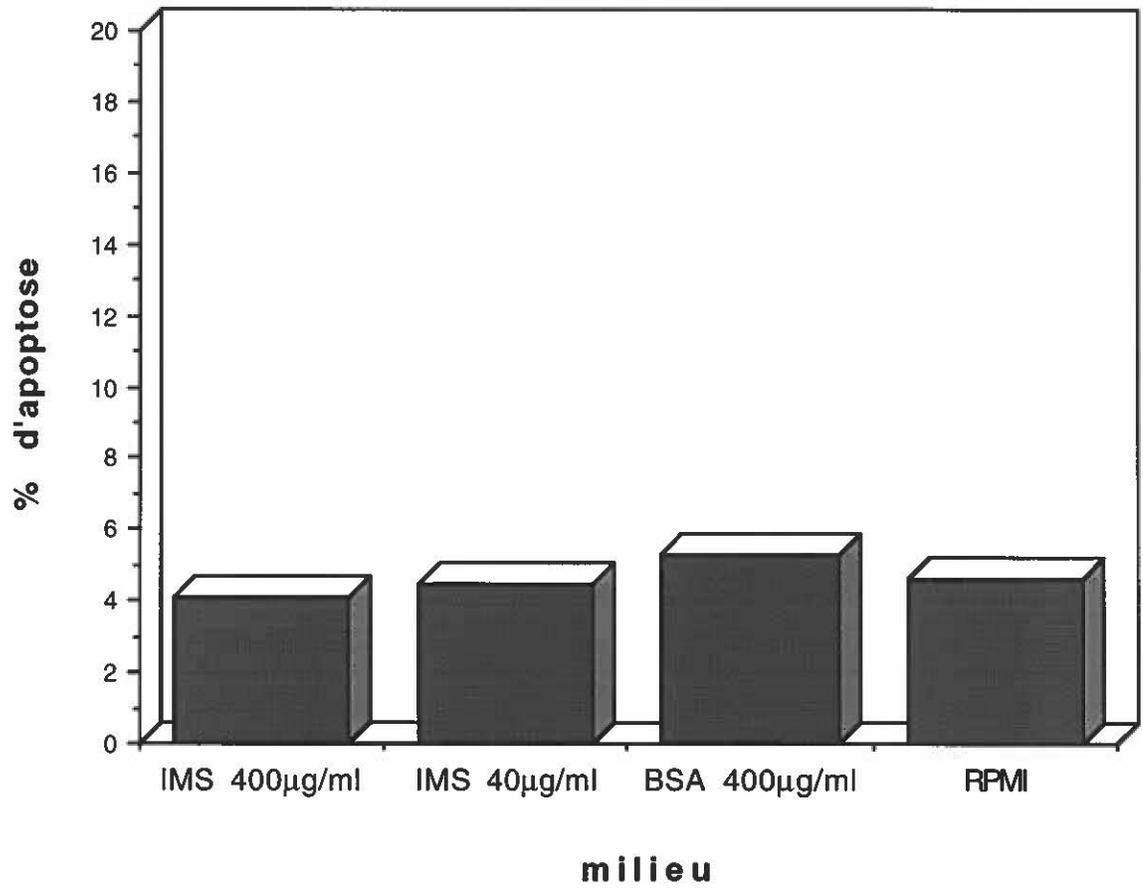




Figure 17. Incubation de 27 heures de cellules CEM avec des Immunosomes-gp160.

Pendant les 3 premières heures, 20 millions de cellules récoltées 4 jours après un passage cellulaire, ont été incubées à 37°C, dans un volume minimal de PBS avec 50 ou 100µg/ml d'IMS. A la fin de la troisième heure, 14 ml de RPMI additionné de SFB ont été ajoutés à la suspension cellulaire et l'incubation s'est poursuivie durant 24 heures additionnelles. En a) on présente le pourcentage de cellules CEM en apoptose tel que mesuré en cytométrie en flux et confirmé par un comptage en microscopie électronique. A noter que les liposomes ont été utilisés comme témoins négatifs. Ils ont été ajoutés à une concentration équivalant les 100 µg/ml des IMS. En b) on présente le taux de viabilité des cellules CEM tout au long de l'incubation de 27 heures.

Nombre d'expériences = 3

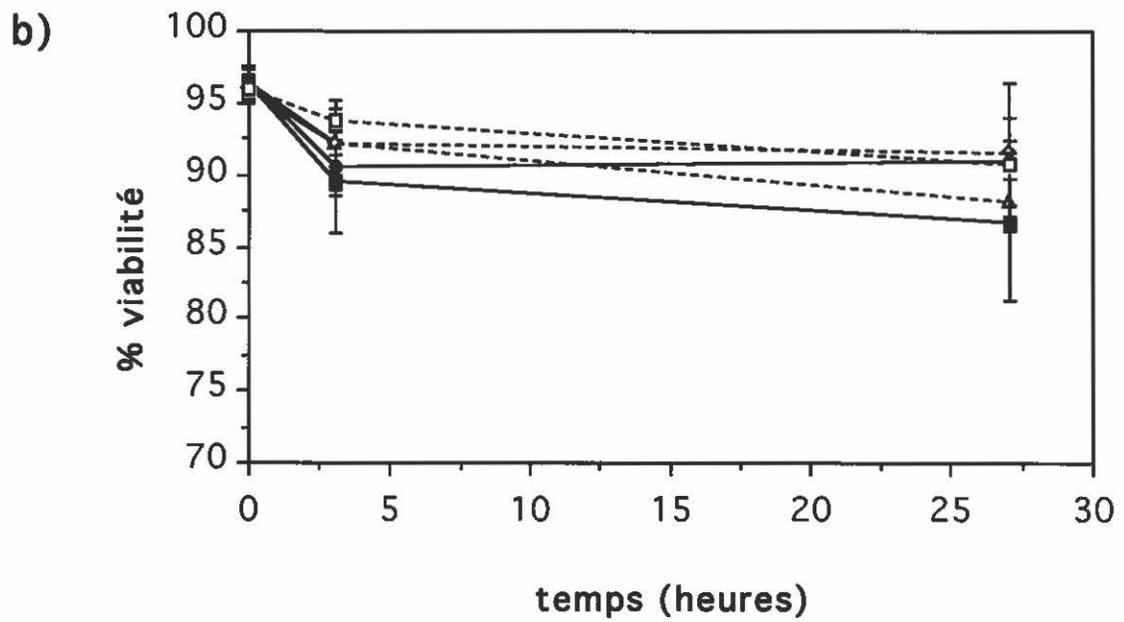
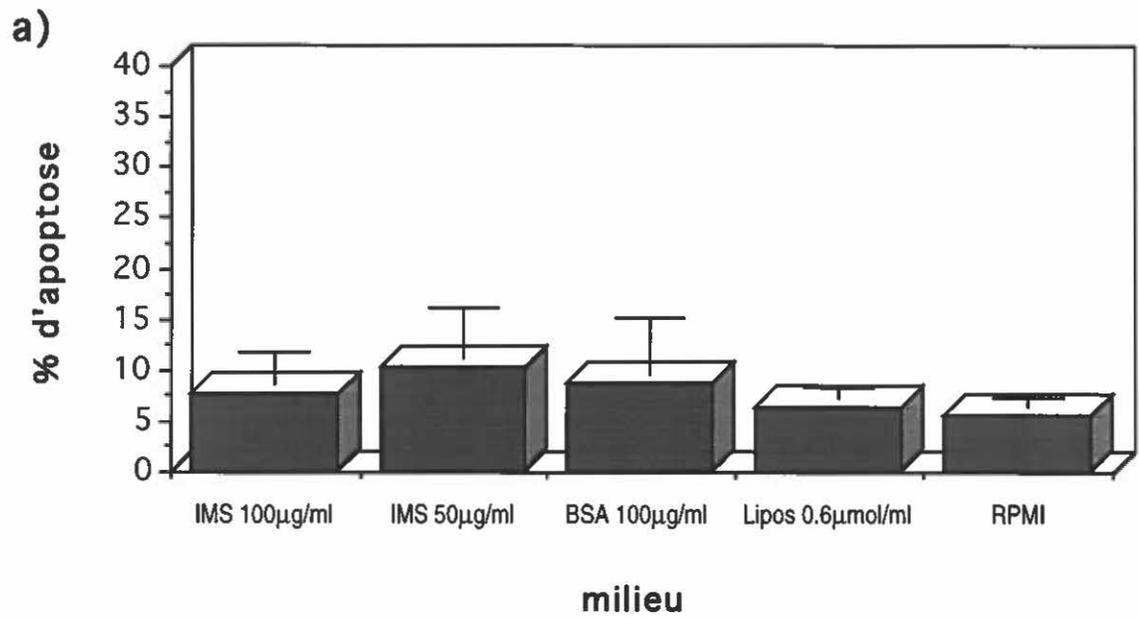


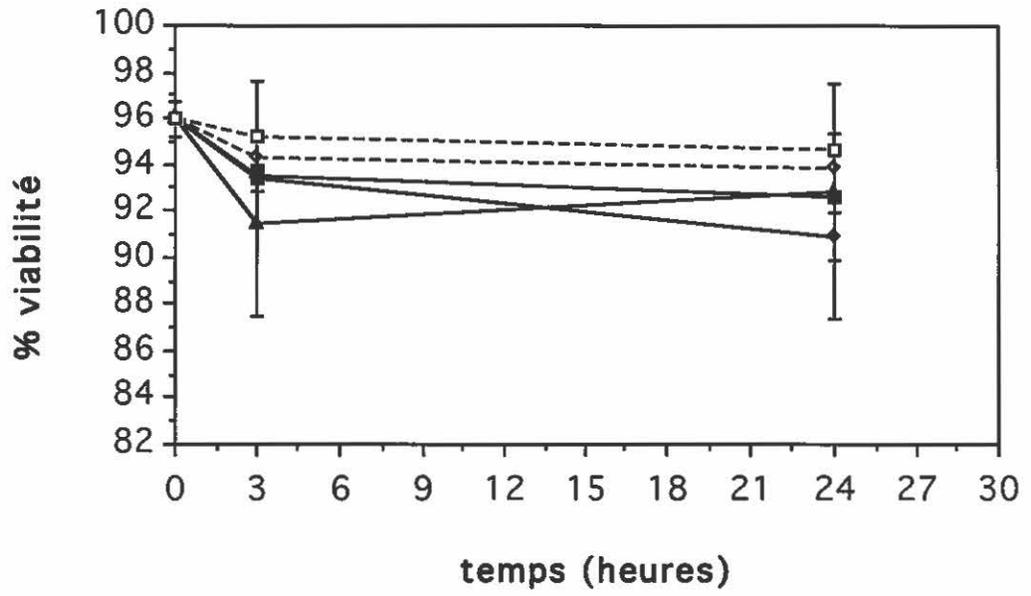


Figure 18. Incubation de 24 heures de cellules CEM de trois jours avec des Immunosomes-gp160.

Dix millions de cellules CEM ont été incubées avec les IMS, pendant 3 heures, dans un volume minimal de PBS, à 37°C. A la fin de la troisième heure, 14 ml de RPMI additionné de SFB ont été ajoutés à la suspension cellulaire et l'incubation s'est poursuivie pendant 21 heures. Les cellules utilisées lors de cette incubation ont été récoltées d'une population cellulaire en phase exponentielle, à trois jours après un passage. En a) on présente le taux de viabilité des cellules et en b) le taux d'apoptose à la 24^{ième} heure de la cinétique. On peut voir que les taux d'apoptose sont très similaires à ceux illustrés à la figure 17 avec des cellules à 4 jours après un passage.

Nombre d'expériences = 2

a)



b)

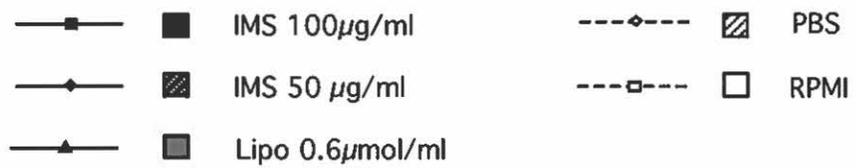
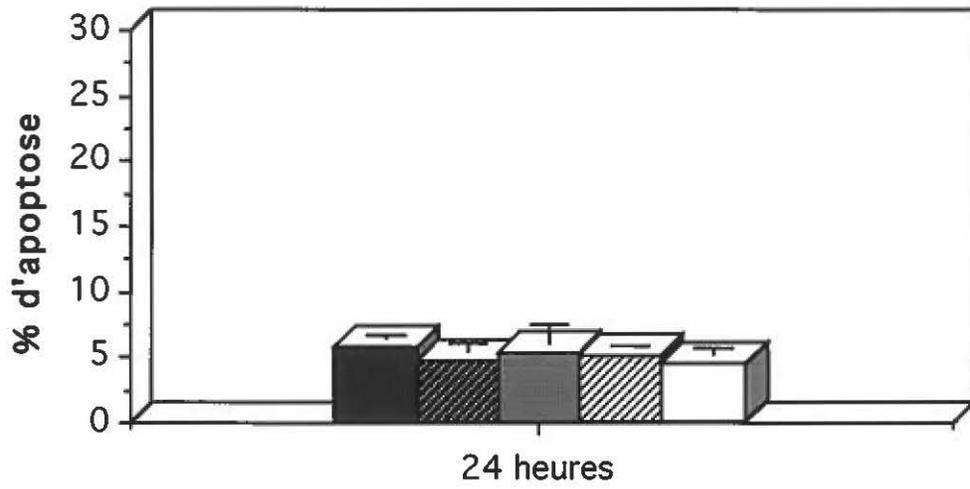


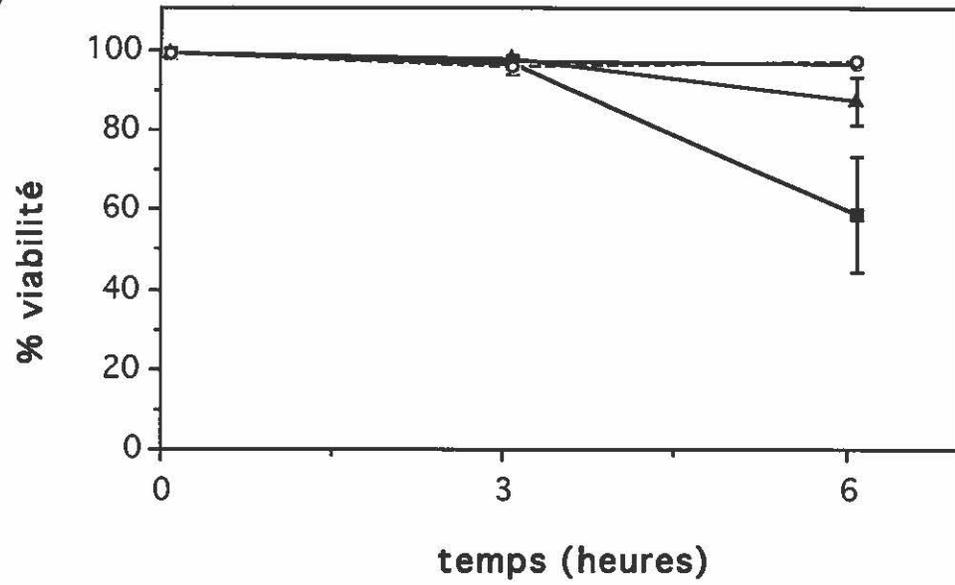
Figure 19. Cinétiques de 6 heures des cellules CEM avec différentes concentrations de gp160 dans du PBS.

Dix millions de cellules récoltées 3 jours après un passage cellulaire, ont été incubées à 37°C, pendant 6 heures, dans 1 ml de PBS contenant 100 ou 50 µg/ml de gp160 ou 100 µg/ml de BSA. En a) la viabilité des cellules au cours de la cinétique. En b) on présente les pourcentages d'apoptose à la troisième et sixième heure de la cinétique pour chaque échantillon tels que mesurés par cytométrie en flux et confirmés par microscopie électronique.

Nombre d'expériences = 3

Voir annexe II pour une analyse statistique plus détaillée.

a)



b)

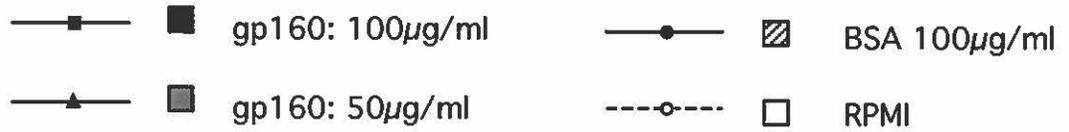
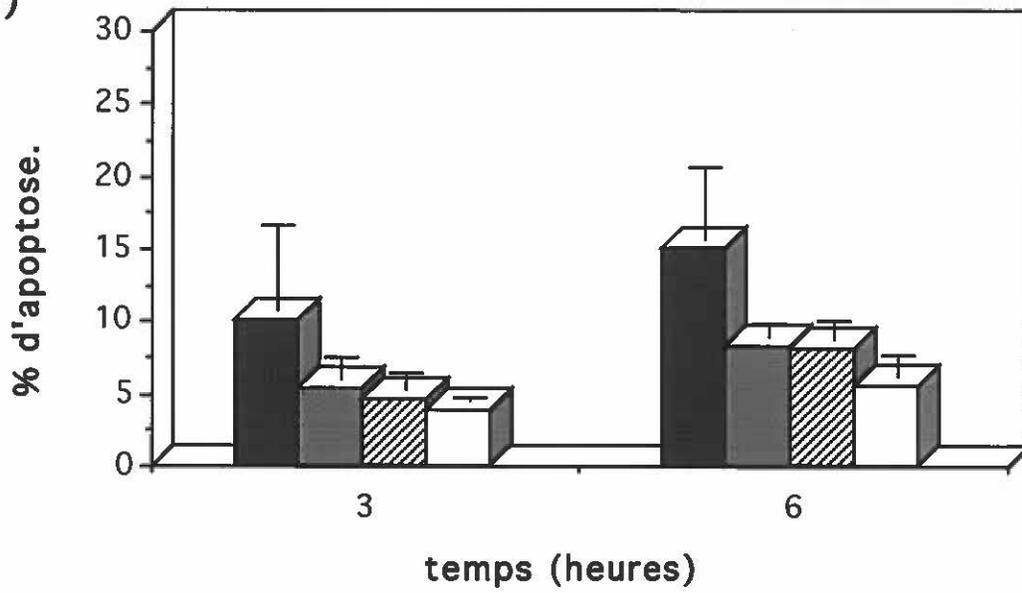




Figure 20. Cinétique de 25 heures des cellules CEM en contact intime avec de la gp160 dans différents milieux.

Dix millions de cellules récoltées 3 jours après un passage cellulaire, ont été incubées à 37°C, pendant 25 heures, avec 100µg/ml de gp160 dans différents milieux tels que du RPMI avec ou sans SFB (RPMIc. et RPMI-SFB, respectivement), et du PBS. Comme témoins négatifs, ces milieux ont été utilisés également mais en l'absence de la gp160. En a) la viabilité des cellules de chaque échantillon a été mesurée à 5 reprises au cours de la cinétique. Les lignes pointillées représentent les différents témoins négatifs. En b) on peut voir les pourcentages d'apoptose après 6 et 25 heures d'incubation, tels que mesurés par cytométrie en flux et confirmés par un comptage en microscopie électronique.

Nombre d'expériences = 1

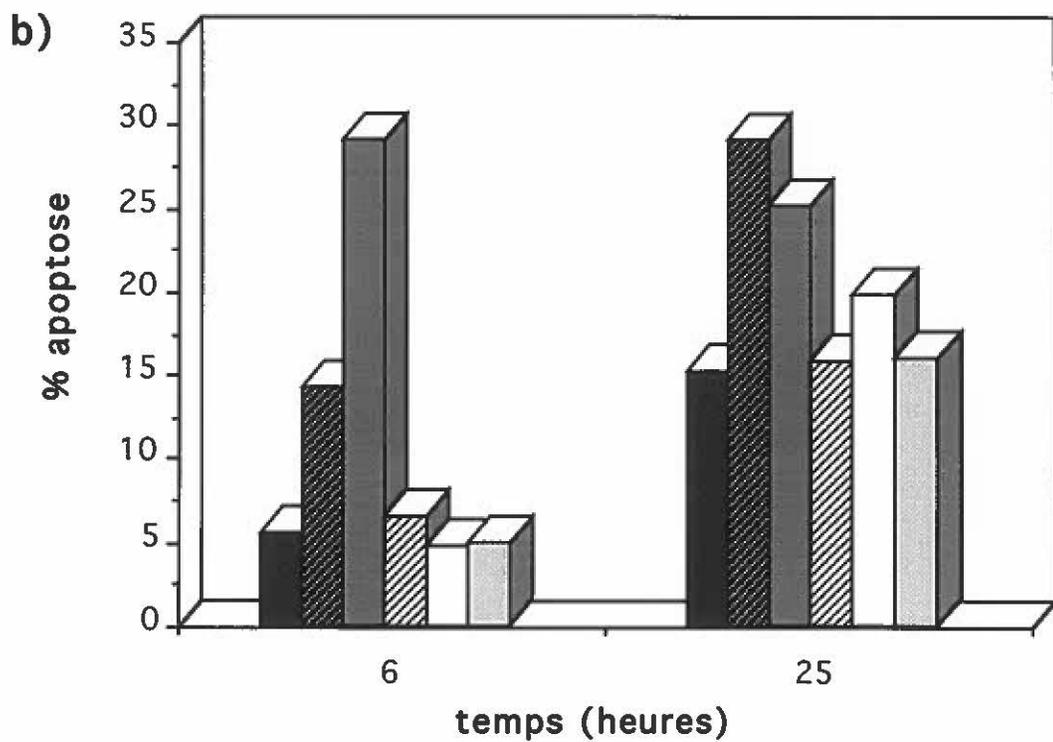
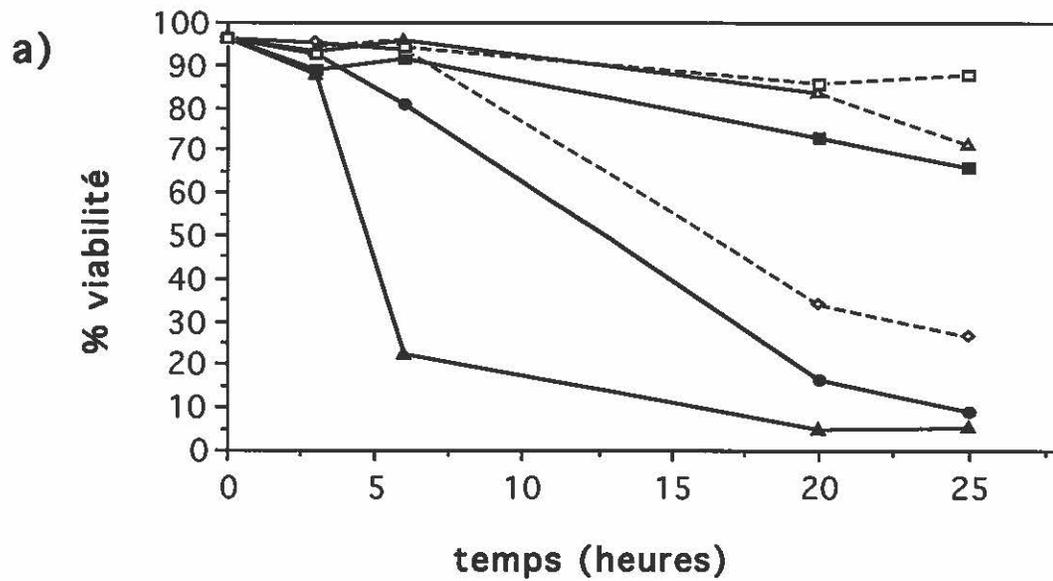
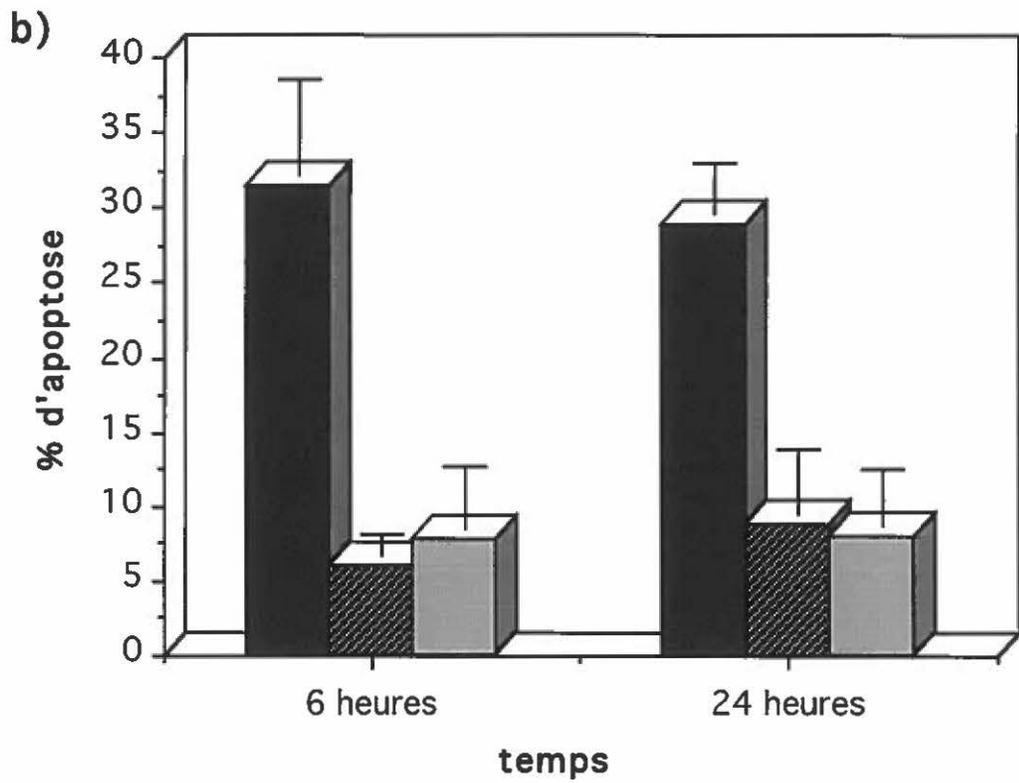
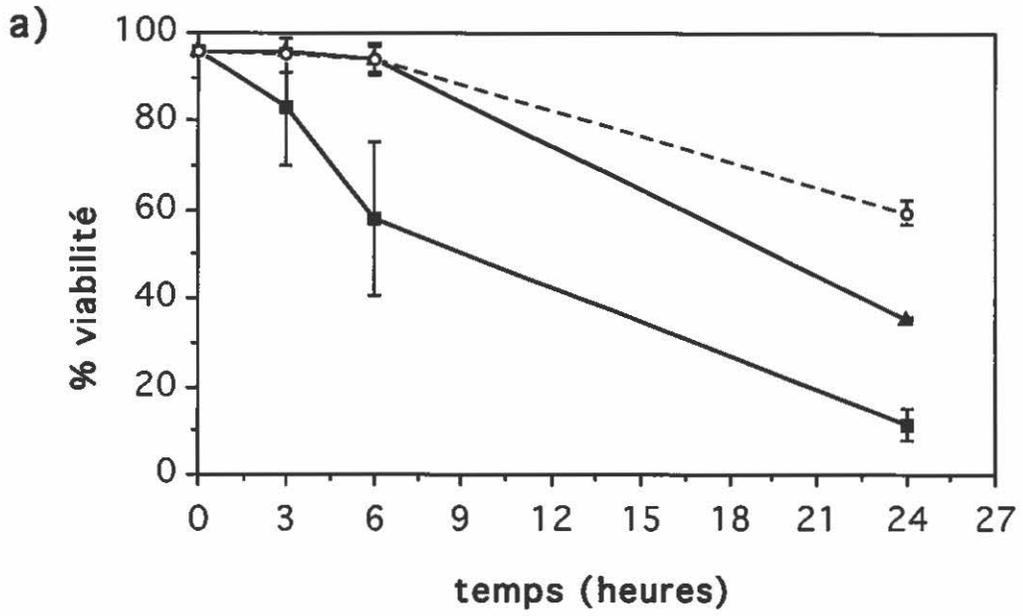


Figure 21. Cinétique de 24 heures de cellules CEM avec de la gp160 dans du PBS additionné de SFB.

Dix millions de cellules récoltées 3 jours après un passage cellulaire, ont été incubées à 37°C, pendant 25 heures, avec 100µg/ml de gp160 dans différents milieux. Du PBS avec ou sans SFB et du RPMI additionné de SFB (RPMIc.) ont été utilisés lors de cette cinétique. En a) la viabilité des cellules de chaque échantillon au cours de la cinétique. En b) on présente les pourcentages d'apoptose dans chaque échantillon tels que mesurés par cytométrie en flux et confirmés par un comptage en microscopie électronique.

Nombre d'expériences = 2

Voir annexe II pour une analyse statistique plus détaillée.

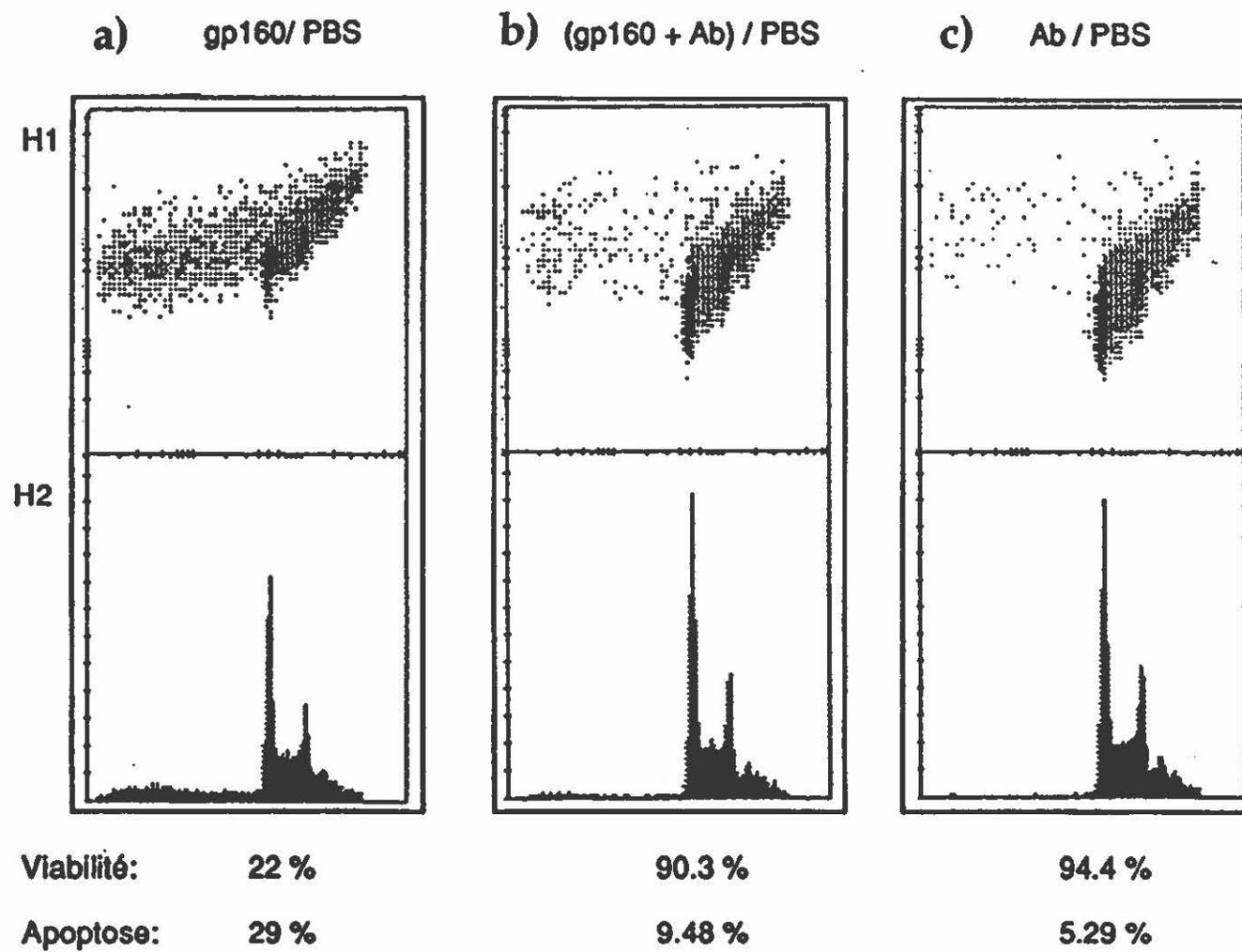


—■— ■ gp160: PBS - - - ○ - - - □ RPMlc.
 —▲— ▨ gp160: PBS+SFB

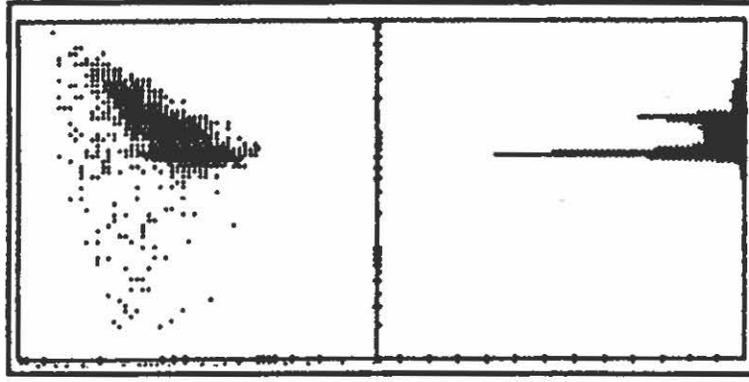
Figure 22. Incubation de cellules CEM avec de la gp160 couplée à des anticorps polyclonaux anti-gp160.

Ces 5 graphiques représentent les lectures obtenues en cytométrie en flux montrant le pourcentage d'apoptose après 6 heures d'incubation. L'histogramme 1 (H1) représente la fluorescence versus la taille des noyaux. L'histogramme 2 (H2) représente un profil de la fluorescence des noyaux. Les noyaux se distribuent sur l'abscisse selon l'intensité de leur fluorescence.

La concentration de la gp160 était ajustée à 100 µg/ml. Dans le deuxième échantillon, la gp160 a été pré-incubée pendant 2 heures avec une dilution (142 X) d'anticorps anti-gp160. La même dilution d'anticorps anti-gp160 a été utilisée dans le troisième échantillon. Finalement, dans le quatrième échantillon, la glycoprotéine du virus de l'influenza a été ajustée à 100 µg/ml. Les pourcentages de viabilité et d'apoptose sont inscrits au bas de chaque graphique.



d) Gp Influenza / PBS



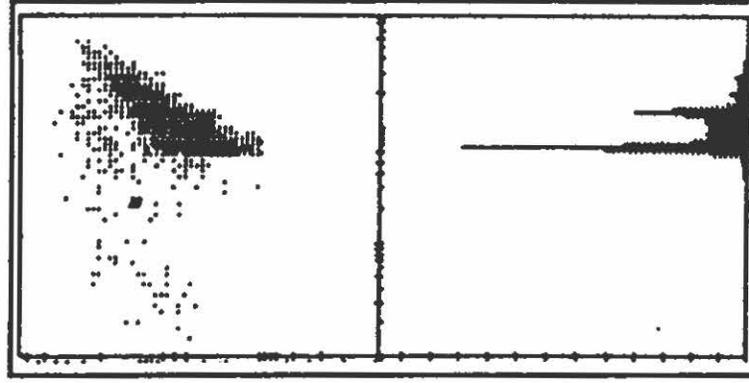
H1

H2

Viabilité : 89 %

apoptose : 6.31 %

e) PBS



94.9 %

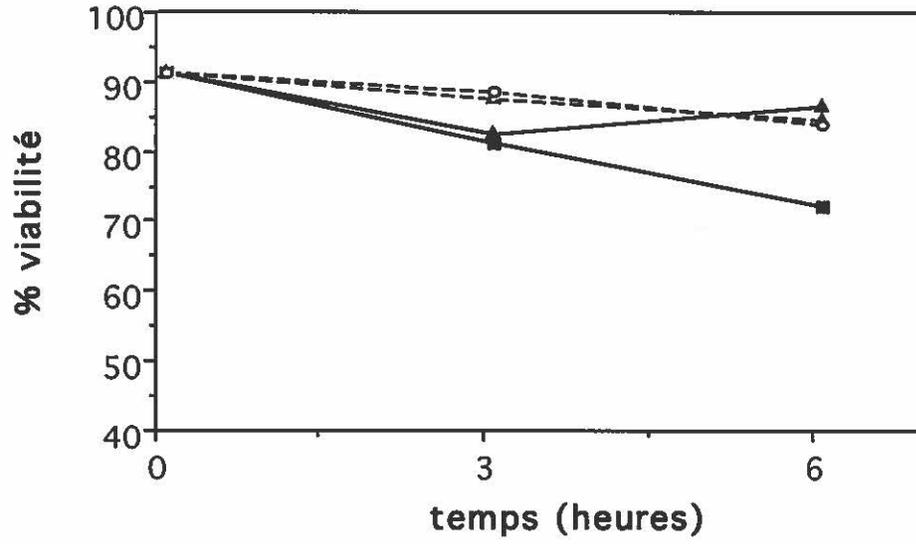
5.52 %

Figure 23. Incubation de 6 heures avec des cellules Raji en présence de la gp160 dans du PBS ou RPMIc.

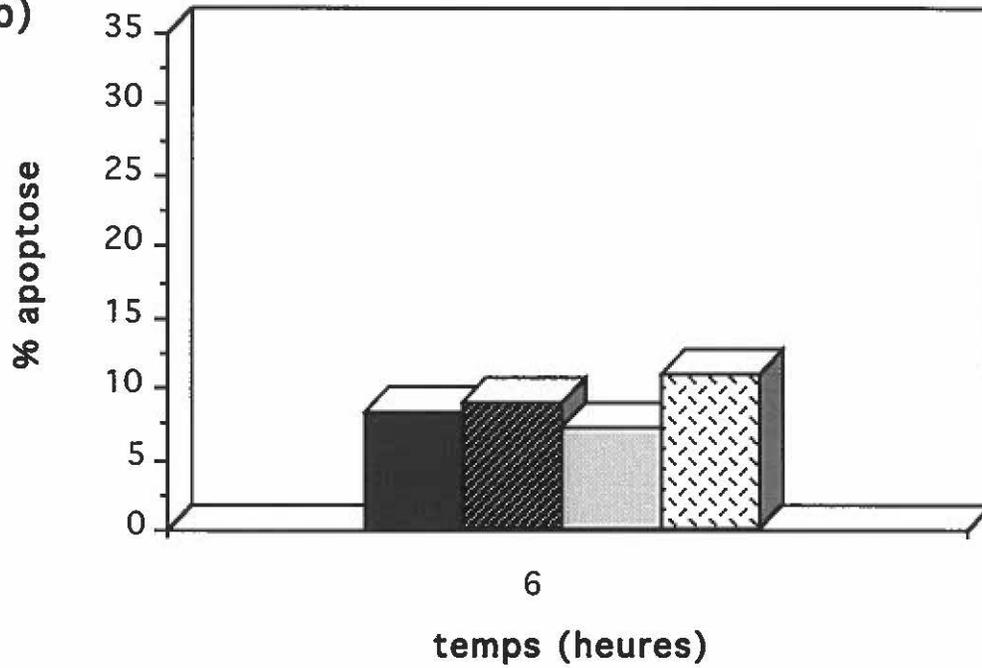
Dix millions de cellules Raji, récoltées 5 jours après un passage cellulaire, ont été incubées à 37°C dans 1 ml de PBS ou RPMI additionné de SFB (RPMIc.) La gp160 est ajouté dans ces deux milieux, à une concentration de 100 µg/ml. En a) la viabilité des cellules Raji de chaque échantillon au cours de la cinétique. En b) on présente le pourcentage d'apoptose dans chaque échantillon tel que mesuré par cytométrie en flux et confirmé par un comptage au microscope électronique.

Nombre d'expériences = 1

a)



b)



—■— ■ gp160: 100µg/ml PBS - - -▲- - - □ BSA 100µg/ml PBS
—▲— ▲ gp160: 100µg/ml RPMIc. - - -○- - - □ RPMIc.

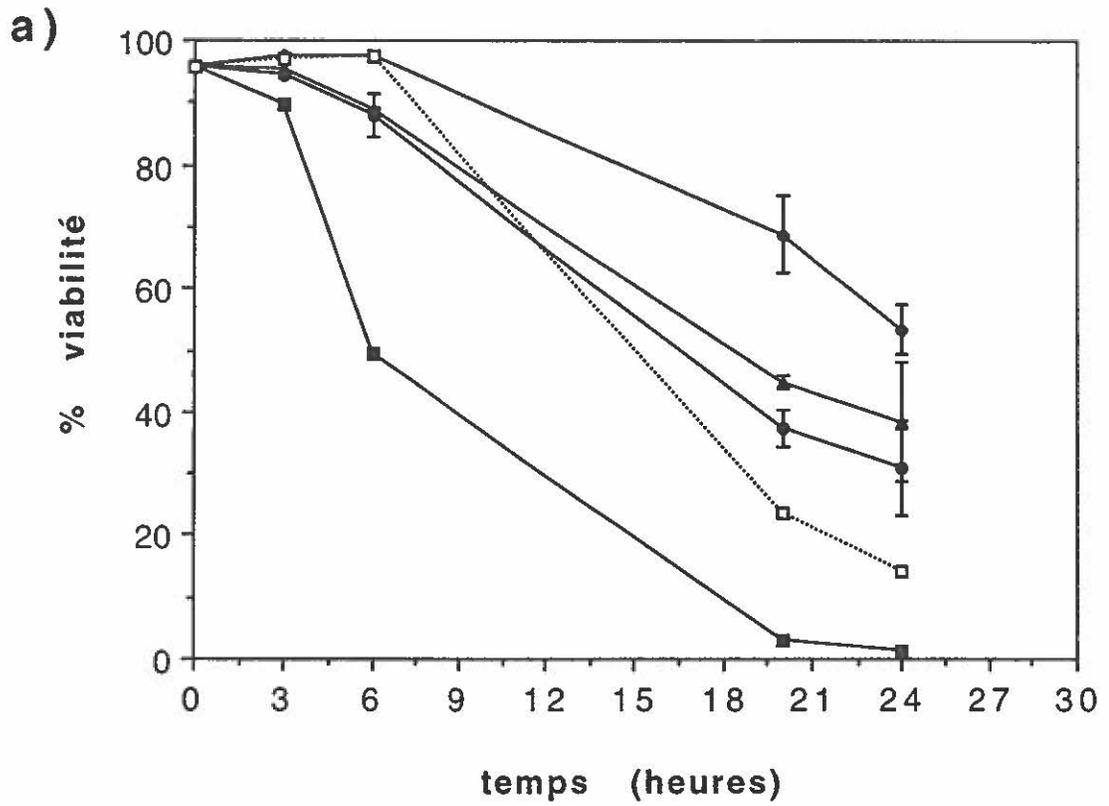
Figure 24. Incubation de 24 heures avec des cellules CEM en présence de la gp160 dans du PBS contenant 10 % de différents sérums humains.

Cinq millions de cellules récoltées 3 jours après un passage, ont été incubées à 37°C, dans 0.5 ml de PBS contenant 10 % de sérums séronégatifs (SN), ou de sérums séropositifs venant de patients asymptomatiques (SP) ou sidéens (S). La gp160 est ajouté à une concentration de 100 µg/ml. En a) la viabilité des cellules de chaque échantillon a été mesurée tout au long de la cinétique. En b) on présente les pourcentages d'apoptose après 7 heures d'incubation tels que mesurés par cytométrie en flux.

Nombre d'expériences = 1

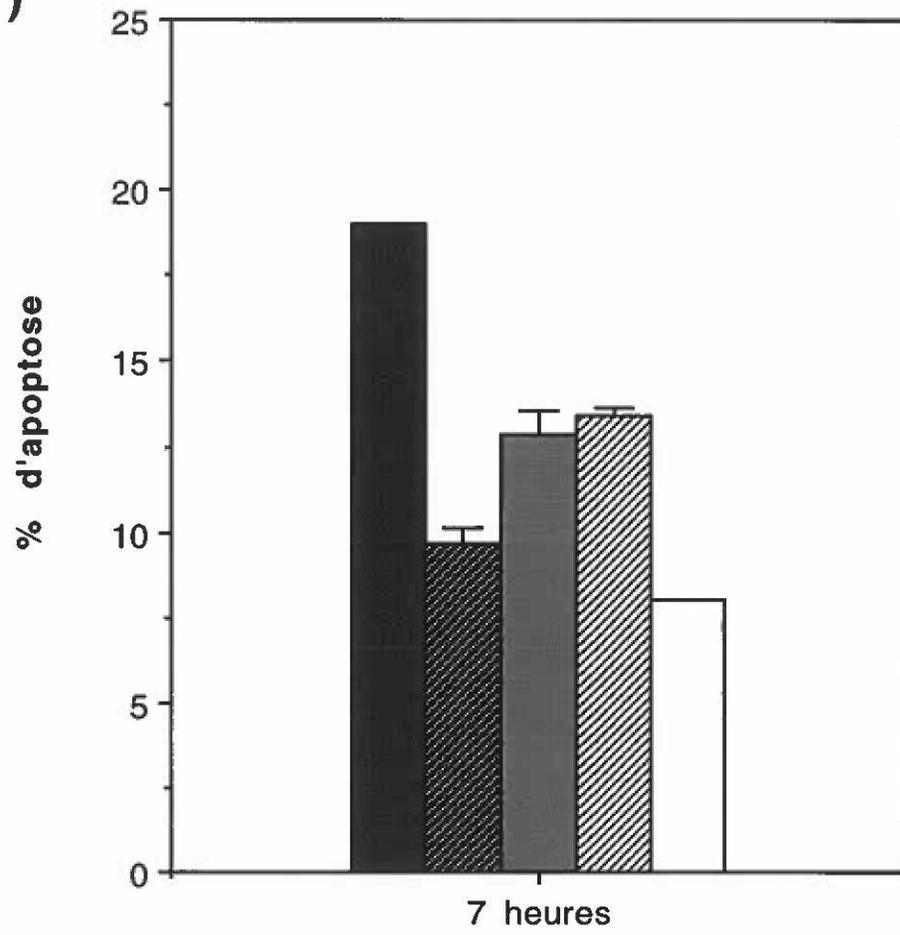
NB. Deux sérums négatifs , deux séropositifs et deux sérums sidéens, tous provenant de différents individus, ont été utilisés. Les valeurs montrés dans cette figure sont donc la moyenne de deux sérums.

Voir annexe II pour une analyse statistique plus détaillée.



- gp160
- ◆— gp160: SN
- ▲— gp160: SP
- gp160: S
- PBS

b)



- gp160: PBS
- ▨ gp160: SN
- gp160: SP
- ▨ gp160: S
- PBS

BIBLIOGRAPHIE

1. *Journal of the American Medical Association*, 1998; 279: 1000-1005.

- AHMAD, N. et S. VENKATESAN. 1988. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* 241: 1481-1485.
- AKRIDGE, R.E., L.K.M. OYAFUSO et S.G. REED. 1994. IL-10 Is Induced During HIV-1 Infection And Is Capable Of Decreasing Viral Replication In Human Macrophages. *J. Immunol.* 153: 5782-5789.
- ALDOVINI, A. et R.A. YOUNG. 1990. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* 64: 1920-1926.
- ALIZON, M., S. WAIN-HOBSON, L. MONTAGNIER et I.P. SONIGO. 1986. Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. *Cell* 46: 63-74.
- ALLAN, J.S., J.E. COLIGAN, T.H. LEE, M.F. MCLANE, P.J. KANKI, J.E. GROOPMAN et M. ESSEX. 1985. A new HTLV-III/ LAV encoded antigen detected by antibodies from AIDS patients. *Science* 230: 810-813.
- AMEISEN, J.C. et A. CAPRON. 1991. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol. Today* 12: 102-105.
- ARENDS, M.J., R.G. MORRIS, A.H. WYLLIE. 1990. Apoptosis: Role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 136: 593-608.
- ARYA, S.K., C. GUO, S.J. JOSEPHS, et F. WONG-STAAAL. 1985. Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science* 229: 69-73.
- ÅSJÖ, B. , I. IVHED, M. GIDLUND, S. FUERSTENBERG, E.M. FENYÖ, K. NILSSON et H. WIGZELL. 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.
- BAGASRA, O., S.P. HAUPTMAN, H.W. LISCHNER, M. SACHS et R.J. POMERANTZ. 1992. Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 provirus in mononuclear cells by in situ polymerase chain reaction. *New Eng. J. Med.* 326: 1385-1391.
- BANDA, N.K., J. BERNIER, D.K. KURAHARA, R. KURRELE, N. HAIGWOOD, R.P. SEKALY et T.H. FINKEL. 1992. Crosslinking CD4 by Human Immunodeficiency Virus gp120 Primes T Cells for Activation-induced Apoptosis. *J. Exp. Med.* 176: 1099-1106.

BARRE-SINOUSSE, F., J.C. CHERMANN, F. REY, M.T. NUGEYRE, S. CHAMARET, J. GRUEST, C. DAUGUET, C. AXLER-BLIN, F. VEZINET-BRUN, C. ROUZIOUX, W. ROZENBAUM et L. MONTAGNIER. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.

BARRY, M.A. et A. EASTMAN. 1993. Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis. *Arch. Biochem. Biophys.* 300: 440-450.

BERAL, V., A.T. PERTERMAN, R.L. BERKELMAN et H.W. JAFFE. 1990. Kaposi's sarcoma among person with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet* 335: 123-128.

BLANC, D., C. PATIENCE, T.F. SCHULTZ, R. WEISS et B. SPIRE. 1993. Transcomplementation of Vif⁻ HIV-1 mutants in CEM cells suggests that Vif affects late steps of the viral life cycle. *Virology* 193: 186-192

BOUR, S., U. SCHUBERT et K. STREBEL. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *J. Virol.* 69: 1510-1520.

BREEN, E.C., A.R. REZAI, K. NAKAJIMA, G.N. BEALL, R.T. MITSUYASU, T. HIRANO, T. KISHIMOTO et O. MARTINEZ-MAZA. 1990. Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production. *J. Immunol.* 144: 480-484.

BRENNER, B.G., C. GRYLLIS et M.A. WAINBERG. 1991. Role of Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity and Lymphokine-Activated Killer Cells in AIDS and Related Diseases. *J. Leuk. biol.* 50: 628-640.

BRODER, C., O. NUSSBAUM, W.G. GUTHEIL, W.W. BACHOVCHIN, E.A. BERGER, C. PATIENCE, A. MCKNIGHT, P.R. CLAPHAM, M.T. BOYD, R.A. WEISS, T.F. SCHULTZ, D. CAMERINI, V. PLANELLES, I.S.Y. CHEN, M. ALIZON et T. DRAGIC. 1994. CD26 antigen and HIV fusion. Technical comments. *Science* 264: 1156-1162.

BRUNET, J.-B. . 1992. L'épidémie dans le monde et la transmission du HIV. *Science et Vie* 179: 122-129.

BURSCH, W., L. KLEINE et M. TENNISWOOD. 1990. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* 68: 1071-1074.

CAI, Q., X.L. HUANG, G. RAPPOCCIOLO et C.R. RINALDO Jr. 1990. Natural Killer Cell Responses in Homosexual Men with Early HIV Infection. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 3: 669-676.

CALLEBAUT, C., B. KRUST, E. JACOTOT, A.G. HOVANESSIAN. 1993 T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4+ cells. *Science* 262: 2045-2049.

CARSON, D.A. et J.M. RIBEIRO. 1993. Apoptosis and disease. *Lancet* 341: 1251-1254.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1992. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Morbid. Mortal. Wkly Rep.* 41: 1-19.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 1994. Heterosexually acquired AIDS --United States, 1993. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.* 43: 155-159.

CERRETTI, D.P., C.J. KOZLOSKY, B. MOSLEY, N. NELSON, K. VAN NESS, T.A. GREENSTREET, C.J. MARCH, S.R. KRONHEIM, T. DRUCK, L.A. CANNIZZARO, K. HUEBNER et R.A. BLACK. 1992. Molecular Cloning of the Interleukin-1b Converting Enzyme. *Science* 256: 97-100.

CHAGNON, M. 1990. Contribution à une étude de faisabilité d'un vaccin sous-unitaire de type immunosome contre le syndrome d'immunodeficiency acquise (SIDA). Mémoire de maîtrise en virologie à l'IAF: 128.

CHANG, Y., E. CESARMAN, M.S. PESSIN, F. LEE, J. CULPEPPER, D.M. KNOWLES et P.S. MOORE. 1994. Identification of Herpesvirus-Like DNA Sequences in AIDS-Associated Kaposi's Sarcoma. *Science* 266: 1865-1869.

CHESEBRO, B., K. WEHRLY, J. NISHIO et S. PERRYMAN. 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.

CHIA, W.K., J. FREEDMAN, X. LI, I. SALIT, M. KARDISH et S.E. READ. 1995. Programmed Cell Death Induced by HIV Type 1 Antigen Stimulation Is Associated with a Decrease in Cytotoxic T Lymphocyte Activity in Advanced HIV Type 1 Infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11: 249-256.

CHITTENDEN, T., E.A. HARRINGTON, R. O'CONNOR, C. FLEMINGTON, R.J. LUTZ, G.I. EVAN et B.C. GUILD. 1995. Induction of apoptosis by the Bcl-2 homologue Bak. *Nature (London)* 374: 733-736.

CLARK, S.J., M.S. SAAG, W.D. DECKER, S CAMPBELL-HILL, J.L. ROBERSON, P.J. VELDKAMP, J.C. KAPPES, B.H. HAHN et G.M. SHAW. 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary hiv-1 infection. *New Engl. J. Med.* 324: 954-960.

CLAVEL F., M. GUYADER, D. GUETARD, M. SALLE, L. MONTAGNIER et M. ALIZON. 1987. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature (London)* 324: 691-694.

CLERICI, M. et G.M. SHEARER. (1993). A Th1 to Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today* 14: 107-111.

COFFIN J., A. HAASE, J.A. LEVY, L. MONTAGNIER, S. OROSZLAN, N. TEICH, H.M. TEMIN, K. TOYOSHIMA, H. VARMUS, P. VOGT et R. WEISS. 1986. What to call the AIDS virus? *Nature (London)* 321: 10.

COFFIN, J.M. 1990. "Retroviridae and their replication" dans Fields, B.N, D.M. Knipe (eds): *Virology*, 2nd Ed. Raven Press, New-York: 1437-1500.

COHEN, E.A., G. DEHNI, J.G. SODROSKI et W.A. HASELTINE. 1990a. Human immunodeficiency virus *vpr* product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* 64: 3097-3099.

COHEN, E.A., E.F. TERWILLIGER, Y. JALINOOS, J. PROULX, J.G. SODROSKI et W.A. HASELTINE. 1990b. Identification of HIV-1 *vpr* product and function. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 3: 11-18.

COHEN, J.J. 1993. Apoptosis. *Immunol. Today* 14: 126-130.

COHEN, J.J., R.C. DUKE. 1984. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol.* 132: 38-42.

CONNOR, R.I., B.K. CHEN, S. CHOE et N.R. LANDAU. 1995. *Vpr* is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virol.* 206: 935-944.

CORBEIL, J. et D.D. RICHMAN. 1995. Productive infection and subsequent interaction of CD4-gp120 at the cellular membrane is required for HIV-induced apoptosis of CD4+ T cells. *J. Gen. Virol.* 76: 681-690.

CORDONNIER, A., Y. RIVIERE, L. MONTAGNIER et M. EMERMAN. 1989. Effects of mutations in hyperconserved regions of the extracellular glycoprotein of the human immunodeficiency virus type 1 on receptor binding. *J. Virol.* 63: 4464-4468.

CULLEN, B.R. 1994. The role of Nef in the replication cycle of the human and simian immunodeficiency viruses. *Virol.* 205: 1-6.

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

DAAR, E.S., T. MOUDGIL, R.D. MEYER et D. HO. 1991. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *New Engl. J Med.* 324: 961-964.

DENESVRE, C. et E. NERRIENET. 1992. Les virus de l'immunodéficience: ceux des hommes et ceux des singes. *Science et Vie* 179: 38-41.

DHEIN, J., H. WALCZAK, C. BAUMIER, K.M. DEBATIN et P.H. KRAMMER. 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature (London)* 373: 438-441.

DUVALL, E., A.H. WYLLIE et R.G. MORRIS. 1985. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunol.* 56: 351-358.

DUVALL, E. et A.H. WYLLIE. 1986. Death and the cell. *Immunol. Today* 7: 115-119.

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

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

ENSOLI, B., G. BARILLARI, S.Z. SALAHUDDIN, R.C. GALLO et F.WONG-STAAAL. 1990. Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derivated from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature (London)* 345: 84-86.

- ENSOLI, B., L. BUONAGURO, G. BARILLARI, V. FIORELLI, R. GENDELMAN, R.A. MORGAN, P. WINGFIELD et R.C. GALLO. 1993. Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral trans-activation. *J. Virol.* 67: 277-287.
- FAN, J., H.Z. BASS et J.L. FAHEY. 1993. Elevated IFN-g and Decreased IL-2 Gene Expression Are Associated with HIV Infection. *J. Immunol.* 151: 5031-5040
- FEINBERG, M.B., D. BALTIMORE et A.D. FRANKEL. 1991. The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 4045-4049.
- FEINBERG, M.B. et W.C. GREENE. 1992. Molecular insights into human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *Curr. Opin. Immunol.* 4: 466-474.
- FENYÖ, E.M., L. MORFELDT-MANSON, F. CHIODI, B. LIND, A. VON GEGERFELT, J. ALBERT, E. OLAUSSON et B. ASLÖ. 1988. Distinct Replicative and Cytopathic Characteristics of Human Immunodeficiency Virus Isolates. *J. Virol.* 62: 4414-4419.
- FESUS, L. 1992. Apoptosis. *Immunol. Today* 13: A16-A17.
- FESUS, L., P.J.A. DAVIES et M. PIACENTINI. 1991. Apoptosis, molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur. J. Cell Biol.* 56: 170-177.
- FISHER, A.G., B. ENSOLI, L. IVANOFF, M. CHAMBERLAIN, S. PETTEWAY, L. RATNER, R.C. GALLO et F. WONG STAAL. 1987. The *sor* gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science* 237: 888-893.
- FOLEY, G.E., H. LAZARUS, S. FARBER, B.G. UZMAN, B.A. BOONE et R.E. McCARTHY. 1965. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* 18: 522-529.
- FUNKE, I., A. HAHN, E.P. RIEBER, E. WEISS et G. RIETHMÜLLER. 1987. The cellular receptor (CD4) of the human immunodeficiency virus is expressed on neurons and glial cells in human brain. *J. Exp. Med.* 165: 1230-1235.
- GARCIA, J.V. et A.D. MILLER. (1991). Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by *nef*. *Nature (London)* 350: 508-511.
- GARCIA-BLANCO, M.A. et B.R. CULLEN. 1991. Molecular basis of latency in pathogenic human viruses. *Science* 254: 815-820.

GARTNER, S., P. MARKOVITZ, D.M. MARKOVITZ, M.H. KAPLAN, R.C. GALLO et M. POPOVIC. 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* 233: 215-219.

GELDERBLUM, H.R., E.H.S. HAUSMANN, M. ÖSEL, G. PAULI et M.A. KOCH. 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156: 171-176.

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

GOFF, S.P. 1990. Retroviral reverse transcriptase: synthesis, structure and function. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 3: 817-831.

GOTTLINGER, H.G., J.G. SODROSKI et W.A. HASELTINE. 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5781-5785.

GOUDSMIT, J., C.A.B. BOUCHER, R.H. MELOEN, L.G. EPSTEIN, L. SMIT, L. VAN DER HOEK et M. BAKKER. 1988. Human antibody response to a strain-specific HIV gp120 epitope associated with cell fusion inhibition. *AIDS* 2: 157-164.

GOUGEON, M.L., R. OLIVIER, S. GARCIA, D. GUETARD, T. DRAGIC, C. DAUGUET et L. MONTAGNIER. 1991. Mise en évidence d'un processus d'engagement vers la mort cellulaire par apoptose dans les lymphocytes de patients infectés par le VIH. *C.R. Acad. Sci. Paris* 312: 529-537.

GOUGEON, M.L., S. GARCIA, J. HEENEY, R. TSCHOPP, H. LECOEUR, D. GUETARD, V. RAME, C. DAUGUET et L. MONTAGNIER. 1993. Programmed Cell Death in AIDS-Related HIV and SIV Infection. *AIDS Res. Hum. Retrovirus* 2: 553-563.

GRANT, I.H., J.W.M. GOLD, M. ROSENBLUM, D. NIEDZWIECKI et D. ARMSTRONG. 1990. *Toxoplasma gondii* serology in HIV-infected patients: The development of central nervous system toxoplasmosis in AIDS. *AIDS* 4: 519-522.

GREEN, D.R. et D.W. SCOTT. 1994. Activation-induced apoptosis in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 6: 476-487.

- GREENE, W.C. 1993. AIDS and the immune system. *Scient. American* 269: 99-105.
- GREWE, C., A. BECK et H.R. GELDERBLOM. 1990. HIV: Early virus-cell interactions. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 3: 965-974.
- GROUX, H., G. TORPIER, D. MONTÉ, Y. MOUTON, A. CAPRON et JC. AMEISEN. 1992. Activation-induced Death by Apoptosis in CD4+ T Cells from Human Immunodeficiency Virus-infected Asymptomatic Individuals. *J. Exp. Med.* 175: 331-340.
- GUY, B., Y. RIVIÈRE, K. DOTT, A REGNAULT et M.P KIENY. 1990. Mutational analysis of the HIV Nef protein. *Virology* 176: 413-425.
- GUY, B., M. GEIST, K. DOTT, D. SPEHNER, M.-P. KIENY et J.-P. LECOCQ. 1991. A specific inhibitor of cysteine proteases impairs a Vif-dependent modification of human immunodeficiency virus type 1 Env protein. *J. Virol.* 65: 1325-1331.
- HADZOPOULOU-CLADARAS, M., B.K. FELBER, C. CLADARAS, A. ATHANASSOPOULOS, A. TSE et G. N. PAVLAKIS. 1989. The *rev* (*trs /art*) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a cis-acting sequence in the *env* region. *J. Virol.* 63: 1265-1274.
- HARPER, M.E., L.M. MARSELLE, R.C. GALLO et F. WONG-STAAAL. 1986. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by *in situ* hybridation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 772-776.
- HASELTINE, W.A. (1988) Replication and pathogenesis of the AIDS virus. *J. AIDS* 1: 217-240.
- HERRMANN, C.H. et A.P. RICE. 1995. Lentivirus Tat proteins specifically associate with a cellular protein kinase, TAK, that hyperphosphorylates the carboxy-terminal domain of the large subunit of RNA polymerase II : candidate for a Tat cofactor. *J. Virol.* 69: 1612-1620.
- HOCKENBERY, D.M., Z.N. OLTVAI, X.M. YIN, C.L. MILLIMAN et S.J. KORSMEYER. 1993. Bcl-2 Functions in an Antioxidant Pathway to Prevent Apoptosis. *Cell* 75: 241-251.
- HOFFENBACH, A., P. LANGLADE-DEMOYEN, G. DADAGLIO, E. VILMER, F. MICHEL, C. MAYAUD, B. AUTRAN et F. PLATA. 1989. Unusual high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans. *J. Immunol.* 142: 452-462.

- HÖGLUND, S., A. ÖHAGEN, K. LAWRENCE et D. GABUZDA. 1994. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* 201: 349-355.
- HOLMBERG, S.D., C.R. HORSBURGH, J.W. WARD et H.W. JAFFE. 1989. Biologic factors in the sexual transmission of human immunodeficiency virus. *J. Inf. Diseases* 160: 116-125.
- HOVANESSIAN A.G. 1992. Third forum in virology: On the HIV *nef* gene product. *Res. Virology* 143: 31-34.
- HOWIE, S.E.M., A.J. SOMMERFIELD, E. GRAY et D.J. HARRISON. 1994. Peripheral T lymphocyte depletion by apoptosis after CD4 ligation in vivo: selective loss of CD44⁺ and 'activating' memory T cells. *Clin. Exp. Immunol.* 95: 195-200.
- JACKS, T., M.D. POWER, F.R. MASIARZ, P.A. LUCIW, P.J. BARR et H.E. VARMUS. 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature (London)* 331: 280-283.
- JACOBSON, D.L., J.A. McCUTCHAN, P.L. SPECHKO, I. ABRAMSON, R.S. SMITH, A. BARTOK, G.R. BOSS, D. DURAND, S.A. BOZETTE, S.A. SPECTOR et D.D. RICHMAN. 1991. The Evolution of Lymphadenopathy and Hypergammaglobulinemia Are Evidence for Early and Sustained Polyclonal B Lymphocyte Activation during Human Immunodeficiency Virus Infection. *J. Infect. Dis.* 163: 240-246.
- JAMESON, B.A., P.E. RAO, L.I. KONG, B.H. HAHN, G.M. SHAW, L.E. HOOD et S.B.H. KENT. 1988. Location and chemical synthesis of a binding site for HIV-1 on the CD4 protein. *Science* 240: 1335-1339.
- JANEWAY, C.A. Jr. 1989. The role of CD4 in T-cell activation: accessory molecule or co-receptor? *Immunol. Today* 10: 234-238.
- JENKINS, M.K. 1992. The role of cell division in the induction of clonal anergy. *Immunol. Today* 13: 69-73.
- JU, S.T., D.J. PANKA, H. CUL, R. ETTINGER, M. EL-KHATIB, D.H. SHERR, B.Z. STANGER et A. MARSHAK-ROTHSTEIN. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature (London)* 373: 444-448.

KALYANARAMAN, V.S., R. PAL, R.C. GALLO et M.G. SARNGADHARAN. 1988. A unique human immunodeficiency virus culture secreting soluble gp160. *AIDS Res. Hum. Retrovirus* **4**: 319-329.

KERR, J.F.R. 1970. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* **105**: 13-20.

KERR, J.F.R., A.H. WYLLIE et A.R. CURRIE. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**: 239-257.

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

KIEFER, M.C., M.J. BRAUER, V.C. POWERS, J.J. WU, S.R. UMANSKY, L.D. TOMEI et P.J. BARR. 1995. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature (London)* **374**: 736-739.

KIENZLE, N., M. BACHMANN, W.E.G. MULLER et N. MULLER-LANTZSCH. 1992. Expression and cellular localization of the Nef protein from human immunodeficiency virus - 1 in stably transfected B cells. *Arch. Virol.* **124**: 123-132.

KLATZMANN, D., E. CHAMPAGNE, S. CHAMARET, J. GRUEST, D. GUETARD, T. HERCEND, J.-C. GLUCKMAN et L. MONTAGNIER. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature (London)* **312**: 767-768.

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

KOVACS, J.A. 1989. Diagnosis, treatment and prevention of *pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients. *AIDS Updates* **2**: 1-12.

KOVACS, J.A., M. BASELER, R.J. DEWAR, S. VOGEL, R.T. DAVEY, J. FALLOON, M.A. POLIS, R.E. WALKER, R. STEVENS, N.P. SALZMAN, J.A. METCALF, H. MASUR et H.C. LANE. 1995. Increase in CD4 T lymphocytes with intermittent courses of interleukin-2 in patients with Human Immunodeficiency Virus infection. *New Engl. J. Med.* **332**: 567-575.

KOWALSKI, M., J. POTZ, L. BASIRIPOUR, T. DORFMAN, W.C. GOH, T. TERWILLIGER, A. DAYTON, C. ROSEN, W. HASELTINE et J. SODROSKI. 1987

Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* 237: 1351-1355.

LAM, M., G. DUBYAK, L. CHEN, G. NUNEZ, R.L. MIESFELD et C.W. DISTELHORST. 1994. Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca^{2+} fluxes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6569-6573.

LASKY, L.A., G. NAKAMURA, D.H. SMITH, C. FENNIE, C. SHIMASAKI, E. PATZER, P. BERMAN, T. GREGORY et D.J. CAPON. 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., A.P. RICE et M.B. MATHEWS. 1989. HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell* 59: 283-292.

LAURENT-CRAWFORD, A.G., B. KRUST, S. MULLER, Y. RIVIERE, MA. REY-CUILLÉ, JM. BECHET, L. MONTAGNIER et A.G. HOVANESSIAN. 1991. The Cytopathic Effect of HIV Is Associated with Apoptosis. *Virology* 185: 829-839.

LAURENT-CRAWFORD, A.G., B. KRUST, Y. RIVIERE, C. DESGRANGES, S. MULLER, MP. KIENY, C. DAUGUET et A.G. HOVANESSIAN. 1993. Membrane Expression of HIV Envelope Glycoproteins Triggers Apoptosis in CD4 Cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9: 761-773.

LAURENT-CRAWFORD, A.G., E. COCCIA, B. KRUST et A.G. HOVANESSIAN. 1995. Membrane-expressed HIV envelope glycoprotein heterodimer is a powerful inducer of cell death in uninfected CD4+ target cells. *Res. Virol.* 146: 5-17.

LENARDO, M.J. 1991. Interleukin-2 programs mouse ab T lymphocytes for apoptosis. *Nature (London)* 353: 858-861.

LEVY, J.A. 1986. The multifaced retrovirus. *Cancer Res.* 46: 5457-5468.

LEVY, J.A. 1993. HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS* 7: 1401-1410.

LI, C.J., D.J. FRIEDMAN, C. WANG, V. METELEV, A.B. PARDEE. 1995. Induction of Apoptosis in Uninfected Lymphocytes by HIV-1 Tat Protein. *Science* 268: 429-431.

LI, Y., L. LUO, N.RASOOL et Y. KANG. 1993. Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J. Virol.* 67: 584-588.

- LIFSON, J.D., G.R. REYES, M.S. McGRATH, B.S. STEIN et E.G. ENGLEMAN. 1986. AIDS Retrovirus Induced Cytopathology: Giant Cell Formation and Involvement of CD4 Antigen. *Science* 232: 1123-1127.
- LOS, M., M. VAN DE CRAEN, L.C. PENNING, H. SCHENK, M. WESTENDORP, P.A. BAEUERIE, W. DRÖGE, P.H. KRAMMER, W. FIERS et K. SCHULZE-OSTHOFF. 1995. Requirement of an ICE/CED-3 protease for FAS/APO-1- mediated apoptosis. *Nature (London)* 375: 81-83.
- LU, Y., M. STENZEL, J.G. SODROSKI et W.A. HASELTINE. 1989. Effects of long terminal repeat mutations on human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol.* 63: 4115-4119.
- LU, Y.L., P. SPEARMAN et L. RATNER. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J. Virol.* 67: 6542-6550.
- LURIA, S., I. CHAMBERS et P. BERG. (1991). Expression of the type 1 human immunodeficiency virus nef protein in T cells prevents antigen receptor-mediated induction of interleukin-2 mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5326-5330.
- LYNCH, D.H., F. RAMSDELL et M.R. ALDERSON. (1995). Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immunol. Today* 16: 569-574.
- MACKEWICZ, C., H.W. ORTEGA et J.A. LEVY. 1991. CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J. Clin. Invest.* 87: 1462-1466.
- MACKEWICZ, C. et J.A. LEVY. 1992. CD8+ cell anti-HIV activity: non-lytic suppression of virus replication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 8: 1039-1050.
- MACKEWICZ, C., D.J. BLACKBOURN et J.A. LEVY. 1995. CD8+ T cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 2308-2312.
- MADDON, P.J. S.M. MOLINEAUX, D.E. MADDON, K.A. ZIMMERMAN, M. GODFREY, F.W. ALT, L. CHESS et R. AXEL. 1987. Structure and expression of the human and mouse T4 genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9155-9159.

- MALIM, M.H., J. HAUBER, S. LE, J.V. MAIZEL, et B.R CULLEN. 1989. The HIV-1 *rev* transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature (London)* 338: 254-257.
- MANN, D.L., F. LASANE, M. POPOVIC, L.O. ARTHUR, W.G. ROBEY, W.A. BLATTNER et M.J. NEWMAN. 1987. HTLV-III large envelope protein (gp120) suppresses PHA-induced lymphocyte blastogenesis. *J. Immunol.* 138: 2640-2644.
- MARTIN, S.J., P.M. MATEAR et A. VYAKARNAM. 1994. HIV-1 Infection of Human CD4+ T Cells in Vitro. Differential Induction of Apoptosis in These Cells. *J. Immunol.* 152: 330-342.
- MARX, P.A., R.J. MUNN et K.I. JOY. 1988. Computer emulation on thin-section electron microscopy predicts an envelope-associated icosahedral capsid for human immunodeficiency virus. *Lab. Invest.* 58: 112-120.
- MATSUYAMA, T., N. KOBAYASHI et N.YAMAMOTO. 1991. Cytokines and HIV infection: is AIDS a tumor necrosis factor disease? *AIDS* 5: 1405-1417.
- McCONKEY, D.J., S. ORRENIUS et M. JONDAL. 1990. Cellular signalling in programmed cell death (apoptosis). *Immunol. Today* 11: 120-121.
- MCDUGAL, J.S., D.R. KLATZMANN et P.J. MADDON. 1991. CD4-gp120 interactions. *Curr. Opinion Immunol.* 3: 552-558.
- MCKEATING, J.A. et R.L. WILLEY. 1989. Structure and function of the HIV envelope. *AIDS* 3: S35-S41.
- MEDURI, G.U. et D.S. STEIN. 1992. Pulmonary manifestations of acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Infect. Disease* 14: 98-113.
- MERSON, M.H. 1993. Slowing the spread of HIV: Agenda for the 1990s. *Science* 260: 1266-1268.
- MERRILL, C.R., D. GOLDMAN, S.A. SEDMAN et M.H. EBERT. 1981. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211: 1437-1438.
- MERRILL, J.E. et I.S.Y. CHEN. 1991. HIV-1, macrophages, glial cells, and cytokines in AIDS nervous system disease. *FASEB J.* 5: 2391-2397.
- MEYAARD, L., S.A. OTTO, R.R. JONKER, M.J. MIJNSTER, R.P.M. KEET et F. MIEDEMA. 1992. Programmed Death of T Cells in HIV-1 Infection. *Science* 257: 217-219.

MEYAARD, L., H. SCHUITEMAKER et F. MIEDEMA. 1993. T-cell dysfunction in HIV infection: anergy due to defective antigen-presenting cell function? *Immunol. Today* 14: 161-164.

MICHAEL, N.L. M. VAHEY, D.S. BURKE et R.R. REDFIELD. 1992. Viral DNA and mRNA expression correlate with the stage of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection in humans: evidence for viral replication in all stages of HIV disease. *J Virol.* 66: 310-316.

MIURA, M., H. ZHU, R. ROTELLO, E.A. HARTWIEG et J. YUAN. 1993. Induction of Apoptosis in Fibroblasts by IL-1 Beta-Converting Enzyme, a Mammalian Homolog of the C. Elegans Cell Death Gene ced-3. *Cell* 75: 653-660.

MIYASHITA, T., S. KRAJEWSKI, M. KRAJEWSKI, H.G. WANG, H.K. LIN, D.A. LIEBERMANN, B. HOFFMAN et J.C. REED. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9: 1799-1805.

MIYASHITA, T. et J.C. REED. 1995. Tumor Suppressor p53 Is a Direct Transcriptional Activator of the Human bax Gene. *Cell* 80: 293-299.

MODROW, S., B.H. HAHN, G.M. SHAW, R.C. GALLO, F. WONG-STAAAL et H. WOLF. 1986. 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.

MONTAGNIER, L., J. GRUEST, S. CHAMARET, C. DAUGUET, C. AXLER, D. GUETARD, M.T. NUGEYRE, F. BARRE-SINOUSI, J.-C. CHERMANN, J.B. BRUNET, D. KLATZMANN et J.C. GLUCKMAN. 1984. Adaptation of lymphadenopathy associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B-lymphoblastoid cell lines. *Science* 225: 63-66.

MONTAGNIER, L., F. CLAVEL, B. KRUST, S. CHAMARET, F. REY, F. BARRE-SINOUSI et J.C. CHERMANN. 1985. Identification and antigenicity of the major envelope glycoprotein of lymphadenopathy-associated virus. *Virology* 144: 283-289.

MONTAGNIER, L., M.L. GOUGEON, R. TSCHOPP, D. GUETARD, H. LECOEUR, V. RAME, S. GARCIA, O. LOPEZ et R. OLIVIER. 1991. New insights on the mechanisms of CD4+ lymphocytes depletion in aids. *Sixième Colloque des Cent Gardes*: 9-17.

- MORRIS, R.G., A.D. HARGREAVES, E. DUVALL et A.H. WYLLIE. 1984. Hormone-induced cell-death: Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. *Am. J. Pathol.* 115: 426-436.
- MUESING, M.A., D.H. SMITH et D.J. CAPRON. 1987. Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans-activator protein. *Cell* 48: 691-701.
- MUNN, R.J., P.A. MARX, J.K. YAMAMOTO et M.B. GARDNER. 1985. Ultrastructural comparison of the retroviruses associated with human and simian acquired immunodeficiency syndromes. *Lab. Invest.* 53: 194-199.
- MURO-CACHO, C.A., G. PANTALEO et A.S. FAUCI. 1995. Analysis of Apoptosis in Lymph Nodes of HIV-Infected Persons. Intensity of Apoptosis Correlates with the General State of Activation of the Lymphoid Tissue and Not with Stage of Disease or Viral Burden. *J. Immunol.* 154: 5555-5566.
- MURTI K.G., P.S. BROWN, L. RATNER et V. GARCIA. 1993. Highly localized tracks of human immunodeficiency virus type 1 Nef in the nucleus of cells of a human CD4+ T-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11895-11899.
- NAGATA, S. et P. GOLSTEIN. 1995. The Fas Death Factor. *Science* 267: 1449-1456
- NAVIA, M.A. et B.M. MCKEEVER. 1990. A role for the aspartyl protease from the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) in the orchestration of virus assembly. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 616: 73-85.
- NELSON, W.G., K.J. PIENTA, E.R. BARRACK et D.S. COFFEY. 1986. The role of the nuclear matrix in the organisation and function of DNA. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 15: 457-475.
- NEWELL, M.K., L.J. HAUGHN, C.R. MAROUN et M.H. JULIUS. 1990. Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature (London)* 347: 286-289.
- NICOLETTI, I., G. MIGLIORATI, M.C. PAGLIACCI, F. GRIGNANI et C. RICCARDI. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139: 271-279.
- NIEDERMAN, T.M.J., J.V. GARCIA, W.R. HASTINGS, S. LURIA et L. RATNER. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein inhibits NF- κ B induction in human T cells. *J. Virol.* 66: 6213-6219.

NUNEZ, G., R. MERINO, D. GRILLOT et M. GONZALEZ-GARCIA. 1994. Bcl-2 and Bcl-x: regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunol. Today* 15: 582-588.

OH, SK., W.W. CRUIKSHANK, J. RAINA, G.C. BLANCHARD, W.H. ADLER, J. WALKER et H. KORNFELD. 1992. Identification of HIV-1 Envelope Glycoprotein in the Serum of AIDS and ARC Patients. *J. Acquired Immune Def. Syndr.* 5: 251-256.

OHKI, K., T. KIMURA, K. OHMURA, Y. MORIKAWA, I.M. JONES, I. AZUMA et K. IKUTA. 1992. Monoclonal antibodies to a CD4 peptide derivative which includes the region corresponding to an immunoglobulin CDR3: Evidence of the involvement of pre-CDR3-related region in HIV-1 and host cell interaction. *Mol. Immunol.* 29: 1391-1400.

OLSHEVSKY, U., E. HELSETH, C. FURMAN, J. LI, W. HASETINE et J. SODROSKI. 1990. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J. Virol.* 64: 5701-5707.

OLTVAI, Z.N., C.L. MILLIMAN et S.J. KORSMEYER. 1993. Bcl-2 Heterodimerizes In Vivo with a Conserved Homolog, Bax, That Accelerates Programmed Cell Death. *Cell* 74: 609-619.

ORRENIUS, S., D.J. McCONKEY et P. NICOTERA. 1991. Role of calcium in toxic and programmed cell death. *Adv. Exp. Med. Biol.* 283: 419-425.

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. 1995. La pandémie mondiale de VIH/SIDA: situation actuelle. *Weekly Epidemiol. Rec.* 70: 7-8.

OYAIZU, N., T.W. McCLOSKEY, M. CORONESI, N. CHIRMULE, V.S. KALANARAMAN et S. PAHWA. 1993. Accelerated Apoptosis in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) From Human Immunodeficiency Virus Type-1 Infected Patients and in CD4 Cross-Linked PBMCs From Normal Individuals. *Blood* 82: 3392-3400.

ÖZEL M., G. PAULI et H.R. GELDERBLUM. 1988. The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Arch. Virol.* 100: 255-266.

PAHWA, S., N. CHIRMULE, C. LEOMBRUNO, W. LIM, R. HARPER, R. BHALLA, R. PAHWA, R.P. NELSON et R.A. GOOD. 1989. In vitro synthesis of human immunodeficiency virus-specific antibodies in peripheral blood lymphocytes of infants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7532-7536.

PANGANIBAN, A.T. et H.M. TEMIN. 1983. The terminal nucleotides of retrovirus DNA are required for integration but not virus production. *Nature (London)* 306: 155-160.

PANGANIBAN, A.T. et H.M. TEMIN. 1984. Circles with two tandem LTR's are precursors to integrated retrovirus DNA. *Cell* 36: 673-679.

PANTALEO, G., C. GRAZIOSI, L. BUTINI, P.A. PIZZO, S.M. SCHITTMAN, D.P. KOTTLER et A.S. FAUCI. 1991. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9838-9842.

PANTALEO, G., C. GRAZIOSI et A.S. FAUCI. 1993a. The Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *New Engl. J. Med.* 328: 327-335.

PANTALEO, G., C. GRAZIOSI, J.F. DEMAREST, L. BUTINI, M. MONTRONI, C.H. FOX, J.M. ORENSTEIN, D.P. KOTLER et A.S. FAUCI. 1993b. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature (London)* 362: 355-358.

PANTALEO, G., C. GRAZIOSI, J.F. DEMAREST, O.J. COHEN, M. VACCAREZZA, K. GANTT, C. MURO-CACHO et A.S. FAUCI. 1994. Role of Lymphoid Organs in the Pathogenesis of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection. *Immunol. Rev.* 140: 105-130.

PARK, J. et C.D. MORROW. 1991. Overexpression of the *gag-pol* precursor from human immunodeficiency virus type 1 proviral genomes results in efficient proteolytic processing in the absence of virion production. *J. Virol.* 65: 5111-5117.

PATARCA, R., C. HEATH, G. GOLDENBERG, R. ROSEN, J. SODROSKI, W.A. HASELTINE et U. HANSEN. 1987. Transcription directed by the HIV long terminal repeat *in vitro*. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 3: 41-45.

PAUZA, C.D. et T.M. PRICE. 1988. Human immunodeficiency virus infection of T cells and monocytes proceeds via receptor-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* 107: 959-968.

PEITSCH, M.C., B. POLZAR, H. STEPHAN, T. CROMPTON, H.R. McDONALD, H.G. MANNHERZ et J. TSCHOPP. 1993. Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmend cell death). *EMBO* 12: 371-377.

PETERSON, A. et B. SEED. 1988. Genetic analysis of monoclonal antibody and HIV binding sites on the human lymphocyte antigen CD4. *Cell* 54: 65-72.

POMERANTZ, R.J., O. BAGASRA et D. BALTIMORE. 1992. Cellular latency of human immunodeficiency virus type 1. *Curr. Opin. Immunol.* 4: 475-480.

PRICE, R.W. et B.J. BREW. 1988. The AIDS dementia complex. *J. Infect. Dis.* 158: 1079-1083.

PRICE, R.W., B.J. BREW et M. ROKE. 1992. "Central and peripheral nervous system complications of HIV-1 infection and AIDS." dans DeVITA, V.T., S. HELLMAN, S.A. ROSENBERG (eds): *AIDS: Etiology, diagnosis, treatment, and prevention*, 3rd Ed. J.B. Lippincott Company, Philadelphia: 237-257.

PULVERTALF, R.J.V. 1964. Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *The Lancet* 1: 238-240.

QUINN, C.Q., A. RUFF et J. MODLIN. 1992. HIV infection and AIDS in children. *Annu. Rev. Publ. Health* 13: 1-30.

RAPPERSBERGER, K., S. GARTNER, P. SCHENK, G. STINGL, V. GROH, E. TSCHACHLER, D.L. MANN, K. WOLFF, K. KONRAD et M. POPOVIC. 1988. Langerhans' cells are an actual site of HIV-1 replication. *Intervirology* 29: 185-194.

ROBERT-GUROFF, M., M. POPOVIC, S. GARTNER, P. MARKHAM, R. GALLO et M.S. REITZ. 1990. Structure and expression of tat, rev and nef-specific transcripts of human immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages. *J. Virol.* 64: 3391-3398.

RYU, S.E., P.D. KWONG, A. TRUNEH, T.G. PORTER, J. ARTHOS, M. ROSENBERG, X. DAI, N. XUONG, R. AXEL, R.W. SWEET et W.A. HENDRICKSON. 1990. Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature (London)* 348: 419-426.

SABATIER, J.M., E. VIVES, K. MABROUK, A. BENJOUAD, H. ROCHAT, A. DUVAL, B. HUE et E. BAHRAOUI. 1991. Evidence for neurotoxic activity of Tat from human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 65: 961-967.

SADAIE, M.R., J. RAPPAPORT, T. BENTER, S.F. JOSEPHS, R. WILLIS et F. WONG-STAAAL. 1988. Missense mutations in an infectious human immunodeficiency viral genome: functional mapping of tat and identification of the rev splice acceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9224-9228.

SAKAI, H., M. KAWAMURA, J.I. SAKURAGI, S. SAKURAGI, R. SHIBATA, A. ISHIMOTO, N. ONO, S. UEDA et A. ADACHI. 1993. Integration is essential for efficient gene expression of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 67: 1169-1174.

SAMBHARA, S.R. et R.G. MILLER. 1991. Programmed Cell Death of T Cells Signaled by the T Cell Receptor and the α_3 Domain of Class I MHC. *Science* 252: 1424-1427.

SATTENTAU, Q.J., J. ARTHOS, K. DEEN, N. HANNA, D. HEALEY, P.C.L. BEVERLEY, R. SWEET et A. TRUNEH. 1989. Structural analysis of the human immunodeficiency virus-binding domain of CD4. Epitope mapping with site-directed mutants and anti-idiotypes. *J. Exp. Med.* 170: 1319-1334.

SCHNITTMAN, S.M., H.C. LANE, J. GREENHOUSE, J.S. JUSTEMENT, M. BASELER et A.S. FAUCI. 1990. Preferential infection of CD4+ memory T cells by Human Immunodeficiency Virus Type 1: Evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6058-6062.

SCHWARTZ, L.M. et B.A. OSBORNE. 1993. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol. Today* 14: 582-590

SCHWARTZ, O., M. ALIZON, J-M. HEARD et O. DANOS. 1994. Impairment of T Cell Receptor-Dependent Stimulation in CD4+ Lymphocytes after Contact with Membrane-Bound HIV-1 Envelope Glycoprotein. *Virology* 198: 360-365.

SCHWARTZ, S., B.K. FELDER, E.M. FENYO et G.N. PAVLAKIS. 1989. Rapidly and slowly replicating human immunodeficiency virus type 1 isolates can be distinguished according to target-cell tropism in T-cell and monocyte cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7200-7203.

SCHWARTZ, S., B.K. FELBER, D.M. BENKO, E.M. FENYO et G.M. PAVLAKIS. 1990. Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 64: 2519-2529.

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

SCHWARTZ, S., A. DAUTRY-VARSAT, B. GOUD, V. MARECHAL, A. SUBTIL, J.M. HEARD et O. DANOS. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef induces accumulation of CD4 in early endosomes. *J. Virol.* 69: 528-533.

- SENTMAN, C.L., J.R. SHUTTER, D. HOCKENBERY, O. KANAGAWA et S.J. KORSMEYER. 1991. bcl-2 Inhibits Multiple Forms of Apoptosis but Not Negative Selection in Thymocytes. *Cell* 67: 879-888.
- SHIRAI, A., M. COSENTINO, S.F. LEITMAN-KLINMAN et D.M. KLINMAN. 1992. Human immunodeficiency virus infection induces both polyclonal and virus-specific B cell activation. *J. Clin. Invest.* 89: 561-566.
- SIMMONDS, P., P. BALFE, C.A. LUDLAM, J.O. BISHOP et A.J. LEIGH BROWN. 1990. Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 64: 5840-5850.
- SIRIANNI, M.C., F. TAGLIAFERRI et F. AIUTI. 1990. Pathogenesis of the natural killer cell deficiency in AIDS. *Immunol. Today* 11: 81-82.
- SMITH, C.A., G.T. WILLIAMS, R. KINGSTON, E.J. JENKINSON et J.J.T. OWEN. 1989. Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature (London)* 337: 181-184.
- SODROSKI, J., R. PATARCA, C. ROSEN, F. WONG-STAAAL et W. HASELTINE. 1985. Location of the trans-activation region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* 229: 74-77.
- SODROSKI, J., W.C. GOH, C. ROSEN, A. DAYTON, E. TERWILLIGER et W.A. HASELTINE. 1986. A second post-transcriptional activator gene required for HTLV-III replication. *Nature (London)* 321: 412-417.
- SONIGO, P. 1992. Un virus qui évolue pour survivre. *Science et Vie* 179: 50-56.
- SPIEGEL, H., H. HERBST, G. NIEDOBITEK, H.D. FOSS et H. STEIN. 1992. Follicular Dendritic Cells Are a Major Reservoir for Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Lymphoid Tissues Facilitating Infection of CD4+ T-Helper Cells. *Am. J. Pathol.* 140: 15-22.
- STARCICH, B.R., B.H. HAHN, G.M. SHAW, P.D. MCNEELY, S. MODROW, H. WOLF, E.S. PARKS, S.F. JOSEPHS, R.C. GALLO et F. WONG-STAAAL. 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLVIII/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 45: 637-648.
- STEVENSON, M., T.L. STANWICK, M.P. DEMPSEY et C.A. LAMONICA. 1990. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J.* 9: 1551-1560.

- STREBEL, K., T. KLIMKAIT et M.A. MARTIN. 1988. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* 241: 1221-1223.
- SYU, W., J. HUANG, M. ESSEX et T.LEE. 1990. The N-terminal region of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 contains potential binding sites for CD4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3695-3699.
- TEEUWSEN, V.J.P., K.H.J. SIEBELINK, F. de WOLF, J. GOUDSMIT, G.C.M. UYTDEHAAG et A.D.M.E. OSTERHAUS. 1990. Impairment of in vitro immune responses occurs within 3 months after HIV-1 seroconversion. *AIDS* 4: 77-81.
- TERWILLIGER, E., R. BURGHOFF, R. SIA, J. SODROSKI, W.A. HASELTINE et C. ROSEN. 1988. The *art* gene product of human immunodeficiency virus is required for replication. *J. Virol.* 62: 655-658.
- TEWARI, M., L.T. QUAN, K. O'ROURKE, S. DESNOYERS, Z. ZENG, D.R. BEIDLER, G.G. POIRIER, G.S. SALVESEN et V.M. DIXIT. 1995. Yama/ CPP32b, a Mammalian Homolog of CED-3, Is a CrmA-Inhibitable Protease That Cleaves the Death Substrate Poly(ADP-Ribose) Polymerase. *Cell* 81: 801-809.
- THIBODEAU, L. 1991. Immunosome Technology to Improve Antigen Presentation for Efficient and Safe Viral Vaccines. *Mol. Engineering* 1: 275-293.
- THIBODEAU, L. et G. PIGNAC-KOBINGER. 1994. Receptor-dependent endocytosis in clathrin-coated pits is the main mechanism for the entry of HIV-1, HIV-2 and SIV into host-cell. VIIth International Conference on Comparative and Applied Virology. Montréal, Québec, Canada, 12-17 octobre 1994.
- THIBODEAU, L., F. DEMERS, R. MORISSET et C. LAVALLE. 1995. Purified HIV-gp160 Induces Apoptosis in Human T Lymphocytes and also in a Human CD4+ Lymphoblastoid Cell Line. Fifth Annual Conference on HIV/AIDS Research, Winnipeg, Manitoba, Canada, 8-11 juin 1995.
- TIRELLI, U., S. FRANCESCHI et A. CARBONE. 1994. Malignant tumours in patients with HIV infection. *Brit. Med. J.* 308: 1148-1153.
- VAISHNAV, Y. et F. WONG-STAAAL. 1991. The biochemistry of AIDS. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 577-630.
- VAMUS, H. 1988. Retrovirus. *Science* 240: 1427-1435.

- VAUX, D.L., H.L. AGUILA et I.L. WEISSMAN. 1992. Bcl-2 prevents death of factor-deprived cells but fails to prevent apoptosis in targets of cell mediated killing. *Int. Immunol.* 4: 821-824.
- VAUX, D.L., G. HAECKER et A. STRASSER. 1994. An Evolutionary Perspective on Apoptosis. *Cell* 76: 777-779.
- VEILLETTE, A., M.A. BOOKMAN, E.M. HORAK, L.E. SAMELSON et J.B. BOLEN. 1989. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Nature (London)* 338: 257-259.
- VERONESE, F.D., A.L. DEVICO, T.D. COPELAND, S. OROSZLAN, R.C. GALLO et M.G. SARNGADHARAN. 1985. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/ LAV envelope gene. *Science* 229: 1402-1405.
- VERONESE, F.D., T.D. COPELAND, S. OROSZLAN, R.C. GALLO et M.G. SARNGADHARAN. 1988. Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus gag gene products Pr17 and Pr24. *J. Virol.* 62: 795-801.
- VISCIDI, R.P., K. MAYUR, H.M. LEDERMAN et A.D. FRANKEL. 1989. Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by Tat protein from HIV-1. *Science* 246: 1606-1608.
- WALKER, B.D. et F. PLATA. 1990. Cytotoxic T lymphocytes against HIV. *AIDS* 4: 177-184.
- WEISS, R.A. 1993. How does HIV cause AIDS? *Science* 260: 1273-1279.
- WESTENDORP, M.O., R. FRANK, C. OCHSENBAUER, K. STRICKER, J. DHEIN, H. WALCZAK, K.M. DEBATIN et P. KRAMMER. 1995. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature (London)* 375: 497-500.
- WESTERMANN, J. et R. PABST. 1990. Lymphocyte subsets in the blood: a diagnostic window on the lymphoid system? *Immunol. Today* 11: 406-410.
- WILLEY, R.L., J.S. BONIFACINO, B.J. POTTS, M.A. MARTIN et R.D. KLAUSNER. 1988. Biosynthesis, cleavage and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 9580-9584.

- WILLEY, R.L., F. MALDARELLI, M.A. MARTIN et K. STREBEL. 1992a. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J. Virol.* 66: 226-234.
- WILLEY, R.L., F. MALDARELLI, M.A. MARTIN et K. STREBEL. 1992b. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* 66: 7193-7200.
- WINSLOW, B.J., R.J. POMERANTZ, O. BAGASRA et D. TRONO. 1993. HIV-1 latency due to the site of proviral integration. *Virol.* 196: 849-854.
- WYLLIE, A.H. 1987a. Apoptosis: Cell death under homeostatic control. Mechanisms and models in toxicology. *Arch. Toxicol. Suppl.* 11: 3-10.
- WYLLIE, A.H. 1987b. Apoptosis: Cell death in tissue regulation. *J. Pathol.* 153: 313-316.
- YANG, E., J. ZHA, J. JOCKEL, L.H. BOISE, C.B. THOMPSON et S.J. KORSMEYER. 1995. Bad, a Heterodimeric Partner for Bcl-x_L and Bcl-2, Displace Bax and Promotes Cell Death. *Cell* 80: 285-291.
- ZAULI, G., M.C. RE, G. FURLINI, M. GIOVANNINI et M. LA PLACA. 1992. Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope glycoprotein gp120-mediated killing of human haematopoietic progenitors (CD34+ cells). *J. Gen. Virol.* 73: 417-421.

ANNEXES

ANNEXE IGELS DE REGROUPEMENT ET DE SÉPARATION.**1) Gel de séparation.**

| | | |
|------------------------------|------|----|
| Solution A | 6,0 | ml |
| Solution B | 12,7 | ml |
| H ₂ O distillée | 28,8 | ml |
| TEMED | 115 | μl |
| SDS 10% | 480 | μl |
| Persulfate d'ammonium (10 %) | 120 | μl |

Dégazer sous vide avant d'ajouter le SDS.

2) Gel de regroupement.

| | | |
|----------------------------|-----|----|
| Solution C | 2,0 | ml |
| Solution D | 5,1 | ml |
| Saccharose 40% | 8,0 | ml |
| H ₂ O distillée | 0,9 | ml |
| TEMED | 40 | μl |
| SDS 10% | 160 | μl |
| Persulfate d'ammonium 10% | 100 | μl |

Solution A: Tris-Base 3M pH 8,5.

Tris-base 36,6 g

Ajouter 50 ml de HCl 1N

Ajuster le pH à 8,5

Compléter à 100 ml avec H₂O distillée.

Solution B: Acrylamides: Bis-acrylamide 40:1,1

Acrylamide 40,0 g

Bis-acrylamide 1,1 g

Compléter à 100 ml avec H₂O distillée

Filtrer sur papier Wattman 3M

Solution C: Tris-base 0,5 M pH 6,7.

Tris-base 6,0 g

Ajouter 50 ml d'H₂O distillée

Ajuster pH à 6,7

Compléter à 100ml avec H₂O distillée

Solution D: Acrylamide:Bis-acrylamide 10:2,5.

Acrylamide 10,0 g

Bis-acrylamide 2,5 g

Compléter à 100 ml avec H₂O distillée

Filtrer sur papier Wattman 3 M

COMPOSITION DES TAMPONS**Tampon d'électrophorèse pH 8,5**

| | | |
|-------------------|------|---|
| Tris-base (25 mM) | 18,0 | g |
| Glycine (192 mM) | 86,4 | g |
| SDS (0.1%) | 6,0 | g |

Compléter à 6 L avec H₂O distillée.

Tampon dissociant 2x pH 7,0

| | | |
|------------------------|-------|----|
| Tris-base (10 mM) | 0,121 | g |
| Glycérol (10%) | 10,0 | ml |
| β-mercaptoéthanol (5%) | 5,0 | ml |
| SDS (1%) | 1,0 | g |

Compléter à 100 ml avec H₂O distillée.

ANNEXE 2
ANALYSES STATISTIQUES.

Le nombre d'expériences (n), la moyenne et les déviations standards de chaque échantillon sont montrées aux figures.

La valeur de p a été calculée à l'aide du "Two sample Independent t-test" pour les expériences montrées aux figures 19, 21 et 24.

Exemple de calcul:

$$t = \frac{(X_1 - X_2) - 0}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}$$

$$df \text{ (degree of freedom)} = N_1 + N_2 - 2$$

Figure 19:

$$t = \frac{(15 - 8) - 0}{\sqrt{\frac{5^2}{3} + \frac{1.4^2}{3}}} = \frac{7}{3} = 2.33$$

$$df = 3 + 3 - 2 = 4$$

En consultant le tableau de la distribution de t, pour un df de 4, nous avons trouvé que la valeur de t obtenu (2.33) est comprise dans l'intervalle délimitée par $t = 2.132$ ($p = 0.1$) et $t = 2.776$ ($p = 0.05$). Donc, la valeur de p, pour cet exemple, est inférieure à 0.1 ($p < 0.1$).

Figure 19.

n= 3

Lecture au cytomètre en flux après 6 heures de cinétique.

| Echantillons | Moy. % d'apoptose : | dév. standard : | p |
|--------------------|---------------------|-----------------|-------|
| gp160: 100 µg/ml : | 15.0 | 5.0 | < 0.1 |
| BSA: 100 µg/ml : | 8.0 | 1.4 | < 0.1 |
| RPMI | 5.5 | 1.5 | -- |

Donc, la valeur de p pour les échantillons de gp160 (100µg/ml) versus BSA (100 µg/ml) est de <0.1

-- la valeur de p pour les échantillons gp160 (100 µg/ml) versus RPMI est de < 0.05, ce qui est statistiquement significatif.

Figure 21.

n= 2

Lecture au cytomètre en flux après 24 heures de cinétique.

| Echantillons | Moy. % d'apoptose : | dév. standard : | p |
|------------------|---------------------|-----------------|--------|
| gp160: PBS | 28.9 | 3.3 | < 0.05 |
| gp160: PBS + SFB | 8.8 | 4.3 | < 0.05 |
| RPMIc | 7.9 | 3.9 | -- |

En résumé, que l'échantillon gp160: PBS soit comparé à l'échantillon gp160: PBS+SFB ou RPMIc, la valeur de p est < 0.05. La différence entre les moyennes est donc significative.

Figure 24.

n = 1 pour les témoins

n = 2 pour les échantillons gp160:SN, gp160: SP et gp160:S

Lecture au cytomètre en flux après 7 heures de cinétique.

| Echantillons | Moy. % d'apoptose | dév. standard | p |
|--------------|-------------------|---------------|--------|
| gp160: PBS | 19.02 | -- | -- |
| gp160: SN | 9.68 | 0.43 | < 0.05 |
| gp160: SP | 12.83 | 0.7 | < 0.05 |
| gp160: S | 13.88 | 0.24 | -- |
| PBS | 8.00 | -- | -- |

La différence des moyennes est donc significative lors des comparaisons des échantillons gp160:SN vs gp160:SP ainsi qu'avec gp160:SN vs gp160:S.

A noter que la puissance de ce test est faible puisque l'expérience n'a pas été répétée. Par contre, pour les échantillons gp160:SN , gp160:SP et gp160:S, n = 2.

