

**UNIVERSITE DE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THESE

**Présentée à l'Université de Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc pour
obtenir le diplôme de DOCTORAT**

SPECIALITE : Biochimie et Biologie moléculaire
Formation Doctorale : Biologie Santé
Ecole Doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé

**ETUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES STRUCTURES
CONSERVEES DE LA GP120 DU VIH-1
ET LES CELLULES CIBLES**

**Présentée Par
DOROTHEE MISSE**

Soutenue le 30 Novembre 1998, devant le jury composé de :

Professeur. Université de Montpellier II	M. Alain BIENVENUE	Président
Directeur de Recherches, CEA	M. Dominique DORMONT	Rapporteur
Professeur. Université Libre de Bruxelles	M. Marc PARMENTIER	Rapporteur
Professeur. Université de Montpellier II	M. Gérard DEVAUCHELLE	Directeur de Thèse
Directeur de Recherches, CNRS	M. Marc SITBON	Examineur
Chargé de recherches, IRD	M. Francisco VEAS	Examineur

Aux familles MISSE et DELPUECH

à Rémy

REMERCIEMENTS

Le travail présenté dans ce mémoire de thèse a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire d'Immunologie Rétrovirale et Moléculaire de l'ORSTOM (Montpellier) et le Laboratoire de Biologie Moléculaire de la station de Recherches de pathologie comparée CNRS URA 2209 - INRA (Saint Christol-Lez-Alès), sous la direction conjointe de Francisco VEAS et Gérard DEVAUCHELLE.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à Francisco VEAS pour son accueil dans son Laboratoire, pour m'avoir dirigée tout au long de cette Thèse, avec une grande disponibilité. Merci pour sa générosité, son encouragement et pour la confiance qu'il m'a témoigné .

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Gérard DEVAUCHELLE pour ses conseils scientifiques, pour avoir suivi avec grand intérêt la progression de mon travail, pour ses encouragements et la confiance qu'il m'a témoigné.

Je suis très honorée par la présence dans ce jury de Messieurs Dominique DORMONT, Marc PARMENTIER, Alain BIENVENUE et Marc SITBON. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

J'ai énormément de plaisir à remercier à nouveau Marc SITBON pour ses conseils scientifiques précieux dans la réalisation de mes travaux et pour sa générosité.

Je remercie Franz JANSEN pour m'avoir formé et dirigé dans les premières années de ma thèse.

J'adresse mes remerciements à Martine CERRUTI, Naomi TAYLOR et Jean FAVERO pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire, pour leur aide et leurs conseils. Ces différents séjours ont été très enrichissants et très agréables. Un remerciement à Quentin SATTENTAU et à Hans YSSEL pour leur apport scientifique dans la réalisation de mes travaux.

Je tiens à remercier Arnaud DUPUY d'ANGEAC, Ilias STEFAS, Gilles DIVITA et Bernard GEOFFROY pour leurs conseils scientifiques et leur soutien constant.

Je remercie Mme VILLE et Mme PAUCELLE pour leur soutien administratif.

Un remerciement particulier à Véro NARDINI pour sa gentillesse et surtout sa participation efficace au moment de la mise en forme de ce mémoire. J'adresse également un remerciement à Alain RIVAL et à tous les membres de l'Unité Génétique et Amélioration des Plantes du Laboratoire GeneTrop pour leur soutien amical.

Pour finir, je voudrais remercier ma "grande famille" MISSE-DELPUECH-LE GARFF pour m'avoir fait confiance tout au long de ces longues années d'étude. Merci pour leurs encouragements et leur soutien moral dans les moments de stress intensif...(Remerciement spécial à mes parents, à Daniel et Martine ainsi qu'à Jean et Claire). Une pensée spéciale pour Manou disparue trop tôt.

Merci à Tintin, Mimi, Papy, Isabelle, Cricri, Denis, Robin, Laurent, Yann, Mélia, Sonya, Florence, Félix, Nelly, Sylvie M, Sylvie H, Diana, Pierre, Aline J, Didier, Luc, Marie-Noëlle, Tonton Sam, Mbombo, Papi et Mika.

ABREVIATIONS

aa	Acide aminé
Ac	Anticorps
Acm	Anticorps monoclonal
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
AIDS	Acquired immunodeficiency Syndrome
ARN	Acide Ribonucléique
ARC	AIDS Related Complex
ARV	AIDS Related Virus
ARNt	ARN de transfert
ARNm	ARN messenger
BLV	Bovine Leukemia Virus
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Classe de différenciation
CDC	Center of Disease Control
CMV	Virus Cytomégalique
EIAV	Equine Infectious Anemia Virus
gp	Glycoprotéine
HTLV-1	Human T-cell leukemia virus type 1
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LAV	Lymphadenopathy Associated Virus
LFA	Lymphocyte Function-associated Antigen
LTR	Long Terminal Repeat
MLV	Murin Leukemia Virus
NSI	nonsyncytium-inducing
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
RSV	Rous Sarcoma Virus
SDF	Stromal Derived Factor
SI	Syncytium inducing
SIDA	Syndrôme d'Immunodéficience Acquise
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne

SOMMAIRE

CHAPITRE I

INTRODUCTION 6

1.1: Historique 6

I.1.1: Premières observations de la maladie..... 6

I.1.2: Le virus de l'immunodéficience humaine..... 6

I.2: Classification des rétrovirus 7

I.3: Structure de la particule virale 8

I.3.1: Organisation génétique du VIH..... 9

I.3.1.1: Les gènes de structure 9

I.4: Cycle de réplication du VIH 13

I.4.1: Adsorption 13

I.4.1.1: Interaction du VIH avec les récepteurs cellulaires 13

I.4.1.2: Tropisme cellulaire du VIH-1 25

I.4.1.3: Pénétration du VIH dans les cellules..... 27

I.4.2: La rétrotranscription 30

I.4.3: Adressage nucléaire et intégration 31

I.4.4: Expression des gènes du VIH 32

I.4.4.1: Le promoteur viral..... 32

I.4.4.2: Les protéines de régulation 33

I.4.5: Assemblage, maturation et bourgeonnement de la particule virale: 37

I.4.6: Pathogénèse de l'infection par le VIH..... 38

I.4.6.1: Modes de transmission du VIH 38

I.4.6.2: Latence virale 39

I.4.7: Variabilité génétique du VIH 40

I.4.8: Réponse immunitaire contre le VIH..... 41

I.4.8.1: Réponse immunitaire humorale 41

I.4.8.2: Réponse immunitaire cellulaire 42

I.5: Conclusion 46

OBJECTIFS GÉNÉRAUX ET SPÉCIFIQUES DE LA RECHERCHE 47

CHAPITRE II

Délétion de la première structure conservée en hélice α de la gp120 du VIH-1 IIIB: mise en évidence des interactions dissociées de la gp120 avec le CD4 et le CXCR4

Manuscript 1 - J Virol. Vol 72, n°9..... 48

CHAPITRE III

Rôle des résidus aromatiques bicycliques de l'hélice α -1 dans la fixation de la gp120 du VIH-1 IIIB sur le récepteur CD4 : considérations structurales

Manuscript 2 - En préparation 61

CHAPITRE IV

L'interaction indépendante du CD4, entre la gp120 du VIH-1 IIIB et le CXCR4 induit leur cointernalisation dans les endosomes primaires, la phosphorylation de la PYK2 et le chimiotactisme des cellules T

Manuscript 3 - Soumis à Blood..... 75

CHAPITRE V

Conclusion Générale et Perspectives 108

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 112

CHAPITRE I

INTRODUCTION, OBJECTIFS GENERAUX ET SPECIFIQUES DE LA RECHERCHE

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1: Historique

1.1.1: Premières observations de la maladie

En juin 1981, les centres de contrôle des maladies infectieuses (Centers for disease control, CDC, Atlanta, Etats Unis) ont répertorié cinq patients homosexuels de Los Angeles atteints de pneumocystose à *Pneumocystis Carinii* et de mycoses à *Candida Albicans* (CDC., 1981a). Trois de ces patients étaient immunodéprimés ce qui amena les épidémiologistes du CDC à conclure à un éventuel dysfonctionnement du système immunitaire qui prédisposait l'organisme à des maladies opportunistes telles que celles observées.

En août 1981, ces mêmes centres ont révélé la présence de 111 cas, aussi bien de pneumonie à *pneumocystis Carinii* que de sarcome de Kaposi (CDC., 1981b). Ces données et bien d'autres sont le point de départ de notre connaissance de l'épidémie de SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise) (Hymes et Coll.,1981; Masur et Coll., 1981; Siegal et Coll., 1981; Durak et Coll, 1981). Ultérieurement, le SIDA a été décrit dans des cas de toxicomanie intraveineuse (Gottlieb et Coll., 1981; CDC., 1982a), d'hémophilie (CDC., 1982b; CDC., 1982c), de transfusion sanguine (CDC., 1982d), de transmission de la mère à l'enfant (CDC., 1982e), de transmission hétérosexuelle (Masur et Coll., 1982; CDC., 1983).

Le SIDA était donc défini à cette époque comme un syndrome clinique caractérisé par différentes maladies qui sont liées à une immunité à médiation cellulaire anormale chez des personnes dont on ne connaît pas la cause de cette immunodéficience cellulaire (CDC., 1982f).

1.1.2: Le virus de l'immunodéficience humaine

C'est en 1983 que l'équipe du Professeur Montagnier isolait à partir de lymphocytes T provenant des ganglions d'un patient atteint d'une lymphadénopathie persistante (Barré Sinoussi et Coll., 1983); un rétrovirus humain appelé LAV pour « Lymphadenopathy

Associated Virus ». Parallèlement, d'autres équipes isolaient à partir de lymphocytes de patients atteints du SIDA ou de pathologies associées (ARC pour AIDS related complex), d'autres virus: le HTLVIII « Human T-Lymphotropic Virus Type III » (Gallo et Coll., 1984) et le ARV « AIDS Related Virus » (Levy et Coll., 1984). Après analyse génétique par comparaison des séquences de ces trois virus, des équipes ont démontré qu'il s'agissait de trois variants d'un même virus (Alizon et Coll., 1984; Luciw et Coll., 1984; Muesing et Coll., 1985; Wain Hobson et Coll., 1985), apparenté aux lentivirus d'ongulés, dont le prototype est le virus ovin Visna (Sonigo et Coll., 1985).

C'est ainsi que l'appellation Human Immunodeficiency Virus (HIV) ou Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) en français, a été adoptée afin de classer ces trois virus (Coffin et Coll., 1986).

En 1986, un second virus était isolé à partir de sérums de patients présentant tous les symptômes du SIDA et originaires d'Afrique de l'Ouest (Clavel et Coll., 1986; Kanki et Coll., 1987., Albert et Coll., 1987). Les tests de sérologie ne permettaient qu'une caractérisation incomplète de ces souches et les protéines virales ne possédaient que 50 % d'homologie avec celles du VIH-1 (Guyader et Coll., 1987). En revanche, on observait une homologie bien plus importante (près de 80 %) entre ces mêmes protéines et celles du virus simien VIS (pour Virus de l'Immunodéficience Simienne). Ce nouveau virus fut baptisé VIH-2 afin de le distinguer du VIH-1.

1.2: Classification des rétrovirus

La connaissance des rétrovirus a été acquise par palier depuis bientôt quatre-vingts ans. C'est en 1908 que Peyton Rous rapporte la transmission de la leucose aviaire par un agent filtrable qui sera décrit en 1911: le virus du sarcome de Rous (RSV). L'association entre tumeur et virus, pour mammifères, ne sera montrée qu'en 1936, avec les travaux de Bittner, qui identifie un facteur transmissible et relié au cancer mammaire de la souris. Dmochowski, en 1953, démontra l'existence du virus murin des tumeurs mammaires (MMTV). Simultanément, Gross montre, en 1951, l'existence de la pathogénicité du virus de la leucémie murine (MLV). Il faut attendre encore plus d'un quart de siècle, jusqu'en 1978, pour qu'un virus de la leucémie soit mis en évidence chez l'homme (HTLV). Différentes revues générales reprennent ces travaux (Bishop., 1978; Joklik., 1974; Gallo et Coll., 1985).

Durant trois décennies, de multiples rétrovirus différents ont été trouvés dans les espèces mammifères et vertébrées.

La pathogénicité des rétrovirus permet d'individualiser trois sous-familles (Tableau 1) :

- ↳ les oncovirus qui regroupent les virus transformants, associés à des tumeurs ou des leucémies;
- ↳ les lentivirus qui provoquent des maladies à évolution plus ou moins lente et qui sont cytotoxiques en culture. Les virus de l'immunodéficience appartiennent à cette sous-famille;
- ↳ les spumavirus qui ont été mis en évidence chez de nombreux mammifères (y compris chez l'homme) mais qui n'ont pas de rôle clairement établi en pathologie.

Tableau 1. Classification des rétrovirus exogènes.

Sous famille	Genre		Exemples
	Ancienne taxonomie	Nouvelle taxonomie	
Oncovirinae	oncovirus de type C	Virus de type MLV	MLV, FeLV, GALV...
	oncovirus de type B	virus de type B	MMTV
	oncovirus de type D	virus de type D	MPMV, SMRV
		virus de type ALV ^a HTLV-BLV ^a	ALV, RSV HTLV I et II, BLV
Lentivirinae	lentivirus	lentivirus ovin et caprins	Visna, CAEV
		lentivirus équins	EIAV
		lentivirus de primates	HIV, SIV
		lentivirus félins	FIV
		lentivirus bovins	BIV
Spumavirinae	spumavirus	spumavirus	HSRV, SFV

^a Ces groupes ont été créés car les virus qu'ils contiennent ne sont pas assez similaires aux oncovirus de type C.

I.3: Structure de la particule virale

La morphologie du VIH en microscopie électronique est celle d'une particule virale de forme sphérique d'environ 100 à 140 nm de diamètre (Figure 1). Il est composé d'une enveloppe (constituée de protéines virales et d'éléments phospholipidiques et protéiques empruntés à la cellule hôte lors du bourgeonnement) et d'une nucléocapside contenant l'information sous forme de deux brins d'ARN. Il possède également une enzyme spécifique

des rétrovirus (la transcriptase inverse, responsable de la transformation de l'ARN viral en ADN bicaténaire qui a la capacité de s'intégrer dans les chromosomes de la cellule infectée), et des protéines de structure. Cette particule virale est constituée d'environ 60 % de protéines, 30 % de lipides, et 1 à 2 % d'acides nucléiques.

1.3.1: Organisation génétique du VIH

Le génome du VIH-1 a une longueur d'environ 9,1 kilobases. Flanqué de deux zones de séquences répétées (LTR pour « Long Terminal Repeat ») qui contiennent les signaux de contrôle de la transcription, il comprend trois gènes de structure (gag, pol et env) et des gènes de régulation (vpr, vpu pour le VIH-1 et vpx pour le VIH-2, vif, tat, rev, nef) (Figure 2). On note qu'en général le génome des lentivirus de primate se caractérise par un nombre élevé de gènes de régulation, ce qui les différencie des autres rétrovirus et traduit la complexité de leur organisation génétique.

1.3.1.1: Les gènes de structure

♦ Gag

Le gène gag pour « group antigen », code pour les protéines formant la capsid, la nucléocapsid et la matrice. Ces protéines sont synthétisées sous la forme d'un précurseur Pr55gag de 55 KDa qui sera clivé par la protéase virale (PR) pour donner les protéines matures p17, p24 et p15 (Gelderblom et Coll., 1987) (Figure 3). Cette protéine est un composant essentiel pour l'assemblage du virion.

De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale du précurseur, on retrouve :

- ✓ La protéine p17 forme la matrice (MA p17). Elle constitue la couche externe de la capsid et est ancrée dans la face interne de l'enveloppe virale par l'intermédiaire d'une glycine myristilée. Cette myristilation lui confère un rôle important dans le bourgeonnement de la particule virale (Göttlinger et Coll., 1989) et dans l'association du virus avec la surface de la cellule. Les structures de cette protéine en RMN et cristallographie ont montré la présence de structures en hélice α et feuillets β (Massiah et Coll., 1994).
- ✓ La protéine p24 forme la capsid virale (CA p24), c'est le constituant majeur du virion ou « core ». Elle contient une séquence très conservée parmi les capsides des rétrovirus, nommée « le domaine majeur d'homologie » (Craven et Coll., 1995). Chez les patients infectés par le VIH, l'antigénémie plasmatique p24 constitue un des critères virologiques permettant de suivre l'évolution de la maladie (Lange et Coll., 1986).

✓ La protéine p15 forme la nucléocapside (NC p15), elle sera clivée en protéine p9 et p6 (Figure 3). La protéine p9 a la propriété de lier le zinc et d'interagir avec les acides nucléiques (Morellet et Coll., 1992). Cette activité est due à la présence dans sa structure de groupement de résidus cystéine qui forme deux doigts de zinc (Gorelick et Coll., 1993). La protéine p6 joue un rôle à une étape tardive du bourgeonnement en effectuant une liaison entre une extrémité du « core » et la matrice.

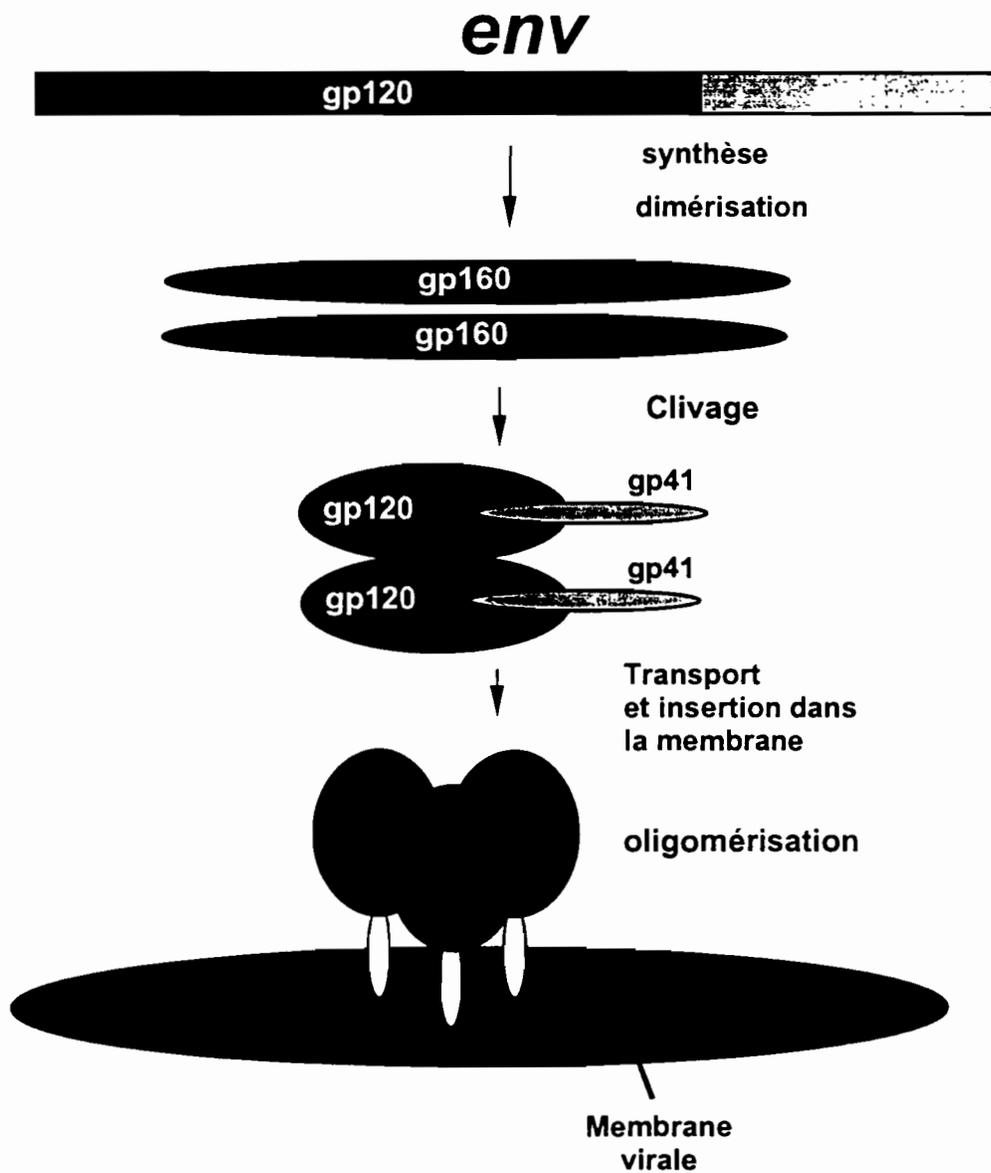
◆ **Pol :**

Les protéines enzymatiques impliquées dans différentes étapes du cycle répliquatif rétroviral, dérivent du gène Pol « pour polymérase ». Le gène pol est exprimé sous forme d'un précurseur gag-pol de 160 kDa avant sa maturation. Ce précurseur est clivé à l'intérieur du virus par la protéase virale PR pour donner les enzymes suivantes :

- ✓ La protéase PR ou p12 intervient dans la maturation des protéines gag et gag-pol avant leur assemblage dans les virions.
- ✓ La transcriptase inverse (RT ou p66/51) est un hétérodimère de sous-unités de 51 kDa et 66 kDa. La sous-unité p66 est responsable de l'activité enzymatique alors que la sous-unité p51 est un composant structural. L'enzyme possède trois activités : une activité ADN polymérase ARN dépendante, une activité ADN polymérase ADN dépendante et une activité RNase H (ribonucléase H). Beaucoup d'erreurs sont engendrées au cours des transcriptions inverses et sont ainsi maintenues dans la séquence d'ADN à cause d'un manque de la fonction de réparation. Les erreurs de la transcriptase inverse comportent des réarrangements et des insertions. En conséquence il y a un fort taux de mutations et de génération de quasi-espèces. Ces mutations incluent celles qui confèrent la résistance aux médicaments.
- ✓ L'intégrase (IN ou p32) est un tétramère dont chacune des sous-unités monomériques fait 32 kDa. La partie N-terminale de la protéine forme une structure en doigts de zinc qui se lie à l'ADN (Dyda et Coll., 1994). Par ses activités d'endonucléase et de ligase, la p32 permet l'intégration de l'ADN viral bicaténaire dans le génome cellulaire.

Ces trois protéines enzymatiques sont les cibles de différents agents inhibiteurs (Katz and Skalka., 1994).

Figure 5. Synthèse et maturation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 (d'après Sattentau, 1996).



◆ **Env :**

Le gène *env*, pour «enveloppe» code pour une protéine précurseur de 854 aa appelée gp160 (160 KDa). La gp160 est une glycoprotéine membranaire de type-1 définie par une séquence signal, un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (Moore et Ho., 1993). Ce précurseur subit de nombreuses modifications post-traductionnelles qui sont nécessaires à son activité biologique : la maturation de sa séquence signal, la formation de ponts disulfures, une oligomérisation, une très forte glycosylation, et par la suite un clivage protéolytique. Ce clivage est réalisé par une protéase cellulaire « furin-like » dans le *trans*-Golgi, qui donnera naissance à deux glycoprotéines, la glycoprotéine externe gp120 (SU gp120 en N-terminale) et la glycoprotéine transmembranaire gp41 (TM gp41 en C-terminale) (Véronèse et Coll., 1985; McCurre et Coll., 1988; Stein et Coll., 1990; McKeating et Willey, 1989; Hallenberger et Coll., 1992) (Figure 4). Ces deux glycoprotéines restent néanmoins associées par des liaisons non covalentes après le clivage protéolytique de la gp160 (Moore et Coll., 1991; McKeating et Coll., 1991a). A la surface des virions, les complexes gp120-gp41 sont présents sous forme d'oligomères : dimères, trimères ou tétramères (Schawaller et Coll., 1989; Pinter et Coll., 1989; Thomas et Coll., 1991; Rao et Coll., 1995; Lu et Coll., 1995) et sont représentés en microscopie électronique sous forme de pointes « spike » à la surface de la particule virale (Pinter et Coll., 1989) (Figure 5).

* La glycoprotéine externe (SU ou gp120)

La gp120 est une glycoprotéine de 120 KDa sous sa forme mature. La comparaison des séquences protéiques de différents isolats viraux, ont montré que la gp120 est constituée de cinq régions constantes (C1 à C5) et cinq régions hypervariables (V1 à V5) (Modrow et Coll., 1987), toutes alternées dans la structure primaire de la protéine (Figure 4). La majorité des régions hypervariables de la gp120 forment des boucles reliées par des ponts disulfures (Leonard et Coll., 1990) (Figure 6). La gp120 est une protéine fortement glycosylée, environ 50 % de sa masse moléculaire (Fenouillet et Coll., 1990). La gp120 possède 23 à 25 sites de glycosylation, aussi bien des N-glycosylations que des O-glycosylations (Leonard et Coll., 1990; Geyer et Coll., 1988). Les différents sites de glycosylation sont également répartis entre les domaines constants et variables de la protéine. Le nombre de sites de glycosylation dans la gp120 est conservé entre le VIH-1 et le VIH-2, et la moitié d'entre eux conserve leur position au sein de la molécule (Chakrabarti et Coll., 1987). L'étape de glycosylation est importante pour l'acquisition d'une conformation fonctionnelle stable de l'enveloppe virale (Dirckx et

Coll., 1990; Fenouillet et Gluckmann, 1991; Dedera et Coll., 1990). La non Connaissance de la structure cristallographique de la SU gp120 avait généré des études de structure-fonction de cette protéine par différentes approches, comprenant : la biochimie, les algorithmes informatiques, la mutagenèse et les analyses topologiques obtenus avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Moore et Coll., 1994 ; Gallaher et Coll., 1995 ; Hansen et Coll., 1996, Ditzel et Coll., 1997 ; Wyatt et Coll., 1997). Ces modèles ont pu donner certaines informations à propos de l'existence théorique de feuillets beta et de 6 hélices alpha (α HX) hautement conservées (Gallaher et Coll., 1995 ; Hansen et Coll., 1996) (Figure 7A et 7B) parmi les différentes gp120 du VIH-1. On peut aussi noter que dans la famille des rétrovirus comprenant les : VIH-2, VIS, HTLV-I, VISNA, EIAV, BLV et RSV (Gallaher et Coll., 1995) les hélices alpha de grande taille, les « beta-turn » (en français, « β -tour ») sont conservés. Une étude récente (Stern et Coll., 1997), effectuée en utilisant des anticorps monoclonaux pour trier d'une banque de phages exprimant des peptides de la gp120, a permis de confirmer que le domaine C1 contenait une hélice- α (α HX1). Cette hélice est très probablement localisée à l'interface adjacente des molécules gp120 dans les complexes oligomériques. Ceci est suggéré par le fait que les anticorps dirigés contre cette région reconnaissent mieux les gp120 monomériques que les formes natives qui sont oligomériques (Moore et Coll., 1994).

Du fait de sa masse moléculaire importante et de sa forte glycosylation la gp120 est difficilement cristallisable. Ce n'est que très récemment que, Kwong et Coll. (1998) ont pu déterminer une structure cristallographique avec une résolution de 2.5 Å d'une gp120, complexée avec les deux premiers domaines du CD4 et un fragment Fab d'un anticorps neutralisant (qui reconnaît des sites accessibles après la fixation de la gp120 sur le CD4). Ces études ont donné plusieurs informations intéressantes sur la structure de la gp120 surtout en ce qui concerne ses fonctions dans les interactions avec les récepteurs cellulaires. (Ces aspects seront développés dans le paragraphe 1.4.1.1.3).

Les domaines N-terminaux et C-terminaux ainsi que la région C4 de la gp120 sont impliqués dans les interactions entre la gp120 et la gp41 (Helseth et Coll., 1991).

Le principal rôle de la gp120 est son interaction avec les récepteurs cellulaires (ces aspects seront développés ultérieurement).

* La glycoprotéine transmembranaire (TM ou gp41)

La glycoprotéine transmembranaire gp41 est une protéine de 41 kDa qui possède 330

acides aminés. Elle présente une partie externe ("ectodomain"), un domaine transmembranaire et une partie intracytoplasmique (Figure 4). Dans sa partie externe la gp41 possède, dans sa partie N-terminale une région très hydrophobe ou domaine fusiogène (PF pour peptide de fusion) d'environ 30 aa qui formerait une hélice alpha très conservée dans les différents isolats de VIH-1 (Gallaher., 1987). Cette région hydrophobe joue un rôle important dans les événements de fusion (entre membrane de la cellule cible et enveloppe virale), probablement par son insertion dans la bicouche lipidique (Dedera et Ratner., 1991). "Ce site actif" fusionnant est conservé dans des virus très différents du VIH comme le virus de la grippe (Chan et Coll., 1997). Une autre hélice alpha située dans la région COOH du peptide de fusion riche en leucine formerait une structure de type «leucine zipper» et participerait aussi aux événements de fusion (Chen et Coll., 1993; Delwart et Coll., 1990). On note également la présence d'une boucle constituée par six acides aminés reliés par un pont disulfure qui jouerait un rôle dans la conformation globale de l'enveloppe et son transport vers les voies sécrétoires de la cellules (Dedera et Coll., 1992). Le domaine transmembranaire de la gp41 possède deux résidus hydrophiles qui formeraient, dans la bicouche lipidique, un pont entre des sous-unités de gp41 adjacentes (Gabuzda et Coll., 1991). Contrairement à la gp120, la gp41 possède 4 à 5 sites de glycosylation regroupés sur 30 aa qui s'étendent sur trois domaines importants de la gp41 (Gallaher et Coll., 1989): le site de clivage protéolytique de la gp160, l'épitope immunodominant de la gp41, et le peptide de fusion de la gp41. La gp41 joue un rôle majeur dans la fusion entre la membrane cellulaire et l'enveloppe virale ainsi que dans la formation de syncytium (Sodroski et Coll., 1986a; Kowalski et Coll., 1987).

1.4: Cycle de réplication du VIH

Le cycle de réplication du VIH est complexe et comprend différentes étapes schématisées dans la Figure 8.

1.4.1: Adsorption

1.4.1.1: Interaction du VIH avec les récepteurs cellulaires

La reconnaissance et l'attachement du virion à la cellule cible fait intervenir essentiellement les glycoprotéines d'enveloppe. Comme décrit précédemment, l'enveloppe virale est constituée de deux glycoprotéines, la gp120 et la gp41 qui sont issues du clivage protéolytique de la gp160 (Veronese et Coll., 1985 ; McCurre et Coll., 1988 ; Stein et Engleman., 1990). Pour pouvoir entrer dans les cellules qu'il infecte, le VIH-1 doit d'abord

interagir avec les protéines membranaires de l'hôte. L'événement le plus anciennement décrit est l'attachement du VIH sur le récepteur CD4 par sa glycoprotéine d'enveloppe gp120. Aujourd'hui il est admis que le CD4 ne permet pas à lui seul l'entrée du virus dans les cellules. Les autres protéines membranaires d'interaction avec l'enveloppe virale, aujourd'hui déterminées, sont appelées co-récepteurs, elles appartiennent à la famille des récepteurs des chimiokines à sept passages transmembranaires couplés aux protéines G et participent à la fusion des membranes virale et cellulaire.

I.4.1.1.1: Interaction gp120-CD4

Les lymphocytes T peuvent être divisés en deux groupes principaux selon qu'ils expriment l'antigène de surface CD4 et interagissent avec les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou bien expriment l'antigène CD8 et interagissent avec les molécules de classe I du CMH. L'antigène CD4 sert non seulement de récepteur pour les molécules de classe I mais aussi pour le VIH, ce qui explique le lymphotropisme du VIH et l'immunodéficience secondaire à la destruction des lymphocytes TCD4⁺.

L'entrée du virus dans les cellules est un processus complexe mettant en jeu une interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe gp120 et la molécule CD4 (Dalglish et Coll., 1984 ; Klatzmann et Coll., 1984a ; Maddon et Coll., 1986 ; McDougal et Coll., 1986a ; McDougal et Coll., 1986b). L'identification du CD4 comme étant le récepteur du VIH a été rendue possible par la mise en évidence du tropisme du virus pour les lymphocytes CD4⁺ (Klatzmann et Coll., 1984b) et par l'inhibition de l'infection du VIH par des anticorps dirigés contre le CD4 (Dalglish et Coll., 1984). L'interaction gp120-CD4 a été mise en évidence par McDougal et Collaborateurs, (1986a), en coprécipitant les deux molécules à partir d'un lysat de cellules CD4⁺ infectées par le VIH. L'hypothèse selon laquelle le CD4 serait le récepteur du VIH fut rapidement vérifiée par Hoxie et Coll., (1986). Ces derniers ont mis en évidence la présence de complexes gp120-CD4 au niveau des cellules infectées. De plus, la transfection du gène codant pour la molécule CD4 dans certaines cellules humaines n'exprimant pas ce marqueur de différenciation cellulaire, rend ces cellules sensibles à l'infection par le VIH (Maddon et Coll., 1986). Les cellules monocytaires expriment le récepteur CD4 à leur surface (Wood et Coll., 1983). Il a été montré que ces cellules sont infectables par le VIH *via* la molécule CD4 (Gartner et Coll., 1986; Gartner et Coll., 1990; Ho et Coll., 1986; Plata et Coll., 1990; Cheng-Mayer et Coll., 1988; Fisher et Coll., 1988). Les cellules monocytaires, contrairement aux cellules lymphocytaires, apparaissent plus résistantes à l'effet

cytopathogène induit par le virus et il a été suggéré que les cellules monocytaires pourraient avoir un rôle de réservoir cellulaire du virus (Gendelman et Coll., 1989).

La molécule CD4 est organisée dans sa partie extracellulaire en quatre domaines distincts (D1 à D4) structurellement apparentés aux domaines variables des immunoglobulines (Williams et Barclay., 1988; Wang et Coll., 1990; Ryu et Coll., 1990; Landau et Coll. 1988) (Figure 9).

Les premières études effectuées à l'aide d'Acm anti-CD4 ont permis de localiser les régions de la molécule CD4 impliquées dans l'interaction avec la gp120 au niveau des épitopes reconnus par les Acm Leu3a et OKT4a (McDougal et Coll., 1986b; Sattentau et Coll., 1986; McClure et Coll., 1987; Jameson et Coll., 1988). Des expériences de mutagenèse dirigée sur la molécule CD4 ont permis de localiser le domaine d'interaction avec la gp120 au niveau de la région « CDR2 like » (région variable homologue à la région CDR2 des immunoglobulines) du premier domaine V1 de la molécule CD4 (Peterson et Seed., 1988., Clayton et Coll., 1989; Arthos et Coll., 1989., Lamarre et Coll., 1989). La région « CDR3 like » du CD4 jouerait un rôle dans la réplication du virus. En effet, un anticorps monoclonal (13B.8.2) dirigé contre cette boucle inhiberait la réplication du VIH-1 et cette inhibition se produirait après l'entrée du virus dans la cellule (Corbeau et Coll., 1993). Cependant, Simmon et Coll. (1997) ont démontré que des anticorps monoclonaux dirigés contre la boucle « CDR3 like » du CD4 inhibe l'entrée du virus dans les cellules.

Des analyses par mutagenèse, ont permis de localiser le domaine de la gp120 impliqué dans la fixation au récepteur CD4 au niveau de la portion C-terminale de la molécule et plus précisément autour de la région incluant les aa 430 à 450 (Kowalski et Coll., 1987; Lasky et Coll., 1987; Nygren et Coll., 1988 ; Cordonnier et Coll., 1989). De plus, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes séquentiels ou conformationnels situés dans la région entourant l'aa W-430 ont entraîné une inhibition de la liaison gp120-CD4 (Lasky et Coll., 1987; Sun et Coll., 1989; McKeating et Coll., 1991b; Ho et Coll., 1991a ; Ho et Coll., 1991b; Cordell et Coll., 1991; Posner et Coll., 1991).

Il a été montré que le site de liaison au récepteur CD4 implique un ensemble d'aa (T-257, D-368, E-370, W-427 et D-457) éloignés les uns des autres dans la structure primaire de la gp120 mais proche dans sa structure tertiaire (Olshevsky et Coll., 1990. Thali et Coll., 1991; Syu et Coll., 1991). Pollar et Coll. (1992) ont montré qu'une molécule de gp120 délétée des 62 premiers acides aminés de son extrémité N-terminale, des 20 derniers acides aminés de son extrémité C-terminal ainsi que de ses régions hypervariables V1, V2, V3, garde la propriété de se fixer à la molécule CD4 (Camerini et Seed., 1990; Kowalski et Coll., 1987;

Lasky et Coll., 1987; Wyatt et Coll., 1993). Récemment, nous avons montré qu'une gp120 délétée de son hélice alpha 1 (aa E91 –S115) située dans la région C1 perd la capacité de fixation au récepteur CD4 (Missé et Coll., 1998). Nous avons pu démontrer qu'une seule mutation (aa 112W/S) créée dans cette hélice α abolit toute fixation sur le récepteur CD4 (travaux en cours développés au chapitre III).

Différentes études ont montré que la fixation de la gp120 sur le récepteur CD4 est suivie d'une internalisation du complexe par endocytose (Amadori et Coll., 1992; Cefai et Coll., 1992).

I.4.1.1.2: Autres récepteurs du VIH

Maddon et Coll., montrèrent en 1986 que l'expression de CD4 suffisait à rendre les cellules humaines permissives à l'infection par le VIH-1. Les mêmes auteurs observèrent que les cellules murines CD4⁺ fixaient le virus sans s'infecter, ni pouvoir fusionner avec des cellules exprimant les glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1. Cela suggérait que seules les cellules humaines possèdent un facteur nécessaire à cette étape de fusion membranaire, parfois appelé « second récepteur du VIH ». En testant des hybrides cellulaires souris-homme immédiatement après leur formation, c'est-à-dire sous forme d'hétérocaryons, il a été possible de confirmer l'existence de ces facteurs de fusion (Dragic et Coll., 1992).

♦ Récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G

Il est clairement établi que la coexpression du CD4 et de certains récepteurs de chimiokines (à sept passages transmembranaires, couplés aux protéines G) à la surface cellulaire permet l'infection par le VIH, mais les mécanismes moléculaires mis en jeu ne sont pas encore élucidés (Clapham, 1997; Moore et Coll., 1997; Weiss, 1996; Weiss et Clapham, 1996).

Récemment, deux co-récepteurs principaux, utilisés de manière alternative par les différentes souches virales, ont été identifiés. Le CCR5, un récepteur liant les β -chimiokines MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES (Deng et Coll., 1996; Dragic et Coll., 1996; Alkhatib et Coll., 1996; Cocchi et Coll., 1995; Paxton et Coll., 1996), est nécessaire à l'entrée des souches de VIH-1 infectant les macrophages (M-tropiques), mais ne permet pas l'entrée des souches T-tropiques, adaptées aux lignées de lymphocytes T en culture (Doranz et Coll., 1996; Alkhatib et Coll., 1996). Le récepteur CCR5 a également été décrit comme étant le co-récepteur des souches macrophageotropes du VIS sur les monocytes/macrophages (Dragic et Coll., 1996).

A l'inverse le récepteur CXCR4, liant la chimiokine SDF1 α (pour Stromal derived factor) permet l'entrée des souches T-tropiques, mais non M-tropiques de VIH-1 (Feng et Coll., 1996). Le CXCR4 est présent sur la majorité des lymphocytes T, en particulier sur les lymphocytes CD4⁺ activés par des lymphokines, comme l'IL-4 (Jourdan et Coll., 1998). Ce récepteur est également présent sur toutes les sous-populations de lymphocytes B et à des faibles niveaux d'expression sur les monocytes/macrophages (Di Marzio et Coll., 1998; Yi et Coll., 1998). En outre Alkhatib et Coll., (1996). ont rapporté que, malgré l'expression de CXCR4 et de CD4 à la surface des macrophages ces derniers demeurent réfractaires à l'infection par les souches T-tropiques ; des facteurs additionnels semblent donc requis pour l'entrée du VIH. Le CXCR4 est absent sur les neutrophiles. Le choix du co-récepteur utilisé est gouverné par la sous-unité gp120 des glycoprotéines d'enveloppe du VIH qui semble interagir directement avec ces molécules (Wu et Coll., 1996).

Le co-récepteur CCR5 est une cible privilégiée de thérapeutiques visant à prévenir l'infection dans la mesure où ce sont toujours les souches M-tropiques de virus qui sont rencontrées au cours des premières années qui suivent l'infection (Choe et Coll., 1998). Ce rôle central du CCR5 a été confirmé par la détection dans des populations caucasiennes d'une délétion affectant le gène codant pour le CCR5 (CCR5 Δ 32), et aboutissant à la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle, incapable d'être transportée correctement à la surface de la cellule (Samson et Coll., 1996; Dean et Coll., 1996; Liu et Coll., 1996). En effet, les individus homozygotes pour l'allèle CCR5 Δ 32 semblent, dans la plupart des cas, résistants à l'infection par les souches M-tropiques. En outre, les individus hétérozygotes pour le CCR5 Δ 32 semblent progresser plus lentement vers le stade SIDA (Samson et Coll., 1996; Dean et Coll., 1996; Huang et Coll., 1996). Une autre mutation du CCR5, beaucoup plus rare décrite par Quillent et Coll. (1998), CCR5 m303, aurait des effets similaires.

L'association de forte affinité (4×10^{-9} M) entre la gp120 et le CD4 (Lasky et Coll., 1987) a permis de suggérer une modification de la conformation de la gp120, exposant ainsi des sites antigéniques inaccessibles sur le virus libre. Ce changement conformationnel favoriserait l'interaction du complexe gp120-CD4 avec les seconds récepteurs (Trkola et Coll., 1996 ; Wu et Coll. 1996), formant ainsi une association tri-moléculaire à surface cellulaire (Ugolini et Coll., 1997; Wu et Coll., 1996 ; Lapham et Coll., 1996; Trkola et Coll., 1996). Il a été, cependant, montré que certains virus (VIH-1, VIH-2 et VIS) peuvent s'affranchir de la fixation au récepteur CD4 (Hesselgesser et al, 1997; Edinger et Coll., 1997), utilisant directement les récepteurs aux chimiokines. En effet, certaines souches de VIH-2 sont

capables d'infecter des cellules dépourvues de CD4, en interagissant avec le récepteur CXCR4 (Endres et Coll., 1996). De plus, il a été démontré récemment qu'une gp120 provenant d'une souche virale T-tropique est capable de se fixer sur le CXCR4 de manière indépendante du CD4 (Bandres et Coll., 1998 ; Mondor et Coll., 1998; Missé et Coll., 1998), mais une fixation préalable de la gp120 sur le CD4 entraîne une meilleure fixation de la gp120 sur le CXCR4. Bien que la fixation de la gp120 du VIH au co-récepteur CCR5 dépende du CD4, Martin et Coll. (1997) ont montré que ce n'est pas le cas pour la gp120 du VISmac qui infecte le macaque. La différence serait attribuée à un seul acide aminé dans la région amino-terminale du CCR5 dont on pense qu'elle interagit directement avec la gp120. Différentes équipes ont démontré que le complexe formé entre une gp120 de souches virales M-tropiques et le récepteur CD4 sont capable d'interagir avec le CCR5 avec une forte affinité (Trkola et Coll., 1996; Wu et Coll., 1996).

Il a été montré que c'est la deuxième des trois boucles extracellulaires du CXCR4 qui est nécessaire à la fonction de co-récepteur, et qui interagirait avec le domaine variable V3 de la gp120 (Brelot et Coll., 1997; Pleskoff et Coll., 1997). Pour le co-récepteur CCR5, il a été montré que le domaine extracellulaire aminoterminal du CCR5, ainsi que la première boucle extracellulaire, sont importantes pour l'activité de co-récepteur (Rucker et Coll., 1996.; Hill et Coll., 1998).

En même temps que la découverte du co-récepteur CCR5, deux groupes identifièrent les récepteurs de chimiokines CCR3 et CCR2b comme les co-récepteurs potentiels du VIH-1 (Choe et Coll., 1996; Doranz et Coll., 1996). Mais leur activité semblait restreinte à certaines souches virales et n'était pas mise en évidence par tous les tests; le rôle des voies d'entrée CCR3 et CCR2b dans le cycle naturel du VIH-1 fut considéré au mieux comme secondaire. Néanmoins, le rôle du CCR3 pourrait être plus important car il a été rapporté que son absence d'activité ou sa relative inefficacité par rapport au CCR5 dans certains tests, serait probablement due à un très faible niveau d'expression après transfection (Choe et Coll., 1996). En effet, quand le CCR3 est synthétisé à un niveau d'expression suffisant, il semble permettre l'infection des cellules CD4⁺ par toutes les souches de VIH-1 utilisant le CCR5, et cela avec une efficacité comparable (He et Coll., 1997; Sol et Coll., 1997).

A la liste des co-récepteurs potentiels du VIH se sont récemment ajoutées deux molécules, désignées pour l'instant STRL33/bonzo, et Gpr15/bob qui ne sont pas des récepteurs *stricto sensu* car leurs ligands sont inconnus, mais appartiennent clairement à cette famille (Liao et Coll., 1997; Deng et Coll., 1997; Farzan et Coll., 1997; Alkhatib et Coll., 1997). Ces molécules sont produites, entre autres, dans les cellules cibles naturelles du VIH à

savoir les lymphocytes et les macrophages, et semblent être plus efficacement utilisées par le VIH-2 et les virus VIS, que par le VIH-1. La réplication du VIH-2 et des VIS dans certaines lignées cellulaires CD4⁺ totalement résistantes à l'infection par le VIH-1 (Clapham et Coll., 1991), suggérait l'existence de co-récepteurs utilisés seulement par les virus VIH-2 et VIS (Heredia et Coll., 1997). Ces propriétés ont été récemment observées pour un récepteur « orphelin », désigné Gpr1, qui permet l'infection de cellules CD4⁺ par le VIS, et non par le VIH-1 (Farzan et Coll., 1997). L'utilisation par le VIH-1 de co-récepteur autres que le CCR5, *in vivo*, est indiquée par les cas d'infection à VIH-1, et même de SIDA, récemment rapportés chez des sujets Δ CCR5 (Biti et Coll., 1997). Néanmoins, ces études n'ont pas permis d'identifier la ou les voies d'entrée utilisées par le VIH-1 comme alternatives au CCR5.

Il a été démontré que les principaux co-récepteurs du VIH-1, c'est-à-dire le CCR5, le CXCR4 et le CCR3, permettent l'infection de cellules CD4⁺ par des souches de VIH-2, primaires ou adaptées aux lignées (Sol et Coll., 1997., Guillon et Coll., 1998). Plusieurs différences avec le VIH-1, la principale étant une moindre dépendance vis-à-vis de la voie d'entrée du CCR5.

◆ Le CD26

Le CD26, une enzyme protéolytique transmembranaire glycosylée appelée aussi dipeptidylpeptidase IV (DPPIV; EC 3.4.14.5.) exprimée particulièrement au niveau des cellules épithéliales de l'intestin et de la prostate a été décrite comme étant un cofacteur dans l'infection des cellules par le VIH-1 (Callebaut et Coll., 1993). Ces chercheurs ont montré que l'infection par le VIH des cellules T humaines préalablement traitées par des anticorps monoclonaux dirigés contre le CD26 était nettement diminuée. Ils ont également obtenu des résultats similaires avec des inhibiteurs de l'activité enzymatique du CD26, indiquant que le CD26 serait un cofacteur essentiel pour l'entrée du virus dans les cellules, capable de rendre des cellules CD4⁺ NIH3T3 permissives à l'infection par le VIH. Cependant, ces résultats ont été contredits par différentes autres équipes (Lazaro et Coll., 1994; Broder et Coll., 1994; Camerini et Coll., 1994; Patience et Coll., 1994; Alizon et Dragic., 1994). En outre, d'autres travaux ont montré que des cellules T CD4⁺ CD26⁻ étaient plus permissives à l'infection par le VIH-1 que des cellules T CD4⁺ CD26⁺ (Blasquez et Coll., 1992; Chikao et Coll., 1994), suggérant que les cellules T CD4⁺ CD26⁻ étaient un réservoir principal du VIH-1 *in vivo*. Il a été suggéré que la région riche en proline présente dans la boucle V3 soit un substrat de protéases cellulaires telles que le CD26 qui cliverait la gp120 après sa fixation sur le CD4 (Callebaut et Coll., 1993; Dalgleish., 1995). Ce clivage permettrait un changement

conformationnel de la gp120 et la fusion de la gp41 avec la membrane cellulaire, afin de permettre l'entrée du virus dans la cellule (Moore et Coll., 1991; Clements et Coll., 1991; Werner et Levy., 1993). Différentes équipes ont montré que le CD26 est capable d'inactiver l'activité inhibitrice du SDF1 α et SDF1 β vis-à-vis de l'infection virale (T-tropique) ainsi que l'activité chimiotactique de ces chimiokines (Shioda et Coll., 1998. Proost et Coll., 1998). Ceci par clivage du dipeptide du SDF1 α et SDF1 β en N-terminal, ce qui peut expliquer son rôle dans la facilitation de la réplication virale et la progression du SIDA. Ovarecz et Coll. (1997) ont montré récemment qu'une coupure par le CD26 du dipeptide N-terminal de RANTES abolit son interaction avec le CCR1 mais pas son interaction avec le CCR5. Etant donné que l'activité inhibitrice de RANTES sur l'infection virale se produit sur le CCR5, ils n'ont pas obtenu d'inhibition de l'infection avec cette molécule.

Il a également été montré que la protéine Tat du VIH est capable de se fixer sur le CD26 et inhibe partiellement son activité enzymatique (Guteil et Coll., 1994., Chikao et Coll., 1994) ont suggéré que Tat contribue à la diminution de la réponse immune et augmente le phénomène d'apoptose *via* son interaction sur le CD26.

◆ Les glycosphingolipides

La mise en évidence d'une infection *in vitro* par le VIH de plusieurs cellules humaines CD4 négatives (Adachi et Coll., 1987; Barboza et Coll., 1992) et de cellules humaines primaires (Albright et Coll., 1996; Tornatore et Coll., 1991), a suggéré une voie d'entrée du VIH de manière CD4 indépendante. En effet, des études réalisées sur trois lignées cellulaires CD4- et permissives à l'infection par le VIH-1 (SK-N-MC, U373-MG, et HT-29) ont permis d'identifier deux composés fermement liés à la famille des glycosphingolipides: le galactosylcéramide (GalCER) et le 3'-sulfogalactosylcéramide (GalS). Ces deux composés lipidiques sont capable de se lier à la gp120 du VIH-1 et apparaissent comme récepteurs cellulaires alternatifs pour le virus (Harouse et Coll., 1991; Yahi et Coll., 1992; Fantini et Coll., 1993). La boucle V3 de la gp120 jouerait un rôle important dans cette interaction, ceci a été démontré par des expériences utilisant des anticorps (Cook et Coll., 1994), des peptides (Yahi et Coll., 1995), ou des virus recombinants (Harouse et Coll., 1995). Une quantité importante de GalS et GalCER est retrouvée dans le système nerveux central (SNC) où ces glycolipides sont retrouvés à la surface des oligodendrocytes, dans les cellules de Schwann du système nerveux périphérique et à très bas niveau d'expression dans les neurones (De Vries et Norton, 1974). Ces glycolipides sont aussi présents dans les cellules épithéliales de l'intestin

(Kawanami et Tsuji, 1968) et dans le sperme (Levine et Coll., 1976). On peut constater que tous ces types cellulaires pourraient être impliqués aussi bien dans la transmission du VIH (sperme, épithélium du colon) ou dans les manifestations de cette pathologie (oligodendrocytes, cellules de Schwann, épithélium intestinal et le rein). On sait également que GalCER, se fixe à la gp120 avec une forte affinité ($K_d = 11,6nM$) comparé à la fixation du CD4 sur une gp120 monomérique ($K_d = 2-5nM$) (Harouse et Coll., 1991). Le site de fixation de GalCER sur la gp120 s'étend sur 193 aa qui incluent la V3, la V4 et la V5 (Harouse et Coll., 1995).

Tous ces résultats amènent à se poser une question importante: *in vivo* des cellules CD4 négatives GalCER⁺/ GalS⁺ sont-elles capables d'être infectées par le VIH-1? On pourrait également penser que d'autres glycolipides pourraient jouer un rôle comme molécules accessoires pour l'entrée du virus dans les cellules de manière CD4 indépendante.

◆ Les sucres

Curtis et Coll., (1992) ont montré qu'une protéine présente au niveau de la membrane placentaire (PMBP= placental membrane binding protein) possède un domaine C-lectine qui permet la fixation de la gp120 (avec une forte affinité $K_d = 1,3-1,6nM$) probablement par ses sucres. L'expression de cette protéine à la surface des cellules HeLa confère l'attachement du virion à la cellule et son internalisation dans les endosomes mais ne résulte pas à une entrée du virus dans la cellule.

On note aussi que les glycoaminoglycanes (polysaccharides polyanioniques sulfatés) qui sont exprimés dans la matrice extracellulaire et à la surface de la cellule (dextran sulfate, héparan sulfate et chondroïtin sulfate) inhibent l'infection *in vitro* (McClure et Coll., 1992). Les héparan sulfates interagissent directement avec la boucle V3 (Batinic et Robey, 1992). Cependant l'inhibition dépend du type cellulaire et de la séquence de la boucle V3.

◆ Récepteur au complément

L'entrée du virus *via* les récepteurs au complément a également été décrite (le fragment de clivage de la fraction C3 du complément peut permettre la fixation du virus opsonisé ou d'un complexe immun à un récepteur cellulaire du complément ou CR). Cette voie d'infection a été observée avec des cellules B lymphoblastoïdes CR2⁺ (Gras et Dormont., 1991; Boyer et Coll., 1992) ainsi que sur des cellules T (MT2) (Boyer et Coll., 1991), et ceci de manière indépendante de la molécule CD4. Le VIH-1 peut se recouvrir de fragments du complément pour lesquels les lymphocytes T4 et la plupart des autres cellules cibles du virus

possèdent des récepteurs spécifiques, cette entrée du virus serait dépendante du récepteur CR3 (Reisinger et Coll., 1990). En effet, des anticorps anti-CR3 inhibent partiellement cette infection (Larcher et Coll., 1990). Dans ce système, les anticorps dirigés contre le CD4 ont également partiellement inhibé l'infection virale, suggérant que les récepteurs CR3 et CD4 ensemble permettraient l'entrée du virus dans les cellules.

Différents travaux (Montefiori., 1997; Garcia et Coll., 1996) ont montré l'existence d'une entrée du virus *via* le récepteur au fragment Fc des immunoglobulines (ce type de récepteur est présent à la surface de nombreux types cellulaires, dont le macrophage). La fixation d'un complexe immunitaire composé d'un anticorps spécifique et du VIH sur le récepteur Fc conduit à l'internalisation de l'ensemble, *via* probablement un processus d'endocytose.

I.4.1.1.3: Structure tridimensionnelle du complexe gp120-CD4-17b Fab

Kwong et Coll. (1998) ont pu déterminer une structure cristallographique avec une résolution de 2.5 Å d'une gp120 complexée avec les deux premiers domaines du CD4 et le fragment Fab de l'anticorps 17b (anticorps qui reconnaît un épitope accessible après la fixation de la gp 120 sur le CD4) (Thali et Coll., 1993). Afin d'obtenir des cristaux qui diffractent avec une bonne résolution, différentes modifications ont été réalisées dans la structure de la gp120: délétion des boucles variables (V1, V2 et V3) ainsi que des régions N et C terminales (Figure 10), clivage enzymatique de plus de 90% des sucres.

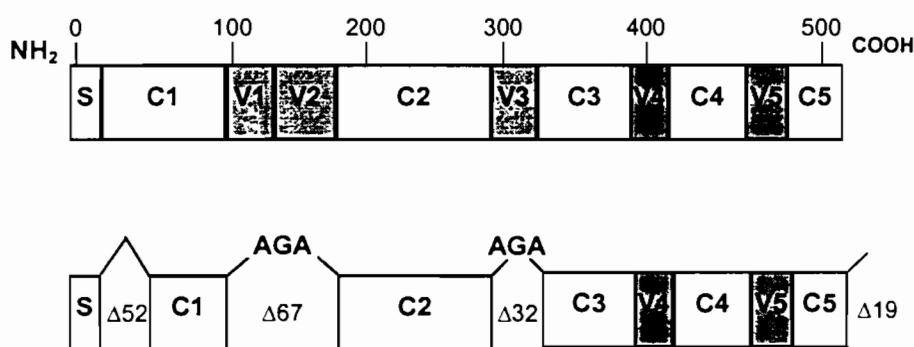


Figure10 : Délétions introduites dans la gp120. (en haut) la gp120 sauvage représentée par ses cinq régions variables (V) et constantes (C). (en bas) la forme délétée de la gp120 (d'après Sattentau., 1998).

La structure tridimensionnelle du complexe gp120-CD4-17b Fab a apporté des informations intéressantes sur :

- la structure de la gp120. Celle-ci serait constituée de 25 feuillets β , 5 hélices α et 10 boucles. La gp120 peut être représentée par 3 domaines (un domaine interne, un domaine externe et entre les deux un mini domaine ou "bridging sheet"). Le domaine interne serait constitué par les régions N et C terminales responsable de l'association avec la gp41.

- les interactions de la gp120 avec le CD4. Cette structure a révélé la présence d'une cavité hydrophobe impliquée dans l'interaction entre la gp120 et le CD4. Cette cavité serait constituée de résidus très conservés dans des gp120 provenant de différents isolats viraux et serait occupée par le résidu F43 (phénylalanine 43) du CD4 (lors de la liaison gp120-CD4).

- les interactions de la gp120 avec les co-récepteurs. Les données cristallographiques ont démontré l'existence d'un site de fixation des co-récepteurs sur la gp120 (constituant la preuve d'un changement conformationnel après fixation de la gp120 sur le CD4) (Rizzuto et Coll., 1998). La région de la gp120 reconnue par le fragment 17b Fab serait principalement constituée par des acides aminés basiques et hydrophobes (très conservés dans les gp120 de différents isolats viraux). L'interface entre la gp120 et l'anticorps 17b est localisée dans les résidus constituant le pont "bridging sheet" ainsi qu'au niveau de la "tige" supposée représenter les boucles V1V2 (Rizzuto et Coll., 1998). Ces boucles dans la molécule gp120 intacte (gp120 non liée au CD4) pourraient empêcher la fixation de l'anticorps 17b (Wyatt et Coll., 1998).

En revanche, les délétions des boucles variables (V1, V2 et V3) ainsi que le clivage des sites de glycosylation de la gp120 (décrites dans la Figure 10), empêchent d'appréhender le rôle de ces structures dans les interactions de la gp120 avec les récepteurs et co-récepteurs.

I.4.1.1.4: Les chimiokines

La parenté entre le CXCR4 et le récepteur de l'IL-8 qui est une cytokine chimiotactique ou chimiokine participant au recrutement de polynucléaires neutrophiles sur le site de la réponse inflammatoire (Baggiolini et Coll., 1994) a permis l'identification d'un facteur de fusion utilisé par les VIH-1 primaires. L'IL-8 est une chimiokine de type α , ou C-X-C (les deux cystéines de la partie NH₂ terminale sont non adjacentes) (Tableau 2). Il existe également des chimiokines de type β , ou C-C (cystéines adjacentes), moins spécifiques car elles attirent plusieurs types de cellules (macrophages, éosinophiles etc.). Dès 1986, Walker

et Coll. avaient observé que la propagation du VIH était moins efficace quand les lymphocytes CD4⁺ étaient mis en co-culture avec des lymphocytes CD8⁺ provenant de sujets infectés. Cet effet semblait dû à la sécrétion de facteurs « supprimeurs » par les lymphocytes CD8⁺, puisqu'il était reproduit par leur milieu de culture filtré.

Cocchi et Coll. (1995) seraient parvenus, par une approche assez classique consistant à fractionner au maximum le surnageant d'une lignée lymphocytaire CD8⁺, à rechercher par microséquençage quelles protéines étaient présentes dans les fractions contenant l'activité suppressive. Ils ont ainsi détecté trois molécules apparentées, RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β , des cytokines produites au cours de la réponse inflammatoire et jouant, entre autres, un rôle chimiotactique, d'où leur nom de chimiokines. Différents travaux ont montré que ces trois chimiokines ont un effet antiviral sur le VIH-1 et, en particulier, sur les souches primaires (Lusso et Coll., 1990). En effet, il a été démontré que des chimiokines recombinantes (RANTES, MIP-1 α , et MIP-1 β) inhibent, de façon dépendante de la dose, la propagation du VIH-1 dans la lignée PM1, quoique cet effet soit plus ou moins prononcé selon les isolats, certains étant totalement résistants (Cocchi et Coll., 1995). Par ailleurs, l'activité suppressive des facteurs sécrétés par les lymphocytes CD8⁺ peut être neutralisée par une combinaison de trois anticorps dirigés contre RANTES, MIP-1 α et MIP-1 β (Cocchi et Coll., 1995). Cependant, Schmidtmayerova et Coll. (1996) ont montré que l'ajout de ces trois chimiokines à des macrophages cultivés en présence de deux isolats primaires de VIH-1 a augmenté la réplication du virus au lieu de l'inhiber. Ceci suggérant la présence d'au moins un troisième co-récepteur du VIH-1 sur les macrophages ne liant pas ces chimiokines. Le ligand naturel du CXCR4, la chimiokine SDF1 α inhibe l'infection virale ainsi que la formation de *syncytia* (Oberlin et Coll., 1996; Bleul et Coll., 1996). Le mécanisme par lequel cette inhibition est réalisée n'est pas encore clairement établi ; cette inhibition pourrait être due à une internalisation du CXCR4 après fixation du SDF1 α (Amara et Coll., 1997 ; Signorel et Coll., 1997). Une autre cytokine, l'interleukine 16 (IL-16), réduirait de façon spectaculaire la propagation du VIH dans des cultures de lymphocytes. Curieusement, seule l'IL-16 de singe vert africain est active, et non l'IL-16 humaine pourtant très proche (Baier et Coll., 1995).

Tableau 2. Chimiokines et leurs récepteurs (d'après Baggiolini et Coll., 1997).

Récepteurs	Nomenclature		Ligands
	Nouvelle	Ancienne	
CXC chimiokines	CXCR1	IL-8R1 (type A)	IL-8
	CXCR2	IL-8R2 (type B)	IL-8, GRO α,β,γ , NAP-2, ENA78, GCP-2
	CXCR3	IP10/MigR	IP10, Mig
	CXCR4	LESTR, HUMSTR	SDF-1
CC chimiokines	CCR1	RANTES/MIP-1 α R	RANTES, MIP-1 α , MCP-2, MCP-3
	CCR2a/b	MCP-1RA/B	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4
	CCR3	Eotaxin, CC CKR3	Eotaxin, RANTES, MCP-3, MCP-4
	CCR4	CC CKR4	RANTES, MIP-1 α , MCP-1
	CCR5	CC CKR5	RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β

1.4.1.2: Tropisme cellulaire du VIH-1

Le tropisme cellulaire a été largement caractérisé *in vitro* et est défini comme la capacité des virus à infecter des lignées cellulaires T (T-tropiques) ou des macrophages (M-tropiques). Il est à noter que tous les virus sont capables d'infecter les cellules T immatures (Levy, 1994; McKnight et Clapham, 1995). Des études permettant de relier le tropisme cellulaire aux différents stades de la maladie ont montré que des virus à forte activité répliquative dans les lignées cellulaires T sont de manière prédominante ceux qui sont isolés durant les stades terminaux de l'infection par le VIH, tandis que les virus qui ont un tropisme pour les macrophages sont les virus qui sont présents à tous les stades de l'infection (Miedema et Coll., 1990; Miedema et Coll., 1994). Cependant, il apparaît que la transmission du VIH a lieu presque exclusivement par les virus qui ont un tropisme pour les macrophages (Miedema et Coll., 1994). Il n'est pas clairement établi comment la sélection des virus M-tropiques se fait au cours de la transmission. Les virus M-tropiques ont été décrits par différents groupes comme des virus lents « slow/low » (Fenyó et Coll., 1989) ou virus n'induisant pas la formation de syncytium « NSI », tandis que les virus T-tropiques sont décrits comme virus rapides « rapid/high » ou capable d'induire la formation de syncytium « SI ». Cependant certaines précautions doivent être prises dans ces définitions car l'infection de la lignée cellulaire MT-2 n'est pas nécessairement représentée par la fusion cellule-cellule dans les cultures de cellules primaires TCD4⁺ activées (Todd et Coll., 1995). Il a été montré que les virus M-tropiques comme T-tropiques sont capables d'infecter des cellules immatures TCD4⁺

activées (Valentin et Coll., 1994). De même la plupart des isolats primaires poussent aussi bien dans les lymphocytes que dans les macrophages, pour ce type de virus le terme “dual tropique” est couramment utilisé. Parmi les facteurs cellulaires déterminant le tropisme du VIH on retrouve le CD26, qui jouerait un rôle important dans l’entrée des virus M-tropiques (Oravec et Coll., 1995), la molécule CD44, spécifique des macrophages, qui par des preuves indirectes interviendrait aussi dans l’entrée des virus M-tropiques dans les macrophages (Dukes et Coll., 1995; Rivadeneira et Coll., 1995). De plus, depuis la découverte des co-récepteurs du VIH, on sait que des isolats du VIH qui diffèrent par leur tropisme cellulaire utilisent des récepteurs de chimiokines différents. Le VIH à tropisme macrophagique (M-tropique) utilise le récepteur CCR5 alors que les isolats à tropisme lymphocytaire ou à tropisme double utilisent le cofacteur CXCR4 (Figure 11).

En ce qui concerne les déterminants viraux, le tropisme cellulaire du VIH est déterminé de manière majoritaire par le produit du gène *env* et le déterminant majeur de ce tropisme est localisée dans la gp120, même si on sait que la gp41 est aussi impliquée (Cordonnier et Coll., 1989 ; O’Brien et Coll., 1990 ; Cheng-Mayer et Coll., 1990). Plusieurs études se sont focalisés sur la boucle V3 de la gp120, et ont montré qu’une substitution de cette boucle d’un virus M-tropique à un virus T-tropique entraîne un transfert du tropisme cellulaire, ce changement du phénotype viral a également été observé avec des substitutions d’acides aminés individuels dans la boucle V3 (Moore et Nara., 1991 ; Hwang et Coll., 1991 ; O’Brien et Coll., 1992). De plus, la boucle V3 des souches M-tropiques possède en général une charge nette négative et en position 317-318 les acides aminés Iso-Glu ou Iso-Asp, contrairement aux souches T-tropiques qui dans ces mêmes positions possèdent une Lys ou d’autres acides aminés positivement chargés (Stamatos et Cheng-Mayer., 1993).

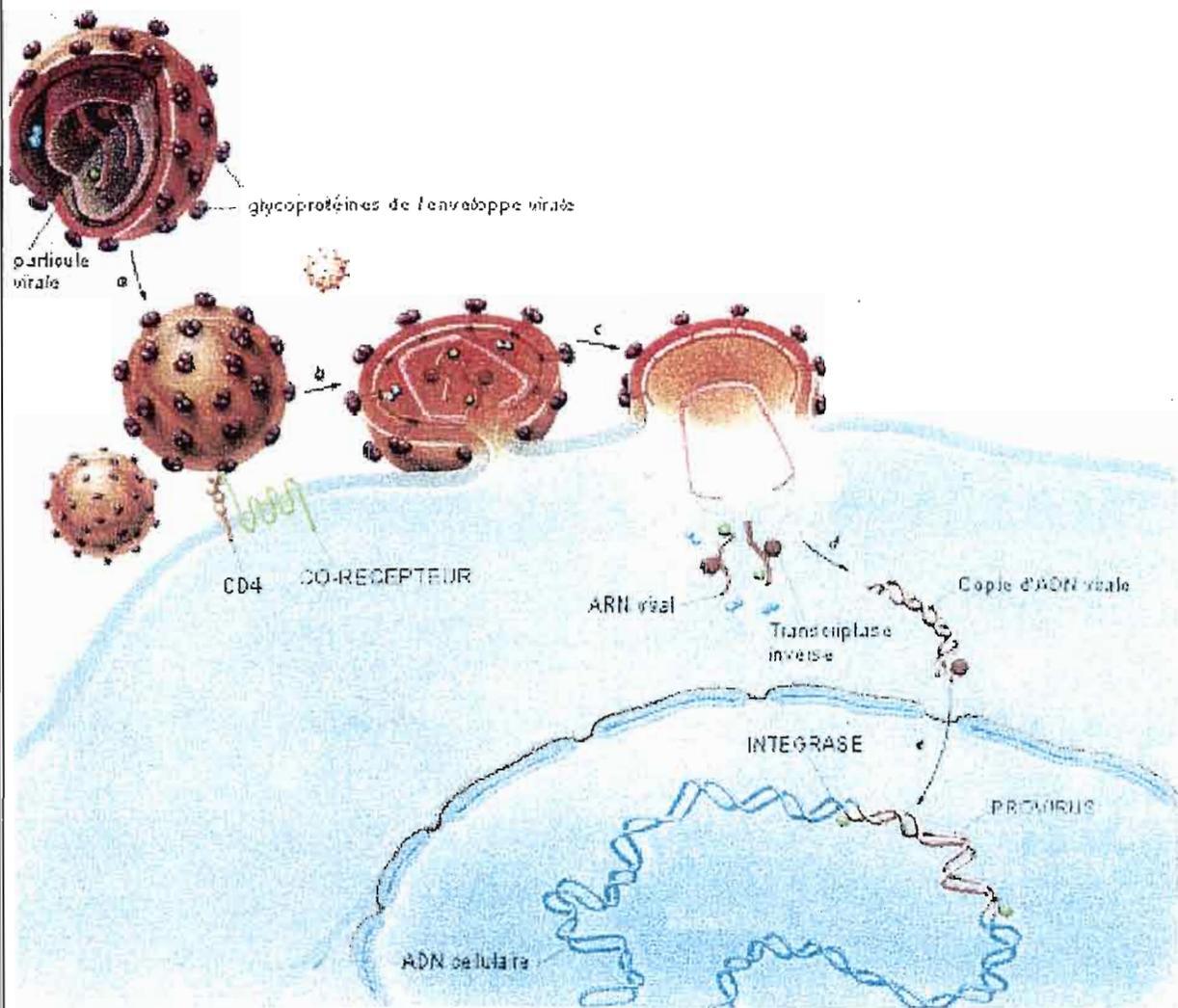
La région variable V2 de la gp120 a aussi été décrite comme un déterminant du tropisme cellulaire du VIH-1 (Westervelt et Coll., 1992; Koito et Coll., 1994). En effet, des mutations dans un locus hypervariable de la région V2 entraîne une conversion du phénotype NSI en un phénotype SI (Groenink et Coll., 1993).

Il a aussi été souligné que des facteurs présents au niveau de la membrane des virions tels que les molécules d’adhésion capable de se fixer sur leurs partenaires au niveau de la surface cellulaire, pourraient moduler l’infection des cellules de manière dépendante du type cellulaire (Gomez et Hildreth, 1995).

Les principales cibles cellulaires de l’infection par le VIH chez l’homme sont les lymphocytes T CD4⁺ et les monocytes/macrophages (Gottlieb et Coll., 1981).

Bien que l’expression de la molécule CD4 soit faible sur les cellules dendritiques (Hart

Figure 12. Schéma des interactions menant à la fusion de l'enveloppe virale du VIH avec la membrane cellulaire et la formation du provirus intégré (d'après Bartlett and Moore, 1998).



et McKenzie., 1988; Patterson et Coll., 1990), différentes équipes ont montré que ces cellules ainsi que les cellules de Langerhans de la peau qui leur sont apparentées sont infectables par le VIH (Armstrong et Horne., 1984; Patterson et Knight., 1987; Knight et Coll., 1990). Ces cellules localisées près de la surface des muqueuses, ont été proposées comme étant un réservoir viral majeur jouant un rôle important dans la pathogénèse du SIDA.

De nombreux autres types cellulaires, infectables de façon moins importante par le VIH sont également connus: les cellules B (Montagnier et Coll., 1984), les cellules NK (Chehimi et Coll., 1991), les précurseurs des cellules hématopoïétiques (Folks et Coll., 1988), les cellules épithéliales de l'intestin (Nelson et Coll., 1988), les fibroblastes (Taneto et Coll., 1989), les hépatocytes (Cao et Coll., 1991), les cellules trophoblastiques, les astrocytes (Kohleisen et Coll., 1992) et les lymphocytes TCD8⁺ (De Maria et Coll., 1991)

La multiplicité des cellules cibles du VIH (comme décrit ci-dessus) souligne la difficulté d'éradiquer le VIH. Elle pourrait également expliquer les multiples altérations fonctionnelles rencontrées au cours des infections à VIH : neuropathies, pancréatites, etc.

1.4.1.3: Pénétration du VIH dans les cellules

I.4.1.3.1: Fusion

Comme la plupart des virus possédant une enveloppe, le VIH entre dans les cellules par un mécanisme de fusion entre la membrane cellulaire et la bicouche lipidique des virions après leur attachement à la surface des cellules (Figure 12). L'attachement ainsi que la fusion sont réalisés par les glycoprotéines d'enveloppe de la particule virale. Pour des virus tels que le virus influenza, les pointes « spikes » (projections à l'extérieur de la surface de la cellule ou molécules d'hémagglutinines dans ce cas) se fixent sur des résidus acides sialiques présents à la surface de la cellule. Les virus fixés sont ensuite internalisés dans les endosomes, où l'augmentation de l'acidité induit un changement conformationnel des molécules d'hémagglutinines (Yu et Coll., 1994). De telles modifications structurales exposent un court domaine hydrophobe ou domaine de fusion (localisé en N-terminal de la TM) qui pénètre dans la membrane des endosomes et initie le processus de fusion (Bullough et Coll., 1994). Pour le VIH, il n'y aurait pas la nécessité d'un pH acide (Stein et Coll., 1987; McClure et Coll., 1988) le virus fusionnerait directement à la surface de la cellule. Par microscopie électronique il a été montré que le VIH pénètre dans les cellules par fusion membranaire (Stein et Coll., 1987). La fixation des glycoprotéines du virus au CD4 induirait un changement conformationnel au niveau de la gp120 (Clements et Coll., 1991; Sattentau et Moore, 1991; Sattentau et Coll., 1993), probablement de la gp41 (Sattentau et Coll., 1995) et

du CD4 (Bachelder et Coll., 1995). Ainsi le VIH a une double dépendance pour le CD4 (l'attachement et le changement conformationnel pour l'entrée dans les cellules). Pour certain ceci explique pourquoi les variants viraux qui infectent les cellules de manière CD4-indépendante sont rares. L'infection des cellules par le VIH de manière CD4-indépendante est généralement inefficace (Vesanen et Coll. 1991; Weber et Coll., 1989).

L'analyse par comparaison de séquence a permis de mettre en évidence dans la partie N-terminale de la gp41 une région hydrophobe (aa 517 à 532) qui présente des homologies de séquence avec les domaines fusiogènes des paramyxovirus (Gallaher, 1987; Gonzalez-Scarano et Coll., 1987; White, 1990). Plusieurs études ont montré que le domaine fusiogène (aa 517 à 532) de la gp41 joue un rôle très important dans l'infection et la formation de *syncytia* (Steimer et Coll., 1991a; Bergeron et Coll., 1992; Slepushkin et Coll., 1993). Certains auteurs ont suggéré la présence d'un récepteur cellulaire pour la gp41 (Quershi et Coll., 1990; Von Briesen et Coll., 1990).

Différentes équipes ont montré que la maturation de la gp160 en gp120 et gp41 est nécessaire à l'infection et la formation de *syncytia* (McCurre et Coll., 1988; Fenouillet et Coll., 1993). L'inhibition de l'infection et de la formation de *syncytia* à l'aide de peptides de la gp41 (aa, 558 - 678 et 643 - 678) sont en faveur de cette hypothèse (Wild et Coll., 1993; Vanini et Coll., 1993; Chen et Coll., 1993; Chen, 1994). D'autres régions de la gp41 sont impliquées dans la fusion. En effet, des études par mutagenèse dirigée ont montré que le domaine intracytoplasmique ainsi que les sucres de la gp41 jouent un rôle très important dans l'infection et la formation de *syncytia* (Dedera et Coll., 1992; Lee et Coll., 1992; Freed et Coll., 1992; Fenouillet et Coll., 1993).

Récemment, Santos et Coll. (1998) ont démontré l'existence d'un modèle de fusion à deux étapes. La première étape serait une fixation de la gp120 sur le CD4 et les co-récepteurs qui entraînerait plusieurs modification au niveau de la gp41 (oligomérisation, formation du domaine super-enroulé et projection du domaine de fusion au niveau de la membrane cellulaire). La deuxième étape serait un deuxième changement conformationnel de la gp41 entraînant l'insertion du domaine super-enroulé et de la séquence aa 579-601 de l'ectodomaine de la gp41 dans la bicouche lipidique de la cellule, résultant en la formation d'un pore de fusion. Ces expériences ont été obtenues uniquement avec des molécules de gp41 monomériques, suggérant que seules ces dernières sont incorporées dans la membrane.

Des molécules accessoires pourraient jouer un rôle crucial pour l'attachement des cellules qui expriment peu de molécules de CD4, ainsi le virus resterait attaché à la cellule jusqu'à la rencontre d'une molécule de CD4, si on considère que le CD4 est un facteur

limitant pour qu'il y ait infection.

En effet, l'expression de la molécule CD4 humaine à la surface des cellules murines est insuffisante pour rendre ces cellules permissives à l'infection par le VIH, alors qu'elle permet la fixation du virus à leur surface (Maddon et Coll., 1986). Ces mêmes cellules sont capables de répliquer le virus quand elles sont transfectées par l'ADN proviral ou infectées en présence de polyéthylène glycol. Le blocage se fait par conséquent au niveau de l'entrée du virus (Levy et Coll., 1986; Chesebro et Coll., 1990; Clapham et Coll., 1991). Il a été rapporté que des hétérocaryons cellule murine/cellule humaine mais non pas cellule murine/cellule simienne sont infectables par le VIH (Dragic et Coll., 1992), ceci avait suggéré qu'une ou plusieurs molécules accessoires étaient nécessaires à la fusion. Broder et Coll. (1993), ont montré que la (ou les) molécule(s) accessoire(s) et le CD4 doivent être exprimées par la même cellule pour que la fusion ait lieu. Plusieurs molécules ont été proposées. En effet, des Acm anti-LFA1 inhibent la formation de *syncytia* (Hildreth et Orentas, 1989; Pantaleo et Coll., 1991) tout comme les Acm anti-TL2 (Hattori et Coll., 1989; Kido et Coll., 1990). Enfin une protéine de 44 kDa peut interagir avec la gp41 (Quershi et Coll., 1990; Lazaro et Coll., 1994), il a été proposé que cette molécule pourrait être une molécule du CMH de classe I (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) (Moore et Coll. 1993b ; Lazaro et Coll. 1994). Plusieurs études ont impliqué les molécules HLA de classe I, dans l'infection par le VIH (Corbeau et Coll., 1991).

Plusieurs équipes ont montré que la fusion virus-cellule et cellule-cellule est proportionnelle à la densité de la molécule CD4 exprimée à la surface des cellules cibles (Asjö et Coll., 1987; Koga et Coll., 1990). Kabat et Coll. (1994) ont également montré que l'infection par des isolats primaires est proportionnelle au taux d'expression de CD4 mais montrent que ceci est différent pour les isolats viraux de laboratoire. Enfin, Hillman et Coll. (1990) ont rapporté que des mutants de la lignée CEM qui expriment une faible quantité de CD4 à leur surface font des *syncytia* en quantité comparable à celle observées avec la lignée CEM parentale. Ces différences peuvent s'expliquer par une sensibilité à l'effet cytopathogène différente selon le type cellulaire utilisé. En effet différents types de cellules transfectées par le CD4 montrent des sensibilités différentes à la fois à l'effet cytopathogène et à l'infection par le VIH (Chaffee et Coll., 1988; Clapham et Coll., 1991). Des facteurs présents au niveau de la membrane des virions tels que les molécules d'adhésion capables de se fixer sur leurs partenaires au niveau de la surface cellulaire, pourraient moduler l'infection des cellules de manière dépendante du type cellulaire (Gomez et Hildreth, 1995).

I.4.1.3.2: Transmission cellule à cellule

Outre l'infection des cellules par des particules virales libres ("infection *de novo*"), le VIH peut être transmis par contact entre deux cellules (Phillips., 1994). Des études par microscopie ont permis de définir deux modes de transmission cellule à cellule. Le premier est visible au microscope photonique et consiste en une interaction entre une cellule infectée et une cellule non infectée suivie de la fusion des deux membranes cellulaires "formation de *syncytia*". Le deuxième observé en microscopie électronique implique un contact entre les deux cellules sans qu'il y ait de fusion "transmission cellule à cellule par adhésion". Les mécanismes moléculaires à l'origine de ces deux modes de transmission du VIH ne sont pas encore élucidés. L'interaction gp120-CD4 serait nécessaire (le sCD4, des anticorps anti-CD4 des Acm anti-gp120 inhibent la formation de *syncytia*) mais pas suffisante (les Acm anti-LFA inhibent la formation de *syncytia*) pour que deux cellules fusionnent entre elles (Pantaleo et Coll., 1991; Golding et Coll., 1992). La transmission par adhésion serait indépendante de l'interaction gp120-CD4, puisque ni le sCD4 ni les Acm anti-CD4 ni les Acm anti-gp120 n'inhibent ce mode de transmission (Gupta et Coll., 1989., Phillips et Coll., 1992).

Il est intéressant de noter que *in vitro* la transmission cellule à cellule du VIH est 100 à 1000 fois plus importante que "l'infection *de novo*" dans la propagation du VIH (Dimotrov et Coll., 1993).

I.4.2: La rétrotranscription

La rétrotranscription qui consiste en la synthèse d'ADN viral double brin à partir de l'ARN simple brin du virion est l'une des premières étapes du cycle viral (Figure 13).

La rétrotranscription est donc une phase essentielle qui passe par la formation d'un hybride ARN-ADN, puis d'un ADN double brin circulaire. Ces événements sont possibles grâce à l'activité ADN polymérase et RNase H de la transcriptase inverse.

Après l'entrée du virus dans la cellule, on observe une décapsidation partielle qui libère les deux molécules d'ARN génomique. La rétrotranscription est initiée par la liaison de 18 nucléotides de l'extrémité 3' d'un ARNt-Lys3 avec une séquence complémentaire, PBS pour « Primer Binding Site », située à l'extrémité 5' du génome viral (Ratner et Coll., 1985). Cet ARNt-Lys3 est présent dans les virions matures (Jiang et Coll., 1993) et l'interaction avec le PBS fait intervenir les protéines de la nucléocapside (Barat et Coll., 1993). Le transfert des brins négatifs et positifs est également effectué par la transcriptase inverse et requiert son activité RNase H (Luo et Coll., 1990; Peliska et Benkovic, 1992; Tanese et Coll., 1991).

La transcriptase inverse ne possède pas d'activité de correction exonucléase 3'→5'

(Roberts et Coll., 1988). En effet, plusieurs études ont montré que la rétrotranscription était une source de mutations pour le virus (Roberts et Coll., 1988; Preston et Coll., 1988) et pourrait rendre compte de la grande variabilité du virus (Alizon et Coll., 1986; Saag et Coll., 1988). Ces mutations correspondent à des substitutions, des décalages du cadre de lecture (ou « frameshifts »: incorporation ou délétion d'une base) et des délétions. D'autres mécanismes peuvent avoir lieu lors de la rétrotranscription tels que la recombinaison entre les deux molécules d'ARN présentes dans le virion (Luo et Coll., 1990). Cette particularité constituerait un avantage sélectif permettant la réparation des molécules d'ARN défectives (Temin, 1993).

Il a été rapporté que la rétrotranscription pouvait débuter dans la particule virale libre, mais qu'une rétrotranscription complète nécessite une infection des cellules ainsi qu'une décapsidation de la particule virale (Borrito-Esoda et Boone, 1991; Lori et Coll., 1992; Trono, 1992). L'importance de ce phénomène n'est pas encore bien élucidé, mais il pourrait jouer un rôle important sur l'efficacité de la transmission du VIH (Zhang et Coll., 1994). La rétrotranscription serait inefficace dans des cellules quiescentes, suggérant que des facteurs cellulaires sont indispensables pour cette étape (Zack et Coll., 1990).

1.4.3: Adressage nucléaire et intégration

Lorsque la synthèse de l'ADN proviral est terminée dans le cytoplasme, il se forme un complexe nucléoprotéique de pré-intégration qui migre rapidement dans le noyau (Burkrinsky et Coll., 1992) (Figure 8 et 11). Ce transport s'effectue de manière active grâce aux séquences de localisation nucléaire de la protéine de la matrice p17 et de la protéine virale Vpr (Heinzinger et Coll., 1994), par interaction avec les protéines cellulaires intervenant dans le transport nucléaire.

On retrouve également l'intégrase dans ce complexe de pré-intégration (Varmus et Swanstrom, 1985). Il a été montré qu'elle était suffisante pour réaliser l'intégration de l'ADN proviral dans les chromosomes cellulaires (Bushman et Coll., 1990; Katz et Coll., 1990). La réaction d'intégration, qui nécessite l'intégrase et les deux extrémités de l'ADN viral (Craigie et Fujiwara, 1990), peut être décomposée en trois étapes successives :

- ✓ Clivage de deux nucléotides situés à chacune des extrémités 3' du génome viral. Ce clivage est réalisé par l'intégrase grâce à la reconnaissance de nucléotides présents à chaque extrémité des LTR (La Fémina et Coll., 1991; Sherman et Coll., 1992; Vink et Coll., 1991).
- ✓ Clivage de l'ADN cellulaire: cette étape implique une liaison de l'intégrase à l'ADN

cellulaire; plusieurs études ont montré que ce site de fixation n'est pas choisi au hasard et nécessite la reconnaissance de séquences nucléotidiques (Hong et Coll., 1993; Engelman et Coll., 1994). Scott et Griffith (1994) ont montré que les provirus se retrouvaient intégrés préférentiellement au voisinage de séquences transposables présentes dans le génome humain; ces régions pourraient en fait être plus accessibles à l'intégrase.

- ✓ Ligation des extrémités du génome proviral aux extrémités du génome cellulaire. Une dernière étape de réparation des extrémités libres du site d'intégration est effectuée par des enzymes cellulaires (Katz et Skalka, 1994).

Il a été montré la présence dans les cellules infectées de formes circulaires du génome viral non intégrées contenant un ou deux LTR complets, provenant respectivement d'une recombinaison ou d'un autointégration du génome linéaire. Ces événements pourraient intervenir dans la régulation de la réplication virale en limitant le nombre de copies intégrées, puisque l'intégration est essentielle pour une expression efficace des gènes viraux (Adachi et Coll., 1991; Sakai et Coll., 1993).

1.4.4: Expression des gènes du VIH

Comme pour tous les lentivirus l'expression des gènes du VIH répond à un schéma plus classique et débute par la transcription de l'ADN proviral en ARN messagers. Les protéines de structures et de régulation sont synthétisées sous la forme de précurseurs inactifs qui subiront des étapes variables de maturation: clivage, modifications traductionnelles et post-traductionnelles. Une fois mures, les protéines de structure s'assemblent et s'associent à l'ARN génomique pour former des virions qui vont bourgeonner à la surface de la cellule hôte avant d'être excrétés.

1.4.4.1: Le promoteur viral

Le génome à ARN d'un rétrovirus contient des séquences non codantes R U5 en 5' et U3 R en 3' où R représente une longue séquence répétée aux deux extrémités. Lors de la synthèse de l'ARN viral, ces séquences sont modifiées pour former des LTR "Long Terminal Repeat" ou longue répétition terminale. Chaque LTR contient trois régions U3, R et U5 (de 5' vers 3'). Les LTR 5' et 3' contiennent des éléments nécessaires au déroulement de plusieurs étapes du cycle viral dont les séquences d'initiation (séquences PBS pour "primer Binding site") et d'élongation (séquence PPT pour "PolyPurine Tract") de la rétrotranscription. Les séquences nécessaires à l'intégration se retrouve également dans les séquences U3 du LTR 5' et U5 du

LTR 3'. Tous les éléments promoteurs et "enhancer" responsables de la transcription des gènes viraux se sont situés dans les régions U3 et R. De plus, cet ARN rétroviral possède une coiffe en 5' et une queue de polyadénylate en 3'.

1.4.4.2: Les protéines de régulation

Les protéines de régulation sont de potentiels régulateurs positifs de l'expression des gènes. Ces protéines virales sont au nombre de deux, Tat et Rev.

I.4.4.2.1: Tat

Le gène Tat code pour une protéine de 16 kDa composée de 86 aa (Gaynor, 1995), essentielle pour l'expression des gènes viraux (Sodroski et Coll., 1985). Le domaine d'activation de la protéine Tat est constitué par les résidus 2 à 11 acides et riches en proline, les résidus 22 à 37 riches en cystéine et capable de lier le cadmium et le zinc, les résidus 37 à 48 qui forment le coeur de la protéine « core ». Les résidus 48 à 57 sont des résidus basiques riches en arginine responsable du ciblage vers le noyau et le nucléole, et de la liaison au LTR du VIH. Les résidus 57 à 72 augmentent l'activité de Tat et les résidus 72 à 86 contiennent des séquences importantes pour lier Tat à la fibronectine (Kuppuswamy et Coll., 1989).

Tat agit en trans en se liant sur les nucléotides +19 à +44 de la région R du LTR du VIH (Rosen et Coll., 1985). Cette région capable de former une structure en épingle à cheveux est située à l'extrémité 5' de tous les ARNm viraux et est nommée TAR (pour Tat-response element). Certaines équipes ont montré que la protéine Tat pouvait agir de manière TAR-indépendante dans différents types cellulaires (Taylor et Coll., 1994a). Plusieurs études ont suggéré l'existence d'une interaction de la protéine Tat avec les facteurs de transcription tels NF- κ B et Sp1 (Huang et Jeang., 1993; Taylor et Coll., 1994b).

Outre son rôle dans la transactivation du promoteur du VIH, la protéine Tat joue probablement un rôle très important dans la physiopathologie de l'infection à VIH. En effet, des souris transgéniques exprimant la protéine Tat développent des lésions cutanées de type Sarcome de Kaposi (Vogel et Coll., 1988). La protéine Tat est aussi capable d'induire la production de facteurs de croissance ou de cytokines comme le TGF- β (Kekow et Coll., 1990) et le TNF- α (Buonaguro et Coll., 1992), ce qui pourrait être à l'origine de la transformation tumorale des cellules épithéliales. Par sa capacité à induire l'expression de l'interleukine (l'IL-2) (Weistendorp et Coll., 1994), Tat pourrait avoir un effet sur la propagation de l'infection et sur le dysfonctionnement des lymphocytes TCD4⁺ observés chez les patients atteints du SIDA. La protéine Tat augmenterait l'expression et la fonctionnalité de la protéine

tyrosine kinase P125FAK dans les cellules neuronales PC12 (Milani et Coll., 1998).

I.4.4.2.2: Rev

La régulation post-transcriptionnelle des gènes viraux est sous le contrôle du produit du gène rev (Sodroski et Coll., 1986b). La protéine Rev est une phosphoprotéine de 13 KDa et de 114 aa (Hope et Pomeranz., 1995). Trois domaines importants ont pu être déterminés au sein de la protéine Rev:

- Une région riche en arginine (aa 35 à 50), impliquée dans la localisation nucléaire et dans la fixation à l'ARN (Malim et Coll., 1989; Venkatesh et Coll., 1990; Hope et Coll., 1990; Malim et Cullen., 1991; Zapp et Coll., 1991; Böhnlein et Coll., 1991).
- Une région riche en leucine (aa 73 à 83) qui a été définie comme étant un domaine d'activation (Malim et Coll., 1989; Malim et Coll., 1991).

L'action de la protéine Rev nécessite sa fixation à une séquence cible au niveau des ARNm appelée RRE (pour Rev Response Element), localisée dans le gène de l'enveloppe (Olsen et Coll., 1990; Heaphy et Coll., 1990). Rev interagit avec la séquence RRE par son domaine riche en arginine nécessaire à la localisation nucléaire de Rev (Hope et Coll., 1990; Hammerschmidt et Coll., 1994).

La protéine Rev effectue le transport des ARN non épissés ou monoépissés, afin de permettre leur traduction (Emmerman et Coll., 1989; Malim et Coll., 1990; Felber et Coll., 1989).

Le domaine riche en leucine de Rev est important pour l'oligomérisation, et la liaison à l'élément RRE pour l'interaction avec des protéines cellulaires (Olsen et Coll., 1990).

Un des rôles de la protéine Nef est de réguler négativement l'expression membranaire du récepteur CD4 *in vivo* et *in vitro* (Mariani et Skowronski., 1993; Skowronski et Coll., 1993). Cette fonction est encore mal comprise mais par ce mécanisme la protéine pourrait perturber le processus d'activation CD4-dépendant dans les lymphocytes infectés. La régulation négative nécessite le domaine cytoplasmique du CD4 (Garcia et Coll., 1993; Anderson et Coll., 1994) et s'effectue avant l'expression du CD4 à la surface des cellules (Brady et Coll., 1993).

I.4.4.2.3: Les protéines accessoires (Vif, Vpu, Vpr et Vpx, Nef)

Les protéines accessoires ne sont pas indispensables pour la réplication du virus dans les tissus en culture, mais semblent avoir d'importants rôles *in vivo*.

◆ Vif

Vif est une protéine de 23 kDa et possède 192 aa. Elle est localisée dans les cellules infectées soit dans le cytoplasme soit associée par son extrémité N-terminale myristilée à la membrane cytoplasmique (Lee et Coll., 1986). On trouve environ 10 molécules Vif dans chaque virion. Vif joue un rôle dans les cellules infectées en altérant la structure de la particule virale afin d'augmenter sa capacité infectieuse spécifique. En effet, Strebler et collaborateurs (1987) ont montré qu'un virus muté dans le gène vif garde sa capacité à se répliquer dans les lignées T, mais que les particules virales sont 1000 fois moins infectieuses, et que la transmission de l'infection par contact cellule à cellule n'est pas affectée.

◆ Vpu

Vpu est présent chez le VIH-1 et le VIS mais pas chez le VIH-2 (Jabbar, 1995). Vpu est une protéine de 18 KDa avec 81 aa, homo-oligomérique et membranaire. Les 27aa de la partie N-terminale sont hydrophobes et servent à l'ancrage dans la bicouche lipidique. Le reste de la protéine est dans la bicouche lipidique et comporte deux hélices α séparées par un domaine acide.

La première fonction de Vpu est de réaliser la régulation négative du CD4. Cette activité nécessite la phosphorylation des sérines 32 et 56 de Vpu, et est réalisée par la liaison de Vpu à la queue C-terminale cytoplasmique du CD4 (Vincent et Coll., 1993). En conséquence, il y a moins de CD4 disponibles pour l'interaction avec la protéine précurseur d'enveloppe gp160 dans le réticulum endoplasmique, ceci promouvant la transformation des protéines d'enveloppe et leur transport à la surface de la cellule. La protéine vpu est capable d'induire la dégradation de la molécule CD4 dans le réticulum endoplasmique, ce qui inhibe la formation de complexes gp120-CD4, et permet l'expression des glycoprotéines d'enveloppe à la surface des cellules (Willey et Coll., 1992a; Willey et Coll., 1992b).

La seconde fonction de Vpu fait augmenter la libération des particules virales de la membrane plasmique. Cette activité est réalisée partiellement par le domaine d'ancrage de Vpu qui forme un canal ionique (Schubert et Coll., 1996). En effet, des mutations dans le gène vpu montre une accumulation des particules virales dans le cytoplasme des cellules infectées, à l'intérieur des vacuoles, ainsi que des particules agrégées qui restent accrochées à

la membrane plasmique (Klimkait et Coll., 1990).

◆ **Vpr et Vpx**

Le gène Vpr (pour Viral protein R) est retrouvé chez le VIH-1 et le VIH-2 et la plupart des VIS (Jabbar, 1995), alors que le gène Vpx (pour Viral protein X) se trouve uniquement dans le VIH-2 et le VIS provenant de macaques mandrilles (VISmac) et des singes verts d'Afrique (VISagm) (Levy et Coll., 1995; Kappes, 1995). Les protéines Vpr et Vpx ont 27 à 35 % d'homologie en termes de séquence en aa.

Vpr est une protéine de 16 KDa et qui possède 96 à 105 aa alors que Vpx est une protéine de 16 KDa avec 111 à 112 aa. Vpr et Vpx ont tous deux une hélice amphipatique à la moitié N-terminale de la molécule. Les résidus 60 à 80 de la protéine Vpr du VIH-1 sont riches en leucine et semblent être importants dans l'interaction avec les protéines cellulaires (Zhao et Coll., 1994). Vpr est originellement une protéine nucléaire (Lu et Coll., 1993), ceci est due à la présence dans sa partie C-terminale d'une séquence riche en arginine qui lui assure une localisation nucléaire. Par son association avec la Pr55Gag elle réalise le transport du complexe de préintégration du cytoplasme vers le noyau (Heinzinger et Coll., 1994).

Vpx est à l'origine une protéine cytoplasmique dont les fonctions ne sont pas encore bien définies. Vpx et Vpr sont empaquetées dans le virion dans les mêmes proportions que les protéines Gag (Cohen et Coll., 1990), propriété inhabituelle pour une protéine de régulation. L'hélice amphipatique de Vpr est importante pour l'incorporation du virion (Mahalingam et Coll., 1995; Wu et Coll., 1995). La protéine Vpr du VIH-1 inhibe la prolifération cellulaire ce qui se traduit par un arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Rogel et Coll., 1995; Macreadie et Coll., 1995).

◆ **Nef**

Le gène Nef (pour negative factor) se trouve dans toutes les espèces de VIH et VIS (Ratner et Niederman., 1995) et code pour une protéine myristilée de 27 KDa et qui possède 206 aa. Cette myristilation permet son association à la membrane cytoplasmique des cellules infectées. (Franchini et Coll., 1986; Guy et Coll., 1990), on la retrouve également en faible quantité dans le noyau. Plusieurs études ont montré un effet négatif de Nef sur la réplication et la transcription des gènes viraux (Ahmad et Venkatesan., 1988 ; Cheng-Mayer et Coll., 1989; Kim et Coll., 1989).

Une activité reconnue de Nef est de réguler négativement l'expression membranaire du récepteur CD4 à partir de la surface cellulaire (Salghetti et Coll., 1995). Les résidus de la

queue C-terminale du CD4 sont requis pour cette activité et comprennent des résidus qui interagissent avec la tyrosine kinase, Lck. Il n'est pas clair que l'effet de Nef soit directement ou indirectement lié à son interaction avec le CD4 ou la protéine kinase Lck (Ratner et Niederman., 1995; Greenway et Coll., 1995).

Nef a la capacité d'altérer l'activation des cellules T (Ratner et Niederman., 1995; Greenway et Coll., 1995).

Un des rôles de la protéine Nef est sa capacité à perturber l'infection virale et/ou la réplication. La forme la plus probable d'activité est un effet positif de Nef sur l'infection virale des cellules T quiescentes (Miller et Coll., 1995). Roméro et Coll., 1998 ont montré récemment une inhibition de l'activation de Erk après stimulation directe des protéines G. Cet effet inhibiteur serait réalisé par la voie d'activation de Erk indépendante de la protéine kinase C (PKC).

Il est intéressant, de noter que des souris transgéniques Nef développent les signes cliniques du SIDA (lymphadénopathie, splénomégalie) liés à une forte déplétion des lymphocytes TCD4⁺ et CD4⁺/CD8⁺ (Liederman et Coll., 1994).

En conclusion, on peut noter que la complexité du génome du VIH -1 et la stratégie du virus à se répliquer le pourvoit d'une interaction hautement adaptative avec l'hôte. La nature prédisposée de la transcriptase inverse à faire des erreurs et sa haute fréquence de recombinaison durant la réplication génèrent des mutations à des taux accélérés (Coffin, 1995). Ceci entraîne une grande gamme de quasi-espèces de virus permettant la sélection du meilleur descendant de virus pour échapper aux restrictions immunes et thérapeutiques. La complexité du virus, permet aussi plusieurs possibilités pour le développement antiviral, et les applications en synergie de traitements, détruisant des cibles distinctes.

1.4.5: Assemblage, maturation et bourgeonnement de la particule virale:

Les dernières étapes du cycle viral concernent l'assemblage des différents composants du virion, la libération et la maturation de la particule virale (Figure 14). Ces étapes font intervenir les différentes protéines de structure (Gag) et accessoires (Vif, Vpr, et Vpu) du virus, ainsi que les séquences nécessaires à l'encapsidation de l'ARN génomique viral. La régulation de ces différentes étapes n'est pas encore élucidée, mais l'étude de virus mutés a permis de mettre en évidence les événements importants (Cann et Karn., 1989).

Le signal d'encapsidation est situé entre le premier site donneur d'épissage (dans la région U5 du LTR 5) et le premier codon (ATG) de la protéine Gag. Cette séquence, délétée

dans les ARNm viraux, forme une structure secondaire nécessaire pour l'interaction avec la protéine p9 de la nucléocapside (Lever et Coll., 1989; Aldovini et Young, 1990; Rizvi et Panganiban, 1993).

Les précurseurs des protéines de structure, p55 gag et p160 gag-pol, s'accumulent au niveau de la face interne de la membrane cytoplasmique de la cellule, et s'ancrent dans celle-ci par l'intermédiaire de la région N-terminale myristilée (Gelderblom et Coll., 1987; Gottlinger et Coll., 1989). L'ARN génomique viral s'associe alors à la région C-terminale du précurseur gag et on observe une accumulation des glycoprotéines d'enveloppe gp120-gp41. Une particule virale immature est alors libérée, contenant deux copies de l'ARN génomique et deux ARNt-lys3 nécessaires pour la rétrotranscription.

La dimérisation des précurseurs gag-pol permet l'activation de la protéase virale qui effectue un clivage des précurseurs p55 gag. On obtient alors une particule virale mature et infectieuse.

I.4.6: Pathogénèse de l'infection par le VIH

I.4.6.1: Modes de transmission du VIH

Le SIDA est essentiellement une maladie sexuellement transmissible (MST) qui, comme certaines autres MST, peut se transmettre aussi par voie sanguine ou périnatale. La transmission des VIH est directe ou indirecte et se fait par trois voies: la transmission par voie sanguine, la transmission par voie sexuelle et la transmission par voie materno-foetale (Levy, 1993; Levy et Coll., 1994).

↳ La transmission par voie sexuelle :

Elle représente, par excellence, le mode direct de contagion. Le sperme et les sécrétions vaginales contiennent de nombreuses cellules immuno-compétentes porteuses des récepteurs du VIH. C'est pourquoi, ces sécrétions biologiques sont très facilement infectables par le VIH. La transmission sexuelle peut donc avoir lieu à l'occasion de n'importe quel rapport, qu'il soit génital, anal, oral (Borzy et Coll., 1988. Henin et Coll., 1993).

↳ Transmission par voie sanguine :

Toute effraction cutanée ou muqueuse mise en contact avec du sang ou un liquide biologique contaminé peut-être une porte d'entrée du virus. C'est le cas lors de blessures « iatrogènes » au moyen d'une aiguille hypodermique et d'instruments chirurgicaux, ou de

blessures « volontaires » (toxicomanie intraveineuse, tatouages et scarifications rituelles,...). C'est aussi le cas lors de transfusion de sang ou d'administration de dérivés sanguins (facteurs de coagulation) contaminés. Le titre infectieux du sang, est certainement fonction du stade de l'infection, et les risques de transmission augmentent lors de l'évolution de la maladie du sujet séropositif. La phase de primo-infection, constitue également une source importante de virus, puisque, bien que le sujet soit encore séronégatif, les charges virales cellulaire et plasmatique sont élevées, traduisant ainsi une répllication intense du VIH (Connor et Coll., 1993).

↳ Transmission par voie périnatale :

La transmission de la mère à l'enfant concerne environ 20% des cas. Elle peut se faire par voie transplacentaire, au moment de l'accouchement, voire lors de l'allaitement. Chez la mère séropositive pour le VIH, la contamination de l'enfant est toujours tardive, survenant pour 35 % dans les deux mois précédents la naissance et pour 65 % au moment du passage dans la voie génitale (Rouzioux et Coll., 1993; Matheson et Coll., 1995., Rogers, 1985).

Des études concernant la variation dans le génotype (particulièrement la boucle V3 de la gp120) et le phénotype des virus transmis, ont révélé qu'en général un nombre restreint de variants sont infectants (Wolinsky et Coll., 1992; Zhu et Coll., 1993). La majorité de ces virus sont des virus ayant un tropisme pour les macrophages (NSI) (Van't et Coll., 1994), mais les virus ayant un tropisme pour les lignées cellulaires T ont également été détectés très tôt après la transmission (Fiore et Coll., 1994).

1.4.6.2: Latence virale

Le VIH est un rétrovirus, ce qui "sous-entend" qu'après le processus de rétrotranscription, le provirus (copie ADN de l'ARN viral) doit s'intégrer dans le génome des cellules cibles pour se répliquer (Figure 12). Chun et Coll. (1997) ont étudié l'activité répllicative de l'ADN viral présent dans les lymphocytes périphériques ou les ganglions d'un petit nombre de patients infectés asymptomatiques. Ces études ont rapporté que le nombre de cellules portant de l'ADN virale est de 100 à 1000 fois supérieur à celui produisant du virus. Ceci suggérant, que le provirus peut persister dans les cellules cibles à l'état latent, c'est-à-dire sans exprimer les protéines virales.

En revanche, *in vivo*, la production de particules virales est un phénomène permanent comme en témoigne la détection constante de particules virales infectieuses circulantes aux différents stades de la maladie (Connor et Coll., 1993).

Ces considérations permettent d'établir la distinction fondamentale qui existe entre les

notions de latence définie virologiquement (absence de réplication) et de latence définie cliniquement (absence de symptomatologie). En effet, la période asymptomatique ou phase clinique silencieuse observée lors d'une infection par le VIH est le siège d'une intense activité répllicative.

I.4.7: Variabilité génétique du VIH

La variabilité génétique est une caractéristique majeure des rétrovirus. Les mécanismes moléculaires générant la diversité du VIH sont principalement liés aux « erreurs » de copie commise par la transcription inverse. Ceci se traduisant par une apparition de substitutions non corrigées, de réarrangements et de recombinaisons qui sont autant événements qui peuvent contribuer en théorie à la grande variabilité antigénique du virus (Wain-Hobson., 1992). Si on tient compte du taux de mutation du VIH qui a été chiffré à environ 3×10^{-5} mutations par nucléotide et ceci par cycle de réplication et du fait que 10 milliards de virus sont produits par jour avec un génome comprenant 10000 nucléotides, toutes les combinaisons peuvent être générées chez chaque patient en un seul jour. Le polymorphisme génétique et biologique des isolats provenant de différents prélèvements d'un même patient a été établi par le séquençage des virus isolés aux différents temps de l'infection. Ces différents virus isolés d'un même patient peuvent, par ailleurs, posséder des propriétés biologiques distinctes (Cheng-Mayer, 1990; Dormont et Le Grand., 1996). A cette diversité du VIH retrouvée au sein d'un individu, s'ajoute une large diversité entre les virus isolés de différents individus. Il est cependant possible de regrouper géographiquement, par leur propriétés sérologiques et génétiques, les isolats retrouvés au sein d'une même population.

Les séquences nucléotidiques du VIH-1 sont très hétérogènes, tout particulièrement au niveau du gène env. Les gènes gag et pol sont beaucoup plus conservés. Les isolats nord-américains et européens du VIH-1 divergent d'environ 7 % en moyenne au niveau des séquences nucléotidiques codant pour le gène env; les isolats africains divergent, quant à eux, d'environ 16 % (Myers et Coll., 1993).

Sur le plan épidémiologique, l'analyse phylogénétique des variants du VIH-1 permet de distinguer deux groupes: le groupe M (major) et O (outlier) (Figure 15).

L'analyse de l'ensemble des séquences connues en acides aminés du sommet de la boucle V3, a permis de dresser des arbres phylogénétiques et de classer les souches de VIH-1 en six sous-types notés de A à F (Myers et Coll., 1993). Les sous-types B sont majoritaires en

Europe et aux Etats-Unis d'Amérique (Myers et Coll., 1993), et les sous-types A et D sont rencontrés principalement en Afrique.

Récemment, Simon et Coll., (1998) ont rapporté l'existence d'un nouveau virus VIH-1 distinct du groupe M et O nommé YBF30 découvert au Cameroun.

I.4.8: Réponse immune contre le VIH

Au cours de l'infection de l'homme par le VIH, l'ensemble des effecteurs de l'immunité est sollicité dès les premiers stades de l'infection, et on peut supposer que leur relative efficacité permet l'installation d'une infection d'évolution chronique. En effet, après la phase aiguë de l'infection, s'installent une réponse anticorps parfois neutralisante, et une réponse cellulaire T cytotoxique, qui semblent précoces et durables. Les autres mécanismes immunitaires qui peuvent participer à la lutte contre les agents infectieux tels que les cellules tueuses naturelles, ou NK, et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, bien que moins souvent décrites, contribuent certainement à limiter la réplication massive du VIH dans l'organisme (Dormont et Le Grand., 1996). Deux types de réponses immunes seront développées dans ce chapitre:

I.4.8.1: Réponse immune humorale

Un grand nombre de travaux a permis d'identifier, sur la majorité des protéines de structure du VIH, des sites d'action des anticorps. Les premières données sur la réponse anticorps contre le VIH ont été obtenues vers le milieu des années 1980 (Allan et Coll., 1985; Robey et Coll., 1986). La gp120 semble être la cible privilégiée de la majorité des anticorps neutralisants au cours de l'infection naturelle (Robey et Coll., 1986; Javaherian et Coll., 1989, Steimer et Coll., 1991b). Cette reconnaissance préférentielle de la gp120 existe pour le VIH-1, et le VIH-2, ainsi que pour la souche simienne SIVmac.

Plusieurs études utilisant des gp120 natives et dénaturées ont montré que la majorité des anticorps présents dans le sérum de patients VIH⁺ étaient dirigés contre des épitopes conformationnels (site impliquant des acides aminés distants sur la séquence primaire de la molécule mais proche dans sa conformation native) (Ho et Coll., 1991a; Steimer et Coll., 1991b; Moore et Ho., 1993). En effet, depuis 1991 ont été obtenus et caractérisés différents anticorps monoclonaux humains anti-gp120 présentant une activité neutralisante de large spectre. La plupart d'entre eux inhibe l'interaction gp120-CD4 *in vitro* (Ho et Coll., 1991b; Posner et Coll., 1993; Thali et Coll., 1992; McKeating et Coll., 1992), indiquant que le site de liaison de la gp120 au CD4 est un épitope conformationnel. Il est intéressant d'observer que,

malgré la grande variabilité du gène d'enveloppe du VIH-1, les acides aminés constituant cet épitope conformationnel sont conservés quel que soit l'isolat. De plus, ces acides aminés sont conservés pratiquement à la même position dans l'enveloppe du VIH-2. Le domaine C4 de la gp120 a été montré comme particulièrement antigénique dans la mesure où il est reconnu par les sérums d'individus VIH⁺ (Moore et Coll., 1993c). L'analyse de l'activité neutralisante des sérums provenant de patients infectés montrent que les anticorps neutralisants acquis *in vivo* sont non seulement dirigés contre le site de liaison au CD4 mais aussi contre la boucle V3 (Chamat et Coll., 1992; Javaherian et Coll., 1989). En effet, différents travaux ont montré que des anticorps neutralisants dirigés contre la V3 pouvaient être induits après immunisation d'animaux par la gp120 ou par des peptides de la boucle V3 (Matthews et Coll., 1986; Putney et Coll., 1986; Robey et Coll., 1986; Goudsmit et Coll., 1988; Rusche et Coll., 1988). Le site au niveau de la V3 reconnu par ces anticorps est constitué par un ensemble d'épitopes linéaires (Putney et Coll., 1986; Rusche et Coll., 1988). Javaherian et Coll. (1989) en immunisant des animaux à l'aide d'un trimère (GPGRF) de l'hexapeptide présent au sommet de la boucle V3 ont obtenus des anticorps neutralisants. La région GPGR présente au sommet de la boucle V3 est appelée PND ("principal neutralizing domain") ou site principal de neutralisation (Figure 16). Bien qu'un certain nombre d'études semblent indiquer que d'autres régions de gp120, notamment la boucle V2 seraient inductrices d'anticorps neutralisants (Fung et Coll., 1992; McKeating et Coll., 1993; Moore et Coll., 1993b; Sullivan et Coll., 1993; Warrier et Coll., 1994; Shotton et Coll., 1995), il apparaît clairement que les deux régions décrites précédemment induisent la très grande majorité des anticorps neutralisants.

Plusieurs cibles pour les anticorps neutralisants ont été révélés au niveau de la glycoprotéine gp41. L'un de ces sites est localisé dans la partie N-terminale de la gp41 (aa 503-532) (Chanh et Coll., 1986; Ho et Coll., 1987). Un anticorps monoclonal humain neutralisant, le 2F5 est dirigé contre la séquence ELDKWA présente dans le domaine externe de la gp41 (Conley et Coll., 1994) (Figure 17). Un domaine très immunogène ou PAD ("principal antigenic domain") a été révélé au niveau de la gp41, elle correspond à la séquence en acides aminés 570-613.

1.4.8.2: Réponse immunitaire cellulaire

En général, le développement d'une réponse anticorps contre des antigènes protéiques nécessite la participation des cellules T auxiliaires de phénotype CD4⁺. La réponse auxiliaire, dépendante des cellules T CD4⁺, peut être subdivisée en deux catégories de lymphocytes T fonctionnellement distincts appelés T-helper-cell 1 (Th1) et T-helper-cell 2 (Th2). Ces deux

sous-populations de lymphocytes T CD4 ont été clonées chez la souris comme chez l'homme et sont identifiables non par des marqueurs phénotypiques mais par les cytokines qu'elles produisent (Clerici et Shearer, 1994). Ainsi, les cellules de type Th1, produiraient spécifiquement les cytokines IL-2, IFN- γ , TNF, IL-12 et l'IL-15 et permettraient une réponse immune cellulaire. En revanche les cellules de type Th2, produiraient les cytokines IL-4, IL-5, IL-10 et l'IL-13 et seraient responsables de la maturation des lymphocytes B, et orienteraient vers la réponse anticorps (Figure 18 A). Plusieurs facteurs influent sur la réponse des cellules Th dans leur différenciation vers une réponse de type Th1 ou Th2.

Le SIDA est caractérisé par une altération profonde du système immunitaire, portant essentiellement mais non exclusivement sur le nombre et les fonctions de lymphocytes TCD4⁺ auxiliaires. Une des conséquences immunologiques d'une infection par le VIH est une perte de la fonction Th chez les individus asymptomatiques, bien avant le déclin observé dans la quantité de cellules TCD4⁺. Cet effet peut être détecté *in vitro* par la perte de la prolifération des cellules T et la réduction de la production d'IL-2 et d'IFN- γ (Clerici et Coll., 1989; Giorgi et Coll., 1987; Shearer et Coll., 1986; Lane et Coll., 1985). En outre, les individus asymptomatiques montrent une activation des cellules B de manière évidente, une augmentation de certaines classes d'immunoglobuline (Lucey et Coll., 1990; Mildvan et Coll., 1982) et une hyperéosinophilie (Smith et Coll., 1994; Fleury-Feith et Coll., 1992). Ces observations suggèrent que la dérégulation de la réponse immune dépendante des cellules T se produirait avant la chute du taux de cellules TCD4⁺, et pourrait contribuer à leur déplétion. L'augmentation du taux d'IL-4 et d'IL-10 dans les PBMC de patients VIH⁺ et SIDA en culture (Clerici et Shearer, 1993; Clerici et Berzofski., 1994) suggère que le dysfonctionnement immunitaire observé serait associé à une infection par le VIH et entraînerait une commutation d'une réponse cellulaire dominante (Th1) vers une réponse anticorps dominante (Th2), avec un changement du profil des cytokines (Clerici et Shearer 1993; Clerici et Coll., 1993a; Meyaard et Coll., 1994; Barcellini et Coll., 1994) (Figure 18 B). Cependant, des résultats contradictoires ont été observés par différentes autres équipes quant à cette commutation de réponse de type Th1 vers le type Th2 (Maggi et Coll., 1994; Graziosi et Coll., 1994). Néanmoins des études récentes indiquent que les cellules TCD8⁺ peuvent produire des cytokines de type Th2 qui peuvent contribuer au changement du profil de cytokines conduisant à la perte de l'immunité cellulaire (Maggi et Coll., 1994; Erard et Coll., 1993).

L'activation chronique du système immunitaire pendant l'infection à VIH est associée à

l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 et l'IL-6. Ces cytokines, en majorité produites par les monocytes/macrophages, sont responsables de manifestations cliniques, comme la fièvre et la cachexie (Lathey et Coll., 1994), et de la réplication virale (Poli et Fauci, 1993). L'IL-6 intervient dans l'infection à VIH par activation polyclonale des lymphocytes B (Nakajima et Coll., 1989), avec parfois une sécrétion d'autoanticorps et une augmentation de l'expression des récepteurs, dont le CD4. Le TNF- α intervient indirectement sur la réplication virale à travers des protéines cytoplasmiques qui sont des « DNA binding proteins » agissant sur le facteur de transcription NF-kB qui active le LTR (Durum et Coll., 1991).

Plusieurs études ont montré que des taux d'IL-2 et d'IFN- γ étaient plus élevés chez les sujets séropositifs que chez les sujets au stade SIDA alors que les taux d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6 et d'IL-10 étaient plus faibles chez les sujets séropositifs comparés aux malades en phase SIDA (Clerici et Scheerer., 1993; Clerici et Coll., 1993a; Clerici et Berzofski, 1994; Clerici et Scheerer., 1994; Barcellini et Coll., 1994; Elghazali et Coll., 1993; Romagnani., 1992; Chollet-Martin et Coll., 1994). Le taux d'IL-4 et d'IL-10 augmentent progressivement pendant la période de séroconversion alors que les taux d'IL-12 et d'IFN- γ diminuent. L'IL-4 atteint un maximum puis décroît au fur et à mesure de la progression de la maladie alors que les taux d'IL-10 restent encore très élevés (Clerici et Scheerer., 1993; Elghazali et Coll., 1993). On note également que l'IL-12, cytokine jouant un rôle important dans la fonction Th est retrouvée à un taux réduit chez les patients VIH positifs (Chehimi et Coll., 1994). De plus, une addition d'IL-12 peut restaurer la fonction immune cellulaire, incluant l'activité des cellules tueuses naturelles (Natural Killer ou NK), la production d'IFN- γ et la prolifération des cellules T (Chehimi et Coll., 1994; Clerici et Coll., 1993a). Un parallélisme entre la perte de production d'IL-12 et une augmentation de la production d'IL-10 a également été noté. En fait, l'expression du VIH et sa réplication dans l'hôte est sous le contrôle du réseau de cytokine endogène aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* en connexion directe avec les autres mécanismes de la modulation du virus comme Tat/TAR et rev/RRE.

Les cytokines jouent un rôle clé dans la régulation de la réponse immune. Au cours de l'infection virale, certaines quoique régulant la réponse immune humorale et cellulaire peuvent promouvoir la réplication virale, répandre l'infection, ou entraîner une évasion à la réponse immune de l'hôte (Fust et Coll., 1995; Bentwich et Coll., 1995).

Il est important de distinguer la réponse immune cellulaire dépendante des cellules TCD4⁺, et celle favorisant la réponse cellulaire cytolytique dépendante des cellules TCD8⁺.

(réponse CTL pour cytotoxic T-lymphocyte). Ces dernières sont connues pour contribuer, dans une large part, à l'activité antivirale en tuant les cellules infectées. Au cours de l'infection de l'homme par le VIH, le rôle protecteur des CTL est suggéré par leur contribution probable à la réduction de la charge virale au moment de la primo-infection, juste après le pic de réplication du virus. En effet, la chute du nombre de particules virales circulantes chez les patients infectés par le VIH est concomitante de l'apparition d'une activité cytolytique anti-Gag, anti-Pol et anti-Env, dès la troisième semaine suivant l'infection. Cette réponse CTL possède la particularité d'être extrêmement forte et persistante tout au long de la phase asymptomatique. Cependant certains auteurs ont des arguments expérimentaux ou théoriques permettant de penser que la réponse CTL peut participer directement ou indirectement aux mécanismes immunopathologiques (Zinkernagel et Hengartner, 1994).

I.5: Conclusion

La complexité du cycle biologique du virus et de sa régulation, la nature des voies possibles d'infection ainsi que la variabilité génétique intrinsèque du VIH montre sa capacité d'adaptation à l'environnement cellulaire.

On peut constater que le VIH-1 est capable, grâce à son extraordinaire variabilité, de contourner toutes les parades du système immunitaire jusqu'à épuisement de ce dernier.

Le fait qu'une même souche virale puisse utiliser plusieurs co-récepteurs, qui n'ont pratiquement aucun motif conservé dans leurs parties extracellulaires, comme par exemple CCR5 et CXCR4, est difficile à concilier avec une vision stéréo-spécifique de l'interaction gp120/co-récepteur. Il faudrait imaginer pour cela que la gp120 possède plusieurs sites de reconnaissance pour les co-récepteurs ou bien que ceux-ci ont, par coïncidence, une conformation commune qui n'est pas partagée par d'autres récepteurs de chimiokines pourtant proches.

On pourrait envisager que la fonction de co-récepteur du VIH dépende de la possibilité d'interagir avec la gp120, mais aussi d'autres propriétés qui restent à définir.

OBJECTIFS GENERAUX ET SPECIFIQUES DE LA RECHERCHE

Etude des interactions entre les structures conservées de la gp120 du VIH-1 et les cellules cibles

↳ Les objectifs généraux de cette recherche sont de mieux comprendre le rôle des structures conservées de l'enveloppe du VIH dans les mécanismes de fixation de la SU gp120 de l'enveloppe à la surface des cellules cibles et les mécanismes intervenant dans les premières étapes de l'infection virale. Etudier les conséquences fonctionnelles de ces interactions sur la physiopathologie induite par le VIH.

↳ Les objectifs spécifiques :

Les objectifs de cette thèse étaient d'une part de déterminer des zones et éventuellement des acides aminés impliqués directement ou indirectement dans les interactions entre la SU gp120 de l'enveloppe du VIH-1 et le récepteur CD4 ou entre la gp120 et les seconds récepteurs (le CXCR4 dans le cadre de cette thèse). D'autre part, d'étudier les réponses cellulaires induites par les interactions entre la Suggp120 et le co-récepteur du VIH, le CXCR4.

CHAPITRE II

Délétion de la première structure conservée en hélice α de la gp120 du VIH-1 IIIB: mise en évidence des interactions dissociées de la gp120 avec le CD4 et le CXCR4.

Manuscript n°1 : Publié dans Journal of Virology

Résumé

Dans cette publication, nous avons décrit une délétion comprenant les acides aminés E91-S115 de la SU gp120 (provenant de la souche virale T-tropicque HXB2). Cette région correspond à une structure en hélice alpha amphipatique localisée dans une région hautement conservée en N-terminal (C1) de la SUGp120 du VIH-1 (Gallagher et Coll., 1995 ; Hansen et Coll., 1996). Cette gp120 délétée de α HX1 (gp120 $\Delta\alpha$ HX1) a permis de démontrer que l' α HX1 participe directement ou indirectement à la fixation de la gp120 sur le récepteur CD4 (Missé et Coll., 1998). La gp120 $\Delta\alpha$ HX1 est capable de se fixer sur le récepteur CXCR4 indépendamment d'une fixation sur le récepteur CD4. L'anticorps monoclonal 110-K dirigé contre la région contenant le « CD4 binding site » ne reconnaît plus cette gp120 délétée, alors que ce même anticorps reconnaît fortement la gp120 sauvage. Cette gp120 $\Delta\alpha$ HX1, se fixe, non seulement sur des cellules CD4⁺, avec une affinité inférieure à celle de la gp120 sauvage, mais aussi sur des cellules CD4⁻ exprimant le récepteur CXCR4 (CHO-K1 CXCR4⁺/CD4⁻). De plus, la gp120 $\Delta\alpha$ HX1 ne se fixe pas sur des cellules CHO-K1 CXCR4⁻/CD4⁻. La spécificité de la fixation de la gp120 $\Delta\alpha$ HX1 sur le CXCR4 a été également démontrée par des expériences d'inhibition de la fixation : (i) du ligand naturel du CXCR4, Stromal derived factor-1 alpha (SDF1 α), (Bleul et Coll., 1996 ; Oberlin et Coll., 1996) et (ii) de l'anticorps monoclonal 12G5 dirigé contre le CXCR4 (Endres et Coll., 1996). La délétion de l' α HX1 de l'enveloppe gp160 exprimée à la surface des cellules HeLa-Tat abolit toute fusion avec les cellules HeLa P4 CD4⁺ LTR LacZ. En outre, 1000 à 2000 foyers de fusion sont observés dans les mêmes conditions avec l'enveloppe gp160 sauvage. Le mutant gp120 $\Delta\alpha$ HX1 est capable d'inhiber l'infection des cellules HeLa P4 à une IC50 proche de celle obtenue avec la gp120 sauvage. Cet ensemble de résultats suggèrent : (i) que la délétion de l' α HX1 a pu entraîner un repliement incorrect de la protéine aboutissant à une modification de la conformation du « CD4 binding site » nécessaire à la fixation de la gp120, ou (ii) que certains acides aminés présents au niveau de cette α HX1 sont directement impliqués dans cette fixation et appartiennent ainsi à la région de fixation au récepteur CD4.

Dissociation of the CD4 and CXCR4 Binding Properties of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 by Deletion of the First Putative Alpha-Helical Conserved Structure

DOROTHÉE MISSÉ,^{1,2} MARTINE CERUTTI,² ISABELLE SCHMIDT,² ALINE JANSEN,¹
GÉRARD DEVAUCHELLE,² FRANZ JANSEN,¹ AND FRANCISCO VEAS^{1,2*}

Laboratoire d'Immunologie Rétrovirale, Institut Français de Recherches pour le Développement en Coopération, 34032 Montpellier,¹ and Centre National de la Recherche Scientifique, URA 2209, INRA, 30380 Saint Christol les Alès,² France

F_AB* 14879/2

Received 12 March 1998/Accepted 28 May 1998

To evaluate conserved structures of the surface gp120 subunit (SU) of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope in gp120-cell interactions, we designed and produced an HIV-1 IIIB (HXB2R) gp120 carrying a deletion of amino acids E61 to S85. This sequence corresponds to a highly conserved predicted amphipathic alpha-helical structure located in the gp120 C1 region. The resultant soluble mutant with a deleted alpha helix 1 (gp120 ΔαHX1) exhibited a strong interaction with CXCR4, although CD4 binding was undetectable. The former interaction was specific since it inhibited the binding of the anti-CXCR4 monoclonal antibody (12G5), as well as SDF1α, the natural ligand of CXCR4. Additionally, the mutant gp120 was able to bind to CXCR4⁺/CD4⁻ cells but not to CXCR4⁻/CD4⁻ cells. Although efficiently expressed on cell surface, HIV envelope harboring the deleted gp120 ΔαHX1 associated with wild-type transmembrane gp41 was unable to induce cell-to-cell fusion with HeLa CD4⁺ cells. Nevertheless, the soluble gp120 ΔαHX1 efficiently inhibited a single round of HIV-1 LAI infection in HeLa P4 cells, with a 50% inhibitory concentration of 100 nM. Our data demonstrate that interaction with the CXCR4 coreceptor was maintained in a SUGp120 HIV envelope lacking αHX1. Moreover, in the absence of CD4 binding, the interaction of gp120 ΔαHX1 with CXCR4 was sufficient to inhibit HIV-1 infection.

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is the etiologic agent of AIDS (3, 33, 52). HIV-1 infection of target cells (monocytes or lymphocytes) is mediated by the viral envelope glycoproteins gp120 and gp41, with gp120 binding primarily to the CD4 receptor (20, 40, 45) with high affinity (44). Deletions and point mutations in gp120 have contributed to the identification of different sites which participate in the association with CD4 (5, 41, 44, 50, 61) and have defined amino acid W432 within the fourth constant (C4) region as being critical in this respect (18). Binding of gp120 to CD4 induces conformational changes in the HIV-1 envelope glycoproteins that are postulated to promote subsequent steps in virus entry (54, 55).

Recently, several members of the seven membrane-spanning chemokine receptor family have been identified as fusogenic coreceptors for HIV-1, HIV-2, and simian immunodeficiency virus (SIV) (1, 15, 23, 24, 28, 30, 38). Distinct tropisms of various HIV strains have been shown to result from their targeting of different chemokine receptors (1, 15, 24, 26, 28, 30), and studies with recombinant HIV-1 envelopes have indicated that the V3 loop of the HIV-1 gp120 protein is central to macrophage tropism and syncytium formation or fusion in CD4⁺ lymphocytes cultures (11–14, 17, 39). The CXCR4 (fusin) chemokine receptor functions as a coreceptor of T-cell-tropic or T-cell-line-adapted HIV-1 strains (26, 30, 42). It has been proposed that a CD4-induced change in gp120 conformation is necessary for correct HIV binding to chemokine

receptors (60, 64), resulting in a trimolecular association between CXCR4 and the gp120/CD4 complex (43, 63).

Structural studies of monomeric and oligomeric forms of gp120 would further our understanding of the interactions between the virus and target cells. The lack of an X-ray crystallographic model of gp120 has resulted in the development of structure-function studies of this protein by different approaches, including computer algorithms, biochemical, mutagenic, and antibody binding analyses (25, 32, 34, 48, 65). These models have provided information about the existence of several beta-strands and five or six highly conserved alpha-helix (αHX) structures among gp120 proteins from different strains of HIV-1 (34). Furthermore, these αHX structures are widely conserved among different members of the retrovirus family including HIV-2, SIV, human T-cell leukemia virus type 1, visna virus, equine infectious anemia virus, bovine leukemia virus, and Rous sarcoma virus (32). Low-stringency antibody screening of a combinatorial peptide library has confirmed that the C1 domain of gp120 contains an αHX (αHX1) (58). This αHX1 is the largest of the αHX structures of gp120 and may be located at the interface between adjacent gp120 molecules in the oligomeric complex, since antibodies directed against this region can bind to monomeric gp120 but do not interact with the native oligomeric protein (48).

In the present study, we introduced a deletion in the surface gp120 subunit (SUGp120) of the HIV-1 IIIB (HXB2) envelope, between amino acids E61 and S85, corresponding to the sequence of the predicted αHX1 structure (34, 58). The resulting gp120 ΔαHX1 mutant envelope did not bind CD4 and had dramatically decreased fusion ability but maintained both the capacity to bind the CXCR4 chemokine receptor and inhibit HIV-1 infection. This may provide the basis for designing

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire d'Immunologie Rétrovirale, Institut Français de Recherches pour le Développement en Coopération, 911 Av. Agropolis, 34032 Montpellier, France. Phone: 33 4 67 61 64 31. Fax: 33 4 67 52 83 80. E-mail: veas@mpl.orstom.fr.

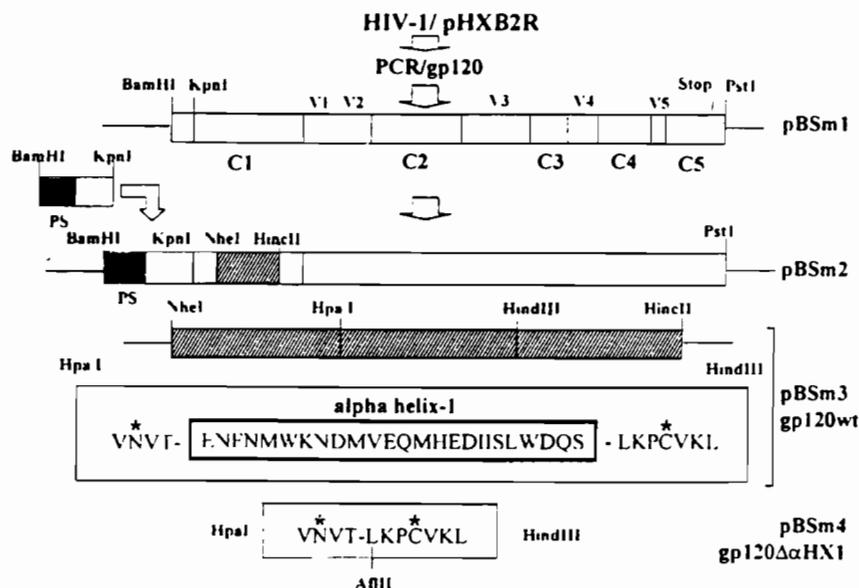


FIG 1 Schematic structure of HIV-1 gp120 depicting the step-by-step procedure used to delete the amphipathic α HX1 structure within the C1 region of gp120. The signal peptide (ps), conserved regions (C1 to C5), and variable regions (V1 to V5) are indicated. The different transition plasmids, from pBSm1 to pBSm4, through which gp120 wt (pBSm3) and the deleted gp120 (pBSm4) construct were obtained are shown. Asterisks denote conservation of the N-glycosylation and cysteine sites flanking α HX1.

CXCR4-specific inhibitors that are CD4 independent in their action.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines, viruses, and antibodies. Cells lines were maintained at 37°C in a 5% CO₂ humid atmosphere. HeLa-P4 cells (16) stably expressing the *lacZ* gene under the control of the HIV-1 long terminal repeat (HeLa CD4 LTR *lacZ* cells) were a gift from P. Charneau (Pasteur Institute, Paris, France) and were grown in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Biomedix), 2 mM L-glutamine, penicillin, streptomycin, and 400 µg of Geneticin (G418) per ml. The HeLa Tat cell line (a gift from O. Schwartz, Pasteur Institute, Paris, France) was transfected to express the HIV-1 envelope and grown in complete DMEM with 2 mM methotrexate. The CEM CD4⁺ cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, Md) and grown in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. The CHO-K1 cell line, obtained from the American Type Culture Collection, and CHO-K1 cells transfected with a CXCR4 expression vector (a gift from Marc Parmentier, Euroscreen Co., Brussels, Belgium) were grown in Ham F12 medium (Life Technologies) supplemented with 10% FCS and 400 µg of G418 per ml. Plasmid pHXB2R is an HIV-1 IIIB-derived clone (obtained from the National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program, Bethesda, Md) HIV-1 LAI (obtained from Harvey Holmes, Medical Research Council, AIDS Reagent Project, NIBSC, United Kingdom) was grown in the CEM CD4⁺ and HeLa CD4 cell lines. The anti-CXCR4 monoclonal antibody (MAb) 12G5 (the kind gift of James Hoxie, University of Pennsylvania, Philadelphia) (29), reacts specifically with the human CXCR4 protein and recognizes a conformational epitope, probably located on the third extramembrane loop of the molecule (7). Samples of pooled HIV-immune immunoglobulin (HIV-Ig) (53) were obtained from the AIDS Reagent Repository, National Institutes of Health, Bethesda, Md. Sheep polyclonal antibody D7324 is an anti-gp120 antibody made against a peptide containing amino acids 497 to 511 of gp120 (Aalto BioReagents). The anti-gp120 110-4 MAb is directed against the GPGR sequence of the V3 loop (Genetic Systems), and the anti-gp120 110-K MAb is directed against the conformational epitope of the CD4 binding site (a gift from F. Traincard, Hybridolab). Rabbit anti-gp120 antiserum was made in our laboratory after immunization of a rabbit with a recombinant HIV-1IIIB gp120 purchased at Intracel Corp. The Anti-CD4 MAb Leu3a was purchased from Becton Dickinson (San Jose, Calif.). The anti-CD4 MAbs 13B8.2/1OKT4A and BL4.1/OKT4 were purchased at Immunotech S.A. (Marseille, France). Anti-CD4 MAb ST4.F101.69, anti-CD4 MAb ST40.F142.63, anti-CD4 MAb BF5, anti-CD100 MAb F93.7G2, and anti-CD5 MAb F145.GF3 were a gift from Sanofi Co. (Montpellier, France). The anti-CD4 MAb OKT4 was purchased from Ortho Diagnostic Systems, Inc. Anti-SDF1 α antibodies were purchased from R & D Systems.

Recombinant gp120. A 1.414-kb fragment encoding gp120 (from amino acids V12 to R481) was PCR amplified with plasmid pHXB2R as a template and the following two primers: sense primer (5' GCAGGATCCGGTACCTGTGTGGA

AGGAAGC3') and antisense primer (5' GCACTGCAGTTAGCGTTTCTCTC TCTGCACCACTC3'). The generated fragment contained a *Bam*HI site upstream of the gp120 *Kpn*I site (V12) and a stop codon at the end of the gp120 sequence followed by a *Pst*I site. The *Bam*HI-*Pst*I fragment was then cloned into a Bluescript (pBS) vector (Stratagene) in which the *Kpn*I site was eliminated by digestion with *Kpn*I followed by repair with T4 DNA polymerase and religation yielding the pBSm1 gp120 subclone. The sequence encoding the N-terminal of gp120 (T1 to G11) and a new signal peptide sequence, isolated from ecdysteroid glycosyltransferase gene of the baculovirus of *Autographa californica*, were added by using overlapping oligonucleotides and inserted into the *Bam*HI-*Kpn*I sites of pBSm1, giving pBSm2.

Two unique restriction sites flanking the α HX1 sequence were introduced by using oligonucleotides which changed codons V57-N58 and K91-L92 without altering their coding ability. The modification GTA→GTT at V57 and AAT→AAC at N58 and the modification AAA→AAG at K91 and TTA→CTT at L92, created *Hpa*I and *Hind*III sites, respectively. The sequence was then introduced into pBSm2, producing plasmid pBSm3. To delete the α HX1, the wild-type *Hpa*I-*Hind*III fragment was excised from plasmid pBSm3 and replaced by a mutated *Hpa*I-*Hind*III fragment. This fragment was reconstituted by using two overlapping oligonucleotides (5' AACGTGACACTTAAGCCATGTGTA3' and 5' AGCTTTACACATGGCTTAAGTGTACAGTT3'), and an *Afl*II site was also introduced in codon L86 by changing CTA to CTT to identify the mutated fragment, yielding plasmid pBSm4 (Fig. 1).

The *Bam*HI-*Pst*I fragment, including the entire coding sequence of gp120 was then excised from pBSm3 or pBSm4 and cloned into the *Bg*II-*Pst*I sites of the P10 baculovirus transfer vector p119P (49a). Sf9 cells were cotransfected with viral DNA purified from the modified baculovirus AcSLP10 (10) and DNA from the recombinant p119P gp120 vector. Recombinant baculoviruses were plaque purified by standard methods (59). Sf9 cells were infected at a density of 5 × 10⁵ cells/ml and at a multiplicity of infection of 5 PFU/cell. Supernatant was collected 6 days postinfection, and gp120 wt or gp120 Δ αHX1 was concentrated and immunopurified by chromatography with the anti-gp120 antibody D7324, linked on bromoacetyl-Sepharose. Proteins were separated on a sodium dodecyl sulfate-PhastGel gradient (4 to 15%) in a discontinuous buffer system (PhastSystem, Pharmacia). The resolved protein bands were electrophoretically transferred onto nitrocellulose. After saturation, the blots were incubated with the appropriate labeled antibodies.

The entire gp120 wt or gp120 Δ αHX1 sequences were cloned into the pCEL-E160 HIV-1 envelope expression vector under the control of the cytomegalovirus CMV promoter. pCEL/E160 (a kind gift of Y. Boublik and M. Sibon, Institut de Génétique Moléculaire, Montpellier, France) was derived from a previously described retroviral envelope expression vector (21, 22) by insertion of the HIV-1 LAI envelope (6). To obtain envelope expression with the desired gp120, the *Kpn*I-*Nhe*I fragment was inserted into the original corresponding sequence of pCEL/E160 by using a second *Nhe*I restriction site located upstream of the stop codon derived from either pBSm3 or pBSm4.



FIG 2. Tat transactivation of an HIV-1 LTR *lacZ* reporter gene after CD4 envelope-induced cell fusion. *lacZ* expression was assessed in HeLa P4 cells cocultured overnight with either HeLa Tat cells expressing the wild-type envelope (containing the gp120 wt) (A), HeLa Tat cells expressing the deleted α HX1 envelope (containing the gp120 $\Delta\alpha$ HX1) (B), or untransfected HeLa Tat cells (C). The cells were then fixed, and X-Gal staining was performed at 37°C for 2 h. The presence of a blue syncytium is indicated by an arrow.

Transient transfection and HIV-1 envelope-mediated cell fusion. At 24 h after being plated at a concentration of 8×10^5 /well in six-well flat-bottom plates, HeLa Tat cells (27) were transfected with 1 μ g of the pCEL/E160-expressing vector by using Lipofectamine reagent (Gibco Life Sciences, Grand Island, N.Y.) as recommended by the manufacturer. The ability of various envelope glycoproteins to induce fusion and syncytium formation was assessed upon coculture with HeLa P4 cells harboring CD4 and HIV-1 long terminal repeat-driven *lacZ* genes (16). After 24 h, confluent cocultures were washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with 0.5% glutaraldehyde for 10 min at room temperature, and washed twice with PBS. The cell monolayers were then stained by incubation with 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) solution for 2 h at 37°C and washed twice with PBS. Fusion events between HeLa P4 cells and effector cells expressing the HIV-1 envelope and Tat transactivator resulted in induction of the in situ expression of the *lacZ* reporter gene. For each envelope glycoprotein tested, the total number of blue-stained foci per well was counted and photomicrographs were obtained.

Flow cytometry analysis of envelope cell surface expression. The pCEL/E160 expression vector, carrying either wild-type SUGp120 (gp120 wt) or gp120 $\Delta\alpha$ HX1, was cotransfected into HeLa-Tat cells with the pMACS-Kk plasmid expressing a truncated mouse H-2K^b membrane molecule (Miltenyi Biotec Inc.) DNA transfection was carried out by particle bombardment delivery with a Biolistic PDS-1000/He apparatus (Bio-Rad) (31). Briefly, 3 mg of 1.6- μ m-diameter gold beads was coated with 2.5 μ g of the mixed DNA containing 0.5 μ g of pMACS-Kk and 2 μ g of pCEL/E160. After 24 h of culture, transfected cells were detached, washed, and incubated for 1 h at 4°C with 80 μ l of magnetic microbeads coated with anti-H-2K^b MAb. Cells expressing H-2K^b protein were positively selected with RS+ columns by separation on the Vario-MACS magnetic system as recommended by the manufacturer (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, Calif.). Selected cells were incubated for 1 h at 4°C with 100 μ g of a polyclonal human anti-HIV IgG (HIV-IgG) per ml. Subsequently, washed cells were stained with phycoerythrin (PE)-conjugated goat anti-human IgG (50 μ l of a 1/50 dilution [Immunotech S.A.]) for 1 h at 4°C. The cells were then washed three times in PBS-0.3% bovine serum albumin (BSA) before being subjected to flow cytometric analysis with a FACSort apparatus (Becton Dickinson).

Studies of binding of recombinant gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1 proteins to CEM and CHO cells. All binding experiments were performed with 2×10^5 CEM cells resuspended in 50 μ l of PBS-3% BSA containing the desired MAb at the appropriate concentration. After a 1-h incubation with agitation at 37°C, the cells were washed twice in PBS-0.3% BSA before addition of either an anti-mouse IgG-fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate (Sigma), an anti-human IgG-PE conjugate (Immunotech), an anti-human IgG-FITC conjugate (Immunotech), or a streptavidin-PE conjugate (SIGMA) at a 1/50 dilution.

After an additional 1 h of incubation with agitation at room temperature (RT), the cells were washed three times, resuspended in PBS, and analyzed by single color flow cytometry with a FACSort (Becton Dickinson) and LYSIS II software. Each datum point represents the acquisition of 10,000 gated events.

Binding of the anti-CD4 MAbs Leu3a, F101.69, 13B8.2, ST40, BL4, OKT4, and BF5 was also monitored following incubation of CEM cells with soluble gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 (10 μ g/ml) for 1 h at 37°C. The cells were then washed and stained with the appropriate anti-mouse IgG-specific FITC conjugate before being subjected to flow cytometric analysis as described above in the presence or absence of 0.02% sodium azide in the wash and antibody solutions. Various concentrations of soluble gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 in a volume of 50 μ l were evaluated for binding by incubating CEM cells in the presence of sodium azide for 1 h at 37°C with agitation. After two washes in PBS-0.3% BSA, the cells were stained with HIV-Ig (100 μ g/ml). Similarly, CHO-K1 CXCR4⁺/CD4⁻ and CHO-K1 CXCR4⁻/CD4⁻ cells were incubated for 4 h at 4°C with 2 μ g of gp120 proteins and with either 2, 10, or 30 μ g of gp120 proteins per ml, respectively.

The cells were then washed and stained with an anti-human IgG PE or FITC conjugate and processed for flow cytometric analysis as described above.

Inhibition of stroma-derived factor 1 alpha chemokine (SDF1 α) binding was assessed following incubation of CEM cells with various concentrations of gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1 for 1 h at 37°C in PBS-3% BSA. The cells were washed twice, and SDF1 α (10 μ g/ml) was then added in PBS-3% BSA for 30 min at 37°C. The cells were stained with a biotinylated goat polyclonal anti-human SDF1 α antibody in PBS-3% BSA-0.02% sodium azide for 30 min at RT. Streptavidin-PE conjugate was added for 30 min at RT in PBS-3% BSA-0.02% sodium azide, and the cells were analyzed by flow cytometry.

Inhibition of anti-CXCR4 MAb 12G5 binding was assessed after incubation of CEM and CHO-K1 cells with various concentrations of gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 or 10 μ g of SDF1 α per ml for 30 min at 37°C. The cells were washed twice, and CXCR4 accessibility was monitored by addition of anti-CXCR4 MAb 12G5 (10 μ g/ml) in the presence of 0.02% sodium azide for 1 h at 4°C. The cells were washed twice with PBS-0.3% BSA-0.02% sodium azide and stained with an anti-mouse IgG FITC-conjugated antibody in PBS-3% BSA-0.02% sodium azide before being subjected to flow cytometric analysis.

Cell-ELISA. U-shaped Maxisorb microtiter plates (Nunc) were saturated with PBS-3% BSA for 30 min at 37°C and incubated with 25 μ l of a 10- μ g/ml 1:1 mix of the anti-CD5 MAb (F145.6F3) and anti-CD100 (F93.7G2) for 16 h at 4°C. After being washed, 10^5 CEM cells were distributed in each well before centrifugation of the plate at 900 \times g for 5 min, further incubation for 30 min at 37°C, and two washes with 200 μ l of PBS-0.3% BSA per well. Quadruplicate wells

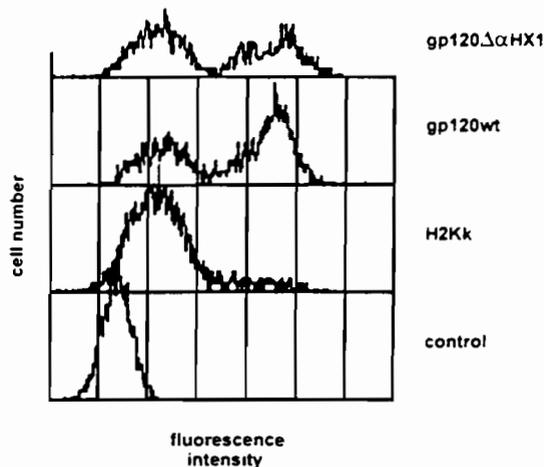


FIG 3. Cell surface expression of gp120 wt and deleted gp120 $\Delta\alpha$ HX1 envelopes. At 24 h after cotransfection with pMACS-Kk vector and gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 expression plasmids, HeLa Tat cells were incubated with an anti-HIV-1 polyclonal antiserum (HIV-Ig) and stained with an anti-human IgG-PE-conjugated antibody. Negative controls were cells transfected with pMACS-Kk (H2Kk) vector alone (stained with HIV-Ig and anti-human IgG-PE) and HeLa Tat cells cotransfected with wt envelope plasmid and pMACS-Kk vector but stained only with the secondary anti-human IgG-PE-conjugated antibody.

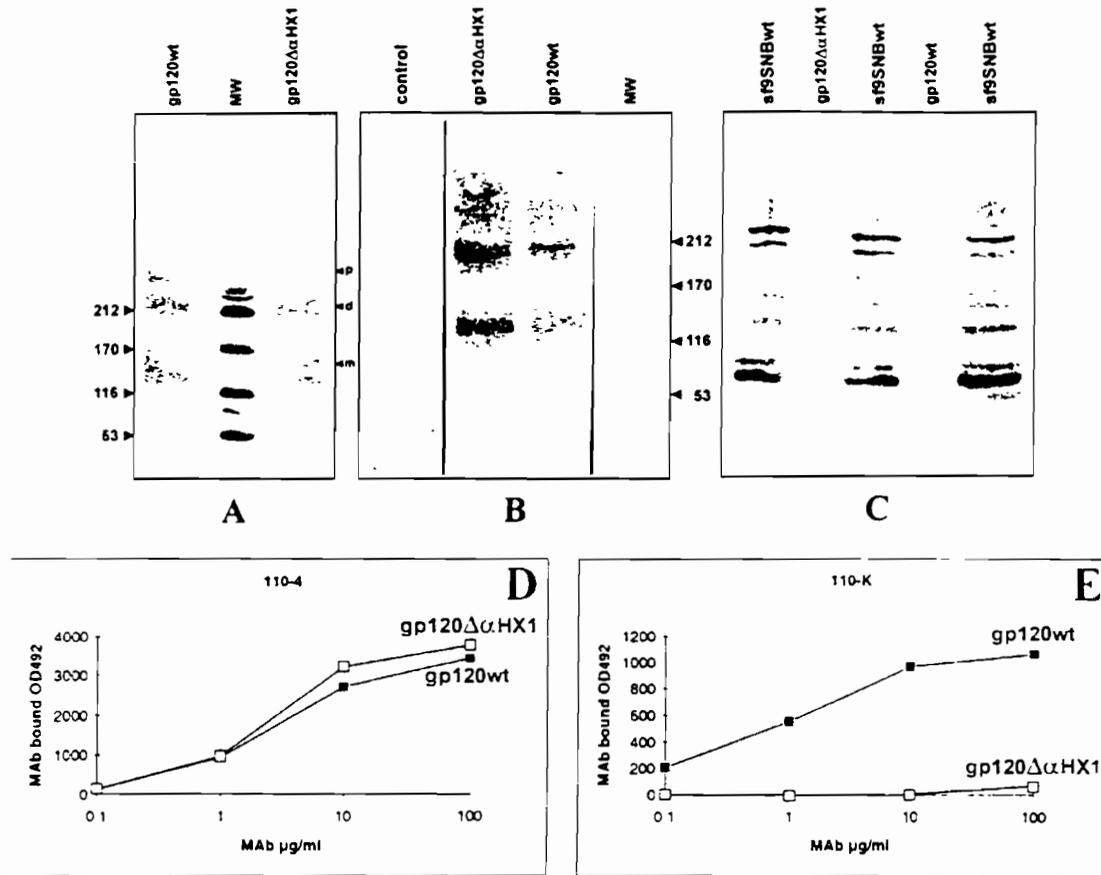


FIG 4 Recombinant gp120 proteins expressed from a baculovirus vector were resolved by gradient sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (4 to 15% polyacrylamide) (A to C). Proteins (4 μg) were stained with silver nitrate or transferred to a nitrocellulose membrane (A) and subsequently immunoblotted with rabbit anti-gp120 polyclonal antiserum (B) or rabbit polyclonal antiserum generated against supernatant of baculovirus wt infected SF9 cells (SF9SNBwt) (C). Lanes with gp120 wt, gp120 ΔαHX1, and SF9SNBwt supernatants are indicated, and molecular weight (MW) markers are shown in thousands. The positions of gp120 monomers (m), dimers (d), and polymers (p) are marked by arrows (D and E). The reactivities of various concentrations of anti-gp120 110-4 (D) and 110-K (E) MAbs with native gp120 wt (shaded squares) and gp120 ΔαHX1 (open squares) were assessed. All data are corrected for background antibody absorption in the absence of gp120 (usually <0.100 OD₄₉₂ unit).

were incubated with soluble gp120 proteins for 1 h at 37°C and washed twice in PBS-0.3% BSA. For CD4 inhibition experiments, the cells were further incubated for 30 min at 37°C with a 1/1,000 dilution of the anti-CD4 MAb F101.69. Alternatively, after incubation with gp120 proteins, SDF1α was added at 10 μg/ml for 30 min at 20°C and the wells were washed twice with PBS-0.3% BSA, incubated with a biotinylated anti-SDF1α goat antibody in PBS-3% BSA-0.02% sodium azide, and then visualized with a streptavidin-biotin-peroxidase complex at 20°C for 30 min. The optical density at 492 nm (OD₄₉₂) was measured on a Labsystem Multiscan RC spectrophotometer. The enzyme-linked immunosorbent assay (Cell-ELISA) plate included two internal standards with neither gp120 protein nor SDF1α, which served as a reference for the binding capacity of the anti-CD4 MAb F101.69 and the anti-SDF1α biotinylated goat antibodies, respectively. Experimental values were expressed as the percent inhibition of the corresponding reference values. The OD of the references varied between 1.0 and 2.0. Values obtained for wells without cells, saturated with PBS-3% BSA, indicated that nonspecific binding of the recombinant gp120 proteins was less than 5%.

Reactivities of MAbs with monomeric gp120. The reactivities of MAbs with native monomeric gp120 were determined as described previously (46, 47). Briefly, either gp120 wt or gp120 ΔαHX1 protein (1 μg/ml) was captured on Maxisorb ELISA plates via its carboxy terminus by using a sheep polyclonal antibody D7324 in the presence of PBS-10% FCS. Anti-gp120 110-K and 110-4 MAbs were bound onto gp120 proteins in PBS-3% BSA-20% sheep serum buffer. After two washes, bound murine MAbs were detected with an anti-mouse IgG-horseradish peroxidase conjugate and the OD₄₉₂ was measured.

Infectivity assay. Infections were performed 24 h after seeding 10⁴ HeLa P4 (CD4⁺ LTR-lacZ) cells (16) per well in 96-microtiter plates. The cells were then preincubated with gentle agitation in serum-free DMEM in the presence of various concentrations of soluble recombinant gp120 wt or gp120 ΔαHX1 for 1 h at 4°C and then continuously incubated for the next 24 h at 37°C with 50-50%

tissue culture infective doses (TCID₅₀) of HIV-1 LAI particles. Induction of β-galactosidase activity, the product of the HeLa P4 lacZ gene, reflects Tat transactivation and therefore HIV-1 infection. After 24 h, β-galactosidase activity was measured in cell lysates of quadruplicate wells. For this purpose, cells were lysed in 100 μl of a buffer containing 0.125% Nonidet P-40, 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 50 mM β-mercaptoethanol, 2.5 mM EDTA, 10 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 100 μl of 80 mM sodium phosphate (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, and 10 mM β-mercaptoethanol before addition of 6 mM chlorophenol red-β-galactopyranoside monosodium salt. The mixture was incubated for 30 min at 37°C, and the absorbance was measured at 574 nm.

RESULTS

Fusogenic abilities and cell surface expression of envelopes containing gp120 wt and gp120 ΔαHX1. The cell fusion assay was performed in cocultures of the HeLa P4 cell line, in which lacZ expression is under the control of the HIV-1 LTR, and HeLa Tat cells into which either wild-type or ΔαHX1 envelopes were transfected. Transfection with wild-type envelope yielded a large number of syncytia in which β-galactosidase was expressed (1,000 to 2,000 foci/well). In contrast, no foci were observed following transfection with the ΔαHX1 mutant envelope (Fig. 2) or with an ecotropic Friend murine leukemia virus envelope (21), which is fusogenic only for mouse and rat cells (data not shown).

To determine whether the lack of fusogenic ability of the

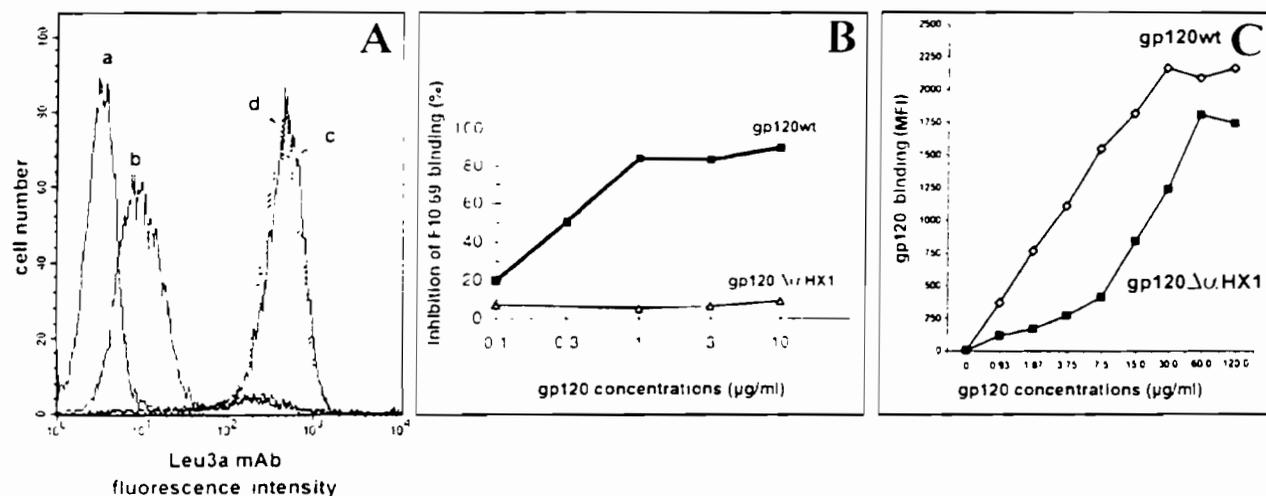


FIG. 5. Effect of gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1 on cell surface binding of the anti-CD4 MAb Leu3a and F101.69. (A) Binding by the anti-CD4 MAb Leu3a was assessed in CEM cells in the presence of 0.02% sodium azide by FACS analysis: curve a, incubation of CEM cells with a goat anti-mouse IgG-FITC conjugate (negative control); curve b, binding of the Leu3a anti-CD4 MAb after incubation with gp120 wt; curve c, binding of Leu3a after incubation with gp120 $\Delta\alpha$ HX1; curve d, total binding of Leu3a to CEM cells. (B) The effect of gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1 on F101.69 MAb binding was examined by Cell ELISA in the absence of sodium azide. Similar results were obtained in the presence of sodium azide (0.02%) (data not shown). (C) Direct binding of gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 was assessed following incubation with CEM cells for 1 h at 37°C in the presence of sodium azide (0.02%).

gp120 $\Delta\alpha$ HX1 envelope was due to altered cell surface envelope expression, we monitored the presence of gp120 levels at the surface of transfected HeLa Tat cells by flow cytometry. A unimodal population with low mean fluorescence intensity (MFI = 15.1) was observed following anti-HIV-IgG staining of HeLa Tat cells transfected with the control pMACS-Kk plasmid. However, HeLa Tat cells transfected with either wild-type or $\Delta\alpha$ HX1 HIV-1 envelope expression vectors demonstrated similar distributions of negative and positive populations. In both cases, the latter population was detected at an MFI of approximately 170 (Fig. 3).

Binding properties of soluble recombinant HIV-1 gp120 $\Delta\alpha$ HX1. Recombinant baculovirus gp120 proteins were concentrated and immunopurified as described in Materials and Methods. Silver nitrate staining of purified proteins on a non-reducing SDS-PAGE gel revealed two major bands corresponding to monomers and dimers of both soluble gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1, with a purity greater than 95% (Fig. 4A). Immunoblot analysis of the baculovirus-produced proteins with a polyclonal rabbit anti-gp120 antiserum confirmed the presence of gp120 monomeric and oligomeric forms (Fig. 4B). The purity of the gp120 proteins was demonstrated by the lack of reactivity with a rabbit antibody directed against supernatant from Sf9 cells infected with wild-type baculovirus (Fig. 4C).

We then examined the ability of the gp120 $\Delta\alpha$ HX1 protein to be recognized by the 110.4 and 110-K anti-gp120 MAbs, which react with the V3 loop and the C4 region through the conformational CD4bs epitope, respectively. We found that whereas the V3 loop was recognized equivalently in gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1 (Fig. 4D), the conformational CD4bs MAb was able to interact only with gp120 wt (Fig. 4E). The ability of soluble gp120 $\Delta\alpha$ HX1 to associate with CD4 was assessed by determining the binding level of the CD4-specific MAbs Leu3a and F101.69-PE, which interact with the CDR2 loop in the first D1 domain of CD4, after preincubation of the cells with gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 (10 μ g/ml). As demonstrated by fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis (Fig. 5A), gp120 wt inhibited more than 98% of Leu3a binding whereas gp120 $\Delta\alpha$ HX1 did not alter antibody binding (<5.6%). Similar re-

sults were obtained with the anti-CD4 F101.69-PE conjugate antibody (data not shown) and confirmed by the Cell-ELISA method (Fig. 5B). Furthermore, equivalent studies performed with various anti-CD4 MAbs, 13B8.2, ST40, BL4, OKT4, and BF5 directed against sites distinct from the CDR2 loop of D1 in CD4, showed that gp120 $\Delta\alpha$ HX1 did not interfere with the ability of any of these MAbs to bind CD4 (Table 1). Therefore, the gp120 $\Delta\alpha$ HX1 appeared unable to bind the CD4 receptor.

Since gp120 $\Delta\alpha$ HX1 did not appear to bind CD4, we next assessed whether the deleted gp120 was able to bind to the surface of CEM cells. FACS analysis was performed on cells incubated with gp120 proteins for 1 h at 37°C in the presence of sodium azide (0.02%) to prevent possible internalization of target receptors. Under these conditions, gp120 $\Delta\alpha$ HX1 bound to the cell surface of CEM cells in a dose-dependent manner, albeit at lower levels than gp120 wt (Fig. 5C). When the latter experiments were performed in the absence of sodium azide, no binding of gp120 $\Delta\alpha$ HX1 could be observed on CEM cells (data not shown). Interestingly, the absence of sodium azide did not alter the ability of gp120 wt to inhibit the binding of anti-CD4 MAbs (data not shown).

Since gp120 $\Delta\alpha$ HX1 bound to CEM cells, we determined whether association with the CXCR4-chemokine receptor might

TABLE 1. Effect of gp120 on anti-CD4 MAb binding^a

Antibody	MFI ^b after preincubation with		
	Medium	gp120 wt	gp120 $\Delta\alpha$ HX1
13B8.2	1054.78	73.13	940.74
ST40	416.00	87.73	360.16
BL4	489.38	93.40	418.96
OKT4	526.53	481.65	530.00
BF5	430.00	410.00	424.31

^a Binding of anti-CD4 MAbs directed against sites distinct from the CDR2 loop was assessed following a preincubation of CEM cells with medium alone, gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1.

^b All the anti-CD4 MAbs were detected with an FITC-labeled goat anti-mouse IgG, with the exception of the 13B8.2 MAb, which was PE conjugated.

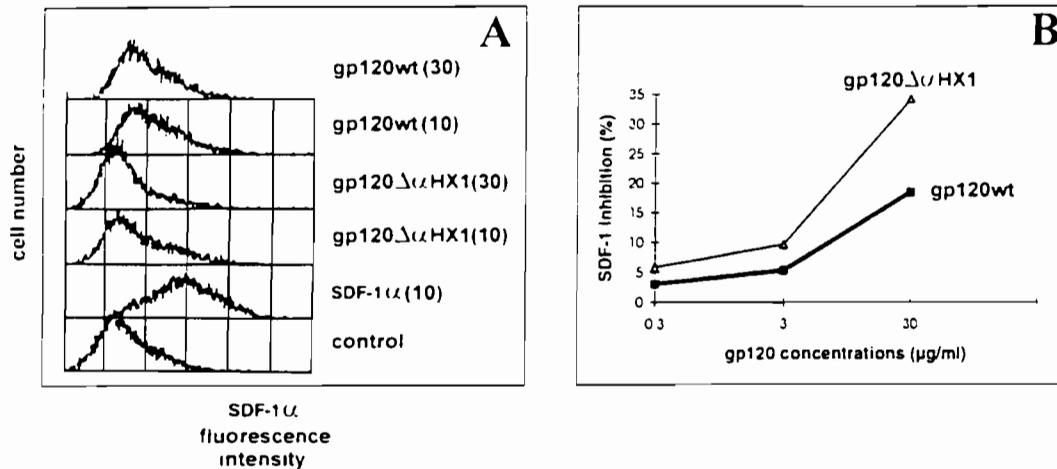


FIG. 6 Inhibition of SDF1 α binding to CXCR4 by soluble gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1. (A) FACS analysis. SDF1 α binding was monitored by staining with a biotinylated anti-SDF1 α polyclonal antibody revealed with streptavidin-PE. CEM1 cells were incubated either with SDF1 α alone (10 μ g/ml) or following a preincubation with gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 at 10 and 30 μ g/ml. Stained CEM cells which were not exposed to SDF1 α were used as a negative control. (B) SDF1 α binding was monitored in a Cell ELISA test in the presence of various concentrations of gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1.

be responsible for this phenomenon. For this purpose, we examined whether gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 could inhibit the binding of SDF1 α , the natural ligand of CXCR4 (4, 49). We observed that the binding of SDF1 α (10 μ g/ml) decreased to 44.4 and 36% of the control value in the presence of 10 and 30 μ g of gp120 wt per ml, respectively (Fig. 6A). Following preincubation with gp120 $\Delta\alpha$ HX1 at 10 and 30 μ g/ml, significant decreases (to 35.3 and 25% of the control value, respectively) were also observed. Similar results were obtained by using the Cell-ELISA method, as represented by respective levels of inhibition (Fig. 6B). Therefore, a specific interaction between CXCR4 and both wild-type and deleted gp120 molecules was observed. We also evaluated the ability of gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1 to inhibit the binding of the anti-CXCR4 specific MAb, 12G5. gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1 concentrations of 10 to 40 μ g/ml allowed us to observe 12G5 MAb binding levels of approximately 60 and 80% of control levels, respectively. Moreover, a gp120 $\Delta\alpha$ HX1 concentration of 90 μ g/ml decreased the 12G5 MAb binding to 45% of the control level. Preincubation with SDF1 α decreased binding to 20% of the control level of binding to CEM cells. Similar experiments assessing inhibition of anti-CXCR4 MAb binding on CHO-K1 CXCR4⁺/CD4⁻ cells were also performed. We observed that both wild-type and mutant gp120 proteins inhibited 12G5 MAb binding by approximately 25 and 36% at concentrations of 2 and 10 μ g/ml, respectively (Table 2).

Since gp120 $\Delta\alpha$ HX1 did not appear to bind CD4 and could inhibit the binding of several CXCR4 ligands, we next assessed whether the mutant gp120 protein bound to the surface of the CD4-negative CHO-K1 cell line expressing the CXCR4 receptor (the CHO-K1 CXCR4⁺/CD4⁻ cell line) (29). The binding of gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1 (2 μ g/ml) to CHO-K1 cells was assessed by using an anti-HIV-1 IgG and revealed with a PE-conjugated anti-human IgG. Indeed, binding was observed with MFI for gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1 reaching 11.92, and 13.92 respectively, whereas the control MFI, obtained in the absence of gp120 proteins, was 3.35 (Fig. 7A). Similar low MFIs were obtained after incubation of CHO-K1 CXCR4⁺/CD4⁻ cells with concentrations up to 30 μ g of either wt or mutant gp120 proteins per ml (Fig. 7B).

Inhibition of HIV-1 infectivity by soluble recombinant gp120 $\Delta\alpha$ HX1. The ability of recombinant gp120 $\Delta\alpha$ HX1 to inhibit

HIV-1 infection was assessed by preincubating 10⁴ target HeLa P4 cells with this soluble protein at 4°C for 1 h and then exposing them to 50 TCID₅₀ of HIV-1 LAI for 24 h at 37°C in the presence of the gp120 proteins. Interestingly, 50% viral inhibitory concentration (IC₅₀) was obtained following incubation and was maintained throughout the infection in the presence of either gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 at a concentration of 100 nM (Fig. 8). Therefore, despite a lack of interaction of gp120 $\Delta\alpha$ HX1 with CD4, this molecule was capable of inhibiting HIV-1 infection, probably through its interaction with the CXCR4 secondary receptor.

DISCUSSION

We describe a deletion of an amphipathic α HX structure in a highly conserved region of the HIV-1 SUgp120 that abolished CD4 binding while maintaining CXCR4 recognition and binding. In our mutant, amino acids N58 to T60 and L86 to K91 were preserved in order to maintain the potential N58 glycosylation site and C89-linked disulfide bond. This mutant envelope displayed an ability to inhibit HIV-1 infection, probably through its binding to CXCR4. By using a highly sensitive assay

TABLE 2. Effect of gp120 on the cell binding capacity of an anti-CXCR4 MAb

Preincubation	Binding capacity (%) of 12G5 to cells at following ligand concn (μ g/ml)				
	CEM CD4 ⁺ ^a			CHO-K1 CXCR4 ⁺ /CD4 ⁻ ^b	
	10	40	90	2	10
SDF1 α	20.7	ND ^c	ND	ND	ND
gp120 wt	59.5	58.0	ND	75.0	64.0
gp120 $\Delta\alpha$ HX1	80.0	77.2	44.8	74.0	61.4

^a Binding capacity of the 12G5 anti-CXCR4 MAb (10 μ g/ml) to CEM cells was assessed after preincubation with either soluble gp120 wt, gp120 $\Delta\alpha$ HX1, or SDF1 α and is presented as the percentage of total binding (100%).

^b Binding capacity of the 12G5 anti-CXCR4 MAb (10 μ g/ml) to CHO-K1 CXCR4⁺/CD4⁻ cells was assessed after preincubation with either soluble gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 and is presented as the percentage of total binding (100%).

^c ND, not determined.

for HIV-1 envelope cell-to-cell fusion, we were able to demonstrate a complete lack of fusion by an HIV-1 envelope harboring this mutation despite its efficient expression at the cell surface. This is in agreement with previous reports concluding that CD4 is required for fusion and syncytium formation by gp120/HIV-1 LAI/IIIB (8).

Several groups have shown that the CD4 recognition and binding properties of gp120 are maintained upon deletion of either specific variable loops (51, 66) or the N-terminal C1 and C-terminal C5 constant regions, which are implicated in the noncovalent association with gp41 (9, 36). Recently, smaller deletions within the N-terminal domain of C1, including the 30 amino acids from the signal peptide, have demonstrated that CD4 binding is preserved upon deletion of the first 85 amino acids but is lost upon elimination of 93 amino acids (65). Our results extend the latter finding and indicate that the region

between amino acids E61 and S85 in the C1 region, which does not include the first 30 amino acids from the signal peptide, either (i) harbors essential amino acids or structures which are required for binding to the CD4 receptor or (ii) participates in the correct folding of the gp120 binding site for CD4.

The finding that gp120 undergoes a conformational change upon binding to CD4 (54, 55) led to the hypothesis that this interaction might play a role in chemokine receptor binding and subsequent HIV-1 entry (60, 64). However, more recently, it has been reported that gp120 wt is likely to interact with CXCR4 in a CD4-independent manner (37). Our results with gp120 ΔαHX1 unambiguously demonstrate that CD4 binding is indeed not required for CXCR4 association. This was established by our observation that wt and deleted forms of gp120 competed equivalently with the binding of SDF1α, the CXCR4 natural ligand, and 12G5, a MAb probably directed against the third extramembrane loop of CXCR4 (7). This was also clearly demonstrated by the ability of the mutant gp120 protein to bind to CHO-K1 CXCR4⁺/CD4⁻ cells but not to the parental CHO-K1 CXCR4⁻/CD4⁻ cells. Further topological mapping with MAbs probing for global and local conformation will be necessary to more precisely assess the folding of our mutant protein.

The levels of CCR5 and CXCR4 chemokine receptors are known to be down modulated following interaction with their natural ligands. Thus, after binding of SDF1α via the N-terminal segments of the second and third CXCR4 extramembrane receptor loops (19), CXCR4 is internalized rapidly (57) and reexpressed at the cell surface after recycling (2, 35). In the experiments described here, under conditions where internalization could occur, i.e., in the absence of sodium azide, binding of gp120 ΔαHX1 to the cell surface could not be detected while gp120 wt remained efficiently associated at the surface. In contrast, upon inhibition of internalization with sodium azide, both gp120 wt and gp120 ΔαHX1 were strongly associated at the cell surface. Thus, binding of gp120 to CXCR4 but not to CD4 probably results in rapid receptor down modulation. Accordingly, binding of SDF1α and SDF1α analogs at

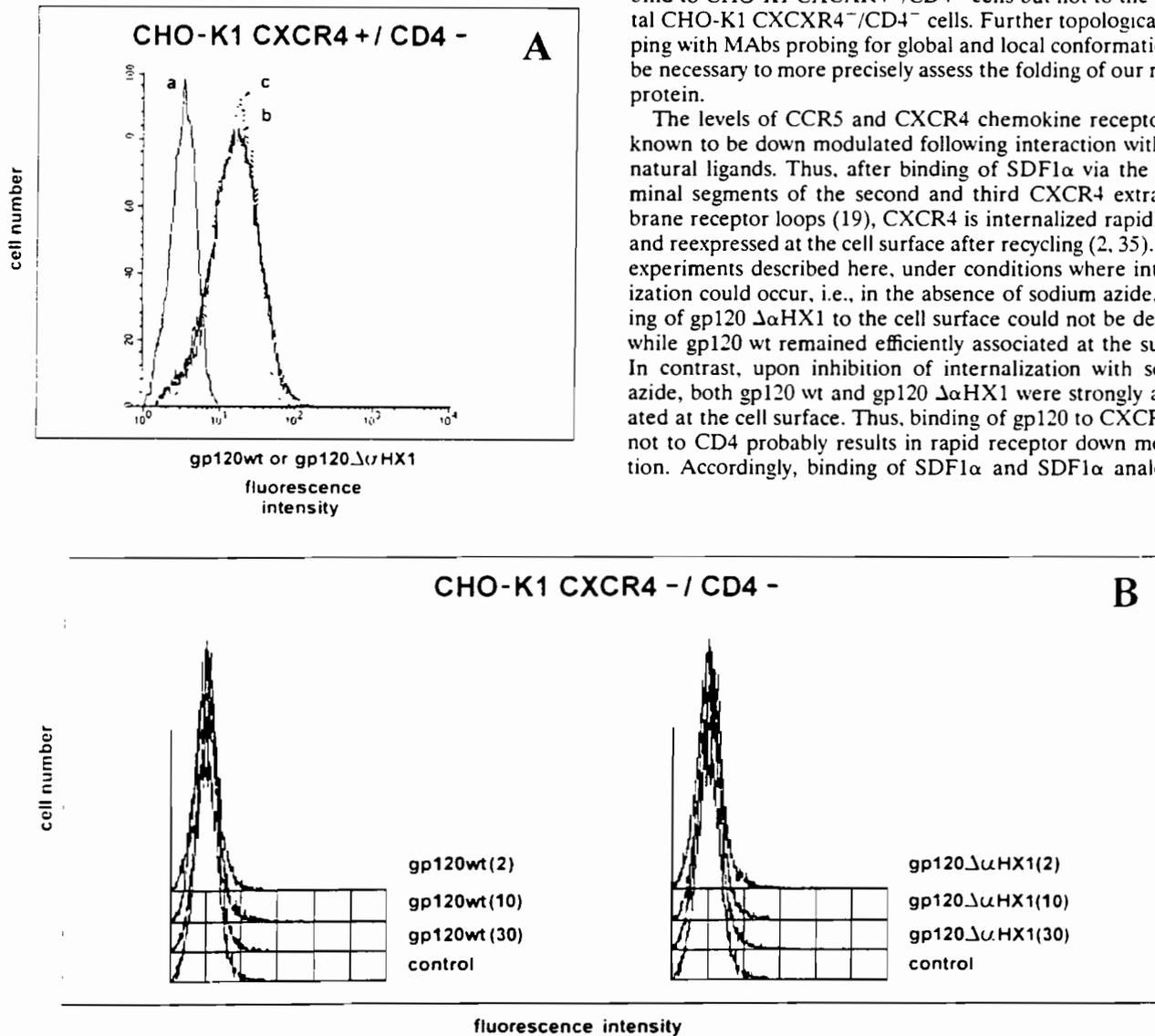


FIG 7 Direct binding of gp120 proteins to the CD4⁻ CHO-K1 cell line in the presence of sodium azide (0.02%) for 4 h at 4°C. (A) Binding of gp120 wt (2 μg/ml) (curve c) and gp120 ΔαHX1 (2 μg/ml) (curve b) to the CD4-negative CHO-K1 cell line expressing the recombinant CXCR4 chemokine receptor background fluorescence (curve a). (B) Binding of different concentrations of gp120 wt and gp120 ΔαHX1 (2, 10 and 30 μg/ml) to CHO-K1 CXCR4⁻/CD4⁻ cells. The control is the background fluorescence.

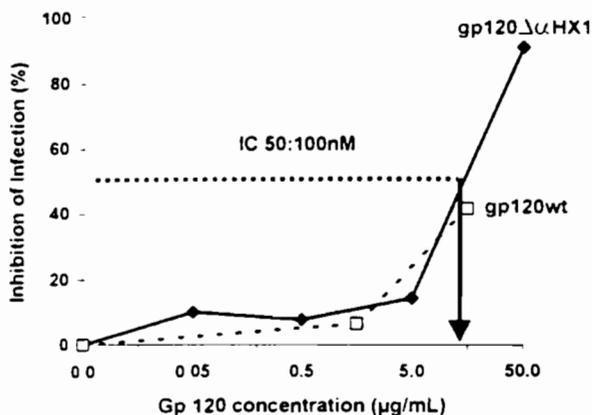


FIG 8. gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1 both inhibit HIV-1 infection of HeLa P4 cells. HeLa P4 cells were preincubated for 1 h at 4°C with various concentrations of gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1. Cells (10^6 cells) were then incubated for 24 h at 37°C in the presence of 50 TCID₅₀ of HIV-1 LAI and either gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1. The IC₅₀ was obtained after incubation of cells with 100 nM either gp120 protein.

100 nM has been shown to inhibit HIV-1 infection, most probably by down regulating CXCR4 levels (4, 49, 56, 62).

Incubation of cells with either gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 resulted in an inhibition of HIV-1 infection with an IC₅₀ of 100 nM. It will be of interest to determine whether gp120 $\Delta\alpha$ HX1 inhibited HIV-1 infection by competing for HIV-1 binding sites and/or by down regulating of CXCR4 receptor surface expression. Site-directed mutagenesis of gp120 within the highly conserved α HX1 structure will allow a more precise definition of the amino acids and structure required for interactions with CD4 and/or CXCR4 receptors. This may provide the basis for the design of CXCR4-specific inhibitors that are CD4 independent in their action.

ACKNOWLEDGMENTS

This study would have been impossible without the generosity and kindness of our colleagues, to whom we are indebted for scientific and technical input. We especially thank Marc Sitbon, and Quentin Sattentau for providing reagents and for insightful discussions; Naomi Taylor for critical reading of the manuscript; Pierre Charneau, Olivier Schwartz, and Marc Parmentier for generously providing plasmids, antibodies, and cell lines; James Hoxie for the 12G5 MAb; Ian Clark Lewis for SDF1 α ; François Trancard for anti-gp120 MAbs; Christophe Duperey, Bernard Geoffroy, Claudine Franche, Michel Secondy, Yvan Boublik, Arnaud Dupuis D'Angeac, and Ilias Stefan for helpful discussions and technical assistance; and Jeanne Anne Ville for her continuous encouragement.

This work was supported by the Institute for Scientific Cooperation and Development, CNRS, the World Health Organization, and Sidaction-France.

REFERENCES

- Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. M. Murphy, and E. Berger. 1996. CC-CKR5: a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272:1955-1958.
- Amara, A., S. Le Gall, O. Schwartz, J. Salameo, M. Montes, P. Loetscher, M. Baggolini, J. L. Virelizier, and F. Arenzana-Seisdedos. 1997. HIV coreceptor down regulation as antiviral principle. SDF-1 α -dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* 186:1139-1146.
- Barré-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vézinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphocyte retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:865-871.
- Bleul, C. C., M. Farzan, H. Choe, C. Parolin, I. Clark-Lewis, J. Sodroski, and T. A. Springer. 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382:829-832.
- Bolmstedt, A., A. Hemming, P. Flodby, P. Bernstsson, B. Travis, J. P. C. Lin, J. Ledbetter, T. Tsu, H. Wigzell, S. L. Hu, and S. Olofsson. 1991. Effects of mutations in glycosylation sites and disulfide bonds on processing CD4-binding and fusion activity of human immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* 71:1269-1277.
- Boublik, Y., C. Denesvre, and M. Sitbon. Unpublished data.
- Brelot, A., N. Heveker, O. Pleskoff, N. Sol, and M. Alizon. 1997. Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity. *J Virol* 71:4744-4751.
- Broder, C. C., and E. A. Berger. 1993. CD4 molecules with a diversity of mutations encompassing the CDR3 region efficiently support human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion. *J Virol* 67:913-926.
- Cao, J., L. Bergeron, E. Helseth, M. Thali, H. Repke, and J. Sodroski. 1993. Effects of amino acid changes in the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein. *J Virol* 67:2747-2755.
- Chaabihi, H., M. H. Ogliaastro, M. Martin, C. Giraud, G. Devauchelle, and M. Cérutti. 1993. Competition between baculovirus polyhedrin and P10 gene expression during infection of insect cells. *J Virol* 67:2664-2671.
- Cheng-Mayer, C., M. Quiroga, J. W. Tung, D. Dina, and J. A. Levy. 1990. Viral determinants of human immunodeficiency virus type 1 T-cell or macrophage tropism, cytopathogenicity, and CD4 antigen modulation. *J Virol* 64:4390-4398.
- Chesebro, B., K. Wehrly, and S. Perryman. 1996. Mapping of independent V3 envelope determinants of human immunodeficiency virus type 1 macrophage tropism and syncytium formation in lymphocytes. *J Virol* 70:9055-9059.
- Chesebro, B., K. Wehrly, J. Nishio, and S. Perryman. 1992. Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism. *J Virol* 66:6547-6554.
- Cho, M. W., M. Lee, M. Carney, J. Breson, R. Doms, and M. Martin. 1998. Identification of determinants on a dual-tropic human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that confer usage of CXCR4. *J Virol* 72:2509-2515.
- Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, C. R. MacKay, G. LaRosa, W. Newman, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski. 1996. The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85:1-20.
- Clavel, F., and P. Charneau. 1994. Fusion from without directed by human immunodeficiency virus particles. *J Virol* 68:1179-1185.
- Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, A. Cara, R. C. Gallo, and P. Lusso. 1996. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat. Med* 2:1244-1247.
- Cordonnier, A., L. Montagnier, and M. Emerman. 1989. Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding. *Nature* 340:571-574.
- Crump, M. P., J. H. Gong, P. Loetscher, K. Rajarathnam, A. Amara, F. Arenzana-Seisdedos, J. L. Virelizier, M. Baggolini, B. D. Sykes, and I. Clark-Lewis. 1997. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1 α dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* 16:6996-7007.
- Dalgeish, A. G., P. C. L. Beverly, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763-766.
- Denesvre, C., C. Carrington, A. Corbin, Y. Takeuchi, F.-L. Cosset, T. Schulz, M. Sitbon, and P. Sonigo. 1996. TM domain swapping of murine leukemia virus and human T-cell leukemia virus envelopes confers different infectious abilities despite similar incorporation into virions. *J Virol* 70:4380-4386.
- Denesvre, C., P. Sonigo, A. Corbin, H. Ellerbrok, and M. Sitbon. 1995. Influence of transmembrane domains on the fusogenic abilities of human and murine leukemia retrovirus envelopes. *J Virol* 69:4149-4157.
- Deng, H., D. Unutmaz, V. N. Kewal Ramani, and D. R. Littman. 1997. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 388:296-300.
- Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. Sutton, M. Hill, C. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381:661-666.
- Ditzel, H. J., P. W. Parren, J. M. Binley, J. Sodroski, J. P. Moore, and C. F. Barbas. 1997. Mapping the protein surface of human immunodeficiency virus type 1 gp120 using human monoclonal antibodies from phage display libraries. *J Mol Biol* 267:684-695.
- Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman, and R. W. Doms. 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3,

- and CXCR-2b as fusion cofactors. *Nature* 355:1149-1158
27. Dragic, T., and M. Alizon. 1993. Different requirements for membrane fusion mediated by the envelopes of human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J. Virol.* 67:2355-2359
 28. Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayanan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CXCR-5. *Nature* 381:667-673
 29. Endres, M. J. P. R., M. Clapham, M. Marsh, J. Ahuja, A. Davis-Turner, A. Mcknight, J. F. Thomas, B. Stoebenau-Haggarty, S. Choe, P. J. Vance, T. C. N. Wells, C. A. Power, S. S. Sutterwala, R. W. Doms, N. R. Landau, and J. A. Hoxie. 1996. CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR-4. *Cell* 87:745-756
 30. Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272:872-877
 31. Fitzpatrick-McElligott, S. 1992. Gene transfer to tumor-infiltrating lymphocytes and other mammalian somatic cells by microprojectile bombardment. *BioTechnology* 10:1036-1040
 32. Gallaher, W. R., J. M. Ball, R. F. Garry, A. M. Martin-Amedee, and R. C. Montelaro. 1995. A general model for the surface glycoproteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11:191-202
 33. Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Hayer, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, G. Safai, G. White, P. Foster, and P. D. Markham. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224:500-503
 34. Hansen, J. E., O. Lund, J. O. Nielsen, S. Brunak, and J. E. S. Hansen. 1996. Prediction of the secondary structure of HIV-1 gp120. *Proteins* 25:1-11
 35. Haribabu, B., M. Ricardo, I. Fisher, S. Sozzano, S. C. Peiper, R. Horuk, H. Ali, and R. Snyderman. 1997. Regulation of phosphorylation in desensitization and internalization. *J. Biol. Chem.* 272:28726-28731
 36. Helseth, E., U. Olshevsky, C. Furman, and J. Sodrosky. 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein important for association with gp41 transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 65:2119-2123
 37. Hesselgesser, J., M. Halks-Miller, V. DelVecchio, S. C. Peiper, J. Hoxie, D. L. Kolson, D. Taub, and R. Horuk. 1997. CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4 functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr Biol* 7:112-121
 38. Horuk, R., J. Hesselgesser, Y. Zhou, D. Faulds, M. Halks-Miller, S. Harvey, D. Taub, M. Samson, M. Parmentier, J. Rucker, B. J. Doranz, and R. W. Doms. 1998. The CC chemokine 1-309 inhibits CCR8-dependent infection by diverse HIV-1 strains. *J. Biol. Chem.* 273:386-391
 39. Hwang, S. S., T. J. Boyle, H. K. Lyerly, and B. R. Cullen. 1991. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 253:71-74
 40. Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruet, D. Gruetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312:767-768
 41. Kowalski, M., J. Pultz, L. Basiripour, T. Dorfman, W. C. Goh, E. Terwilliger, A. Dayton, C. Rosen, W. Haseltine, and J. Sodrosky. 1987. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* 237:1351-1355
 42. Kozak, S. L., E. J. Platt, N. Mandani, F. E. Ferro, Jr., K. Peden, and D. Kabat. 1997. CD4, CXCR-4, and CCR5 dependencies for infection by primary patient and laboratory-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 71:873-882
 43. Lapham, C. K., J. Ouyang, B. Chandrasekhar, N. Y. Nguyen, D. S. Dimitrov, and H. Golding. 1996. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp 120 complex in human cell lines. *Science* 274:602-605
 44. Lasky, L. A., G. Nakamura, D. H. Smith, C. Fennie, C. Shimasaki, E. Patzer, P. Berman, T. Gregory, and D. 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
 45. Maddon, P., A. Dalglish, J. S. McDougal, P. Clapham, R. Weiss, and R. Axel. 1986. The T4 gene encodes the AIDS receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47:333-348
 46. Moore, J. 1990. Simple methods for monitoring HIV-1 and HIV-2 gp120 binding to sCD4 by ELISA. HIV-2 has a 25-fold lower affinity than HIV-1 for soluble CD4. *AIDS* 3:297-305
 47. Moore, J., M. Thali, B. A. Jameson, F. Vignaux, G. K. Lewis, S. W. Poon, M. Charles, M. S. Fung, B. Sun, P. J. Durda, L. Akerblom, B. Wahren, D. D. Ho, Q. Sattentau, and J. Sodrosky. 1993. Immunochemical analysis of the gp120 surface glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: probing the structure of the C4 and V4 domains and the interaction of the C4 domain with the V3 loop. *J. Virol.* 67:4785-4796
 48. Moore, J., Q. Sattentau, R. Wyatt, and J. Sodrosky. 1994. Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J. Virol.* 68:469-484
 49. Oberlin, E., A. Amara, F. Bachelier, C. Bessia, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, O. Schwartz, J. M. Heard, I. Clark-Lewis, D. F. Legier, M. Loetscher, M. Baggiolini, and B. Moser. 1996. The CXCR chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382:833-835
 - 49a. Ogliastro, M. H. Unpublished data
 50. Olsevsky, U., E. Helseth, C. Furman, J. Li, W. Haseltine, and J. Sodrosky. 1990. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J. Virol.* 64:5701-5707
 51. Pollard, S., M. D. Rosa, J. Rosa, and D. Willey. 1992. Truncated variants of gp120 bind CD4 with high affinity and suggest a minimum CD4 binding region. *EMBO J.* 11:4325-4332
 52. Popovic, M., M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo. 1984. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224:497-500
 53. Prince, A. M., H. Reesink, D. Pascual, B. Horowitz, I. Hewlett, K. K. Murthy, K. E. Cobb, and J. W. Eichberg. 1991. Prevention of HIV infection by passive immunization with HIV immunoglobulin. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 7:971-973
 54. Sattentau, Q., and J. Moore. 1991. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J. Exp. Med.* 174:407-415
 55. Sattentau, Q., J. Moore, F. Vignaux, F. Traincard, and P. Pognard. 1993. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J. Virol.* 67:7383-7393
 56. Schols, D., S. Struyf, J. Van Damme, J. A. Esté, G. Henson, and E. De Clercq. 1997. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J. Exp. Med.* 186:1383-1388
 57. Signoret, N., J. Oldridge, A. Pelchen-Matthews, P. J. Klasse, T. Tran, L. F. Brass, M. M. Rosenkilde, T. W. Schwartz, W. Holmes, W. Dallas, M. A. Luther, T. N. C. Wells, J. A. Hoxie, and M. Marsh. 1997. Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J. Cell Biol.* 139:651-664
 58. Stern, B., D. G. Denisova, D. Buyaner, D. Ravis, and J. M. Gershoni. 1997. Helical epitopes determined by low-stringency antibody screening of a combinatorial peptide library. *FASEB J.* 11:147-153
 59. Summers, M. D., and G. E. Smith. 1987. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station bulletin 1555. Texas Agricultural Experiment Station, College Station
 60. Trkola, A., T. Dragic, J. Arthos, J. Binley, W. Olson, G. Allaway, C. Cheng-Mayer, J. Robinson, P. Maddon, and J. Moore. 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 384:184-187
 61. Tschachler, E., H. Buchow, R. C. Gallo, and M. S. Reitz. 1990. Functional contribution of cysteine residues to the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope. *J. Virol.* 64:2250-2259
 62. Ueda, H., M. A. Siani, W. Gong, D. A. Thompson, G. G. Brown, and J. M. Wang. 1997. Chemically synthesized SDF-1 α analogue, N33A, is a potent chemotactic agent for CXCR4/Fusin/LESTR-expressing human leukocytes. *J. Biol. Chem.* 272:24966-24970
 63. Ugolini, S., M. Moulard, I. Mondor, N. Barois, D. Demandolx, J. Hoxie, A. Brelot, M. Alizon, J. Davoust, and Q. J. Sattentau. 1997. HIV-1 gp120 induces an association between CD4 and the chemokine receptor CXCR4. *J. Immunol.* 159:3000-3008
 64. Wu, L., N. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Boretetti, A. Cardoso, E. Desjardins, W. Newman, C. Gerard, and J. Sodrosky. 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384:179-183
 65. Wyatt, R., E. Desjardins, U. Olshevsky, C. Nixon, J. Binley, V. Olshevsky, and J. Sodrosky. 1997. Analysis of interaction of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 71:9722-9731
 66. Wyatt, R., J. Moore, M. Accola, E. Desjardins, J. Robinson, and J. Sodrosky. 1995. Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the of human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope epitopes induced by receptor binding. *J. Virol.* 69:5723-5733

DISCUSSION

Les travaux effectués dans cette publication ont été réalisés en l'absence de toute connaissance sur la structure cristallographique de la SU gp120. Cependant, nous nous sommes fondés sur les études de structure-fonction de cette protéine réalisées avec différentes approches : la biochimie, les algorithmes informatiques, la mutagenèse et les analyses topologiques obtenues avec l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Moore et Coll., 1994; Gallaher et Coll., 1995; Hansen et Coll., 1996; Ditzel et Coll., 1997; Wyatt et Coll., 1997). Nous avons ainsi pu constater la présence de structures de type hélice alpha (α HX) au nombre de 6, au niveau de la gp120. Ces hélices alpha sont très conservées dans les différentes souches de VIH-1, mais également à travers les différents membres de la famille des rétrovirus (VIH-2, SIV, HTLV1, VISNA, EIAV, BLV, et le virus du sarcome de Rous) (Gallaher et Coll., 1995). Nous nous sommes particulièrement intéressés à la première hélice alpha (α HX1 comprenant les aa E91-S115), la plus grande en taille parmi les six hélices conservées présentes dans la gp120. Par ailleurs, il est très intéressant de noter, que la deuxième grande hélice (α HX4) est dans la région C4 et contient le « CD4 binding site ». De plus, des travaux avec des protéines gp120 tronquées au niveau des régions interagissant avec la protéine TM gp41 ont permis de démontrer que les hélices α HX5, α HX6 localisées dans la région C-terminal et les premiers 86 acides aminés de la région N-terminale ne participent ni à la fixation sur le CD4, ni à la fixation sur les seconds récepteurs (Wyatt et Coll., 1997). Un aspect intéressant fut également l'éloignement de l'hélice alpha 1 par rapport à l' α HX4 dans la structure secondaire de la gp120. La délétion de l'hélice alpha 1 de la gp120 a conduit à l'expression après transfection des cellules HeLa-Tat, d'une enveloppe gp160 incapable d'induire la formation de syncytium avec des cellules HeLa CD4-LTR-*LacZ* (HeLa P4). De plus, la gp120 recombinante soluble résultant de cette délétion ne possède plus la capacité de se lier au 110-k, un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope conformationnel correspondant à la région de fixation de la gp120 au CD4. La fixation de cette gp120 sur la lignée cellulaire lymphoblastoïde CEM, n'empêche pas la fixation de différents anticorps dirigés contre la molécule CD4 en particulier ceux connus comme bloquant l'interaction gp120-CD4 (tels que le Leu3a ou le ST4). Cet ensemble de résultats suggère : (i) que la délétion de l' α HX1 a pu entraîner un repliement incorrect de la protéine aboutissant à une modification de la conformation du « CD4 binding site » nécessaire à la fixation de la gp120, ou (ii) que certains acides aminés présents au niveau de cette α HX1 sont directement impliqués dans cette fixation et appartiennent ainsi à la région de fixation au récepteur CD4.

Dans le cas de cette dernière hypothèse il serait intéressant de déterminer par mutagenèse dirigée l'acide aminé ou les acides aminés impliqués dans cette interaction.

La spécificité de fixation de la gp120 déléetée de l' α HX1 sur le CXCR4 a été mise en évidence de différentes manières: (i) inhibition de cette fixation aussi bien par un anticorps dirigé contre le CXCR4 (12G5), que par le ligand naturel du CXCR4 (SDF1 α) (ii) fixation de ce mutant de gp120 sur des cellules CD4 négatives mais exprimant de manière stable le CXCR4 (CHOK-1), ainsi que sur des cellules CHO n'exprimant ni le CD4 ni le CXCR4. Ces résultats nous ont permis de conclure que malgré la perte de fixation sur le CD4 la gp120 déléetée de l' α HX1 préserve sa capacité à se fixer sur le CXCR4.

De plus, il est admis que la fixation de la gp120 sauvage sur le récepteur CD4 entraîne un changement conformationnel de cette dernière qui permet une meilleure fixation du complexe gp120-CD4 sur le CXCR4. Il serait intéressant de savoir si la gp120 $\Delta\alpha$ HX1 a une conformation proche ou similaire à celle de la gp120 sauvage après fixation sur le récepteur CD4. Ceci en établissant une topologie moléculaire de ce mutant sous sa forme soluble et exprimée à la surface des cellules transfectées, à l'aide d'un panel d'anticorps monoclonaux dirigés contre les épitopes accessibles après le changement conformationnel de la gp120 induit par sa fixation sur le CD4 (Sullivan et Coll., 1998; Thali et Coll., 1993; Wyatt et Coll., 1998; Gershoni et Coll., 1993) (17b, 4.8d et CG10). Sachant que la gp120 déléetée de l'hélice alpha 1 ne se fixe plus sur le CD4 mais maintient sa fixation sur le CXCR4, elle peut être un outil précieux pour l'étude des mécanismes mettant en jeu le CXCR4 et éventuellement des récepteurs supplémentaires du VIH autres que le CD4. La construction d'un virus contenant cette gp120 mutée peut également être très intéressante, car elle apportera des informations sur l'importance de tel ou tel récepteur sur l'infection virale.

La capacité de la gp120 $\Delta\alpha$ HX1 à inhiber l'infection virale *in vitro* de manière proche de celle de la gp120 wt, suggère l'existence d'une bonne affinité entre le CXCR4 et la gp120 déléetée. En tenant compte du fait que la gp120 $\Delta\alpha$ HX1 n'était visible à la surface cellulaire qu'en absence de modulation (présence d'azide), il se pourrait que l'inhibition de l'infection virale observé se réalise par cointernalisation du CXCR4 et de la gp120 $\Delta\alpha$ HX1 dans un compartiment intracellulaire.

CHAPITRE III

Rôle des résidus aromatiques bicycliques de l'hélice α -1 dans la fixation de la gp120 du VIH-1 III B sur le récepteur CD4 : considérations structurales.

**Manuscrit n°2. En cours de préparation pour publication
(fin de travaux en cours).**

Rôle des résidus aromatiques bicycliques de l'hélice α -1 dans la fixation de la gp120 du VIH-1 III B sur le récepteur CD4 : considérations structurales.

**Manuscrit n°2, en cours de préparation pour publication
(Fin de travaux en cours).**

D. Missé^{1,2}, M. Cerutti², G. Divita³, I. Stefas^{1,2}

G. Devauchelle², F. Jansen¹, A. Dupuis d'Angeac^{1,2} and F. Veas^{*1,2}

¹Laboratoire d'Immunologie Rétrovirale et Moléculaire, Institut Français de Recherches pour le Développement, 911 Av. Agropolis, 34032 Montpellier, France. ²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), URA 2209, INRA, 30380 Saint Christol lez Alès, France; ³CNRS UPR 1086. CRBM, 34293, Montpellier, France.

*To whom correspondence should be addressed: Dr. Francisco Veas, Ph.D.

- E-mail: veas@mpl.orstom.fr
- Phone: 33 4 67 61 64 31 or 95
- Fax: 33 4 67 52 83 80

Résumé

Dans la publication décrite précédemment (Missé et Coll., 1998), nous avons démontré qu'une délétion de la structure conservée, hélice alpha 1 (α HX1) de la gp120 du VIH-1 IIIB (T-tropique), supprime toute fixation sur le récepteur CD4.

Nous avons recherché par mutagenèse dirigée l'acide aminé responsable de la fixation de la gp120 sur le CD4 au niveau de cette hélice alpha.

Nos études ont démontré qu'une mutation ponctuelle 112W/S (Tryptophane/Sérine) au niveau de cette région empêche la formation de syncytium entre des cellules HeLa P4 et des cellules exprimant une enveloppe gp160 contenant cette mutation.

Nous avons également démontré qu'un virus contenant la mutation 112W/S était incapable d'infecter des cellules HeLa P4 comme cela a été montré avec le virus mutant 427W/S (Cordonnier et Coll., 1989).

Les données cristallographiques de la gp120 actuellement disponibles (Kwong et Coll., 1998), nous ont permis de localiser le résidu W112 à proximité du résidu W427 (distance inférieure ou égale à 5Å), dans une poche riche en groupements aromatiques interagissant avec l'acide aminé F43 (Phénylalanine 43) du CD4.

Ces données permettent de définir de façon précise les acides aminés de la gp120 qui sont indispensables dans l'interaction avec la molécule CD4.

Description des travaux

Introduction

Comme pour la plupart des parasites intracellulaires, le VIH-1 requiert une "porte d'entrée" dans les cellules cibles. Dans le cas du VIH-1, ces "portes d'entrée" sont représentés par la molécule CD4, et les membres de la famille des récepteurs de chimiokines (co-récepteurs).

Dans le chapitre précédent nous avons décrit une gp120 délétée de l'hélice alpha-1 (α HX1), qui ne se fixe plus sur le CD4, mais qui interagit avec le CXCR4 (Missé et Coll., 1998). Il nous est apparu nécessaire, de déterminer les acides aminés de l'hélice alpha 1 impliqués dans l'interaction avec le CD4. Les objectifs des travaux développés dans ce chapitre ont été d'identifier l'acide aminé ou les acides aminés présents dans l'hélice alpha 1, qui participe au maintien de la structure d'interaction de la gp120 avec le CD4. Le choix des mutations effectuées est fondé essentiellement sur deux critères: (i) la conservation de la partie C-terminale de l'hélice α 1 de la gp120 dans différents isolats de VIH-1 (Hansen et Coll., 1996), (ii) l'importance des résidus aromatiques dont les tryptophanes (W) dans l'interaction gp120-CD4.

En effet, des analyses par mutagenèse au niveau de la région C4 (4^{ème} région conservée) de la gp120, ont permis à Cordonnier et Coll. (1989) d'identifier le résidu W432 (W427 d'après Wyatt et Coll., 1998) comme le « site principal de fixation de la gp120 sur le CD4 ». La mutation ponctuelle du W427 en sérine (427W/S) empêchait toute fixation de la gp120 sur la molécule CD4 ainsi que l'infection des cellules par le virus muté correspondant.

Nous avons pu démontrer dans ce chapitre que le résidu 112W (présent au niveau de l'hélice alpha 1) est l'un des acides aminés indispensables pour la liaison de la gp120 au CD4.

Matériel et Méthodes

Dans un souci de clarté, nous adopterons au cours de ce travail la numérotation des acides aminés utilisée par Wyatt et Coll. 1998.

La plupart des méthodes utilisées dans ce chapitre sont identiques à celles employées dans le chapitre II. Nous décrirons ici, uniquement les méthodes supplémentaires utilisées ou celles dans lesquelles nous avons effectué des modifications.

◆ **Plasmides, anticorps et pseudovirus**

Le plasmide pHXB2ENV (code pour l'enveloppe gp160 du VIH-1III B), le plasmide pCMV-rev (code pour la protéine Rev sous le contrôle du promoteur CMV), et l'anticorps monoclonal 902 (dirigé contre la boucle V3 de la gp120), ont été obtenus du NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (EU). Le pseudovirus pNL4-3env-GFP nous a été fourni gracieusement par le Dr. D. Gabuzda (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, EU). Ce plasmide contient le génome du VIH-1 NL4-3 délété du gène Env, ainsi qu'une substitution du gène Nef par le gène codant pour la protéine GFP (Green Fluorescent Protein).

◆ **Mutagenèse dirigée dans l'hélice alpha 1 de la gp120**

Dans le but d'étudier les résidus W présents dans la structure hélice alpha 1 de la gp120, nous avons reconstitué la région NdeI-HincII du gène codant pour la gp120. Ceci en utilisant un oligonucléotide dans lequel nous avons introduit deux sites de restriction (HpaI et HindIII) entourant l'hélice alpha 1 (Missé et Coll., 1998). L'hélice alpha 1 de la gp120 possède deux résidus tryptophanes (W96 et W112) (Hansen et Coll., 1996). Les sites HpaI et Hind III nous ont permis, d'échanger pour chaque construction un fragment HpaI-Hind III sauvage par un fragment HpaI-Hind III muté. Les mutations ont été effectuées soit simultanément sur les deux W, soit sur un seul tryptophane. La mutagenèse dirigée a été effectuée par la méthode des oligonucléotides chevauchants compris entre le site HpaI et Hind III du plasmide pBS. Dans le tableau ci-dessous ne figurent que les oligonucléotides qui comportent la mutation souhaitée.

Mutants	Oligonucléotides
96W/S	5' AAC GTG ACA GAA AAT TTT AAC ATG AGT AAA AAT G ^{3'}
112W/S	5' GAT ATA ATC AGT TTA TCT GAT CAA AGC ^{3'}
96W/I	5' AAC GTG ACA GAA AAT TTT AAC ATG ATC AAA AAT G ^{3'}
112W/I	5' GAT ATA ATC AGT TTA ATC GAT CAA AGC ^{3'}
96W	5' AAC GTG ACA GAA AAT TTT AAC ATG TGG AAA AAT G ^{3'}
112W	5' GAT ATA ATC AGT TTA TGG GAT CAA AGC ^{3'}

◆ Fusion cellule-cellule

Les vecteurs d'expression contenant les différentes enveloppes gp160 (pHXB2ENV, 500ng) ont été co-transfectés avec 500ng de pCMV-rev dans des cellules HeLa-Tat. La méthode de transfection utilisée a été la lipofection (lipofectamine, GIBCO) comme décrit dans Missé et Coll. (1998).

Le pCMV-rev est indispensable pour activer l'expression du gène ENV présent dans le plasmide pHXB2 ENV. Les cellules transfectées ont ensuite été mises en coculture avec des cellules HeLa P4 (CD4-LTR *LacZ*) comme décrit dans Missé et Coll. (1998).

◆ Expression à la surface cellulaire des gp120 mutées

La technique de transfection utilisée a été la même que celle employée dans le cas de la fusion cellule-cellule.

Vingt-quatre heures avant la co-transfection, les cellules HeLa-Tat ont été placées dans des puits de 3,5 cm de diamètre recouverts de lamelles de verre (12 mm de diamètre). Les cellules ont été incubées 48 heures après la co-transfection avec l'Acm 902 (dirigé contre la boucle V3 de la gp120) à la concentration de 10 μ g/ml. Cette incubation a été réalisée en présence de 0,1 % d'azide de sodium (NaN_3) et en tampon PBS. Après 2 lavages en PBS 0,3 % BSA /0,1 NaN_3 , les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps anti-IgG de souris marqué au Texas-red (Molecular probes). Après 3 lavages extensifs, les cellules ont été fixées pendant 2 minutes avec un mélange éthanol-acétone (1 : 2). Après montage des lamelles sur des lames avec du Mowiol, les cellules ont été observées en microscopie confocale.

◆ Dosage de la p24 par ELFA (Enzyme linked fluorescent assay)

Le dosage de la p24 est effectué avec le système automatisé VIDAS HIV DUO (BioMérieux). Ce test repose sur une détection simultanée de l'antigénémie p24 et des anticorps anti-VIH-1 et anti-VIH-2. Le principe du test associe deux réactions immuno-enzymatiques à une détection en fluorescence. Ce test est muni d'un cône à usage unique qui sert à la fois de phase solide et de système de pipetage. Dans la partie basse du cône, sont fixés trois peptides de synthèse (gp41, gp36 et un peptide spécifique du type O) conjugués à des Acms de souris anti-IgG humaines marqués à la phosphatase alcaline. Dans la partie haute du cône, sont fixés des Acms anti-p24. Lors de la réalisation du test, un anticorps de lapin anti-p24 biotinylé (conjugué à la streptavidine-phosphatase alcaline) est ajouté en même

temps que l'échantillon. Le substrat, 4-méthyl-ombelliferyl-phosphate, permet de mesurer la fluorescence qui est proportionnelle à la quantité d'Ac anti-HIV et/ou d'Ag p24 présents dans l'échantillon. La réaction est réalisée en 90 minutes et une lecture de la fluorescence est faite avec le lecteur spécifique du test VIDAS (longueur d'onde de 450 nm).

◆ Infections des lymphocytes humains par des pseudo-virus mutés obtenus par complémentation

Des cellules 293 ont été co-transfectées avec 10 μ g de pseudovirus pNL4-3 GFP, 2 μ g du plasmide pHXB2ENV (contenant ou non les différentes mutations dans la SUgp120) et 1,5 μ g du plasmide pCMV-rev. Pour cela, la méthode de transfection au phosphate de calcium a été utilisée. Quarante-huit heures après la transfection, les surnageants des cellules ont été prélevés, filtrés et conservés à -80°C jusqu'à l'utilisation. Une mesure de la p24 a ensuite été effectuée sur ces différents surnageants. Des lymphocytes humains stimulés préalablement pendant 3 jours par 10 μ g / ml de PHA (Phytohémagglutinine), 50 U d'IL-2 dans un milieu de culture RPMI 1640-10 % SVF (Sérum de Veau Fœtal), ont été incubées avec les différents surnageants de cellules 293 transfectées (contenant une concentration identique de p24). Les capacités infectieuses des différents surnageants ont été : visualisées par microscopie à fluorescence (expression de la protéine GFP dans les lymphocytes) et déterminées par un dosage de la p24 (suivi périodique tous les 3 jours) dans les surnageants de culture de lymphocytes infectées.

◆ Analyses Structurales

La structure du complexe constituée par le coeur de la gp120, les deux premiers domaines du CD4 et le fragment Fab de l'anticorps neutralisant 17b a été récemment déterminée par cristallographie aux rayons X (Kwong et Coll., 1998). Cette structure a été déposée dans protéine data base (pdb) sous le code d'accès "1gc1". Les coordonnées structurales de ce complexe ont été analysées avec le logiciel Insight II (MSI pour Molecular Simulations) sur la station graphique Oxygène (Silicon grafic O₂). La visualisation et la modélisation des domaines de la gp120 et du CD4 ont été effectués à l'aide du programme Discover (MSI) sous l'environnement Insigth II.

Résultats

◆ Capacités fusiogènes des enveloppes gp160

Afin d'évaluer les capacités fusiogènes des différentes enveloppes gp160 exprimées à la

surface des cellules HeLa-Tat transfectées, nous avons mis ces cellules en co-culture avec des cellules HeLa P4 (CD4 LTR *LacZ*).

Les résultats du tableau 1, montrent que des mutations simultanées sur les deux résidus tryptophane de l'hélice alpha 1 (W96 et W112) en sérine ou en isoleucine rendent l'enveloppe gp160 incapable d'induire des *syncytia* entre les cellules. Le même phénomène est observé avec l'enveloppe gp160 contenant la mutation ponctuelle 112W/S. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec la mutation ponctuelle 427 W/S au niveau de l'enveloppe gp160, connu comme le site de fixation de la gp120 sur le CD4 (Cordonnier et Coll., 1989).

En revanche, la substitution d'un résidu tryptophane (W) par un résidu aromatique phénylalanine (F), d'indice hydrophobicité proche, réduit d'environ 50 % les capacités fusiogènes des enveloppe mutées. On peut constater que quelle que soit la construction, ce phénomène est observé uniquement lorsque le résidu W112 est impliqué. Ce qui dénote l'importance biologique de cet acide aminé, comparé au groupement W96 (dans le cadre de ces expériences). Tous ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus avec l'enveloppe gp160 sauvage (dans laquelle on observe environ 1500 foyers de fusion). Le contrôle négatif était la mise en co-culture de cellules HeLa-Tat non transfectées avec des cellules HeLa P4 (aucun foyer de fusion n'a été observé).

Ces résultats nous indiquent que le résidu W112 est impliqué dans les interactions gp120-cellules cibles. Interactions qui précèdent le phénomène de fusion cellulaire.

Tableau 1

Mutations dans la gp120	Pourcentage de foyers de fusion
Type sauvage	100 % (environ 1500 foyers de fusion/puit)
96W/S et 112W/S	0 %
96W/I et 112W/I	0 %
96W/F et 112W/F	60 %
96W/F	100 %
112W/F	60 %
96W/S	Non déterminé
112W/S	0 %
427W/S	0 %
Contrôle	0 %

◆ Expression à la surface cellulaire des protéines gp120

La Figure 1, montre l'expression des protéines gp120 (mutées ou sauvage) à la surface des cellules HeLa-Tat transfectées par le vecteur d'expression pHXB2ENV (sauvage ou comportant la mutation 112W/S). La gp120 a été détectée par l'Acm 902, dirigé contre la boucle V3 de la gp120. Ce dernier a ensuite été révélé par un anti-IgG de souris couplé au Texas red. On constate qu'aussi bien la gp120 sauvage que la gp120 112W/S, sont exprimées à la surface des cellules. L'incubation de l'anticorps 902 avec des cellules HeLa-Tat non transfectées ne donne aucun signal (non montré sur la **Fig. 1**).

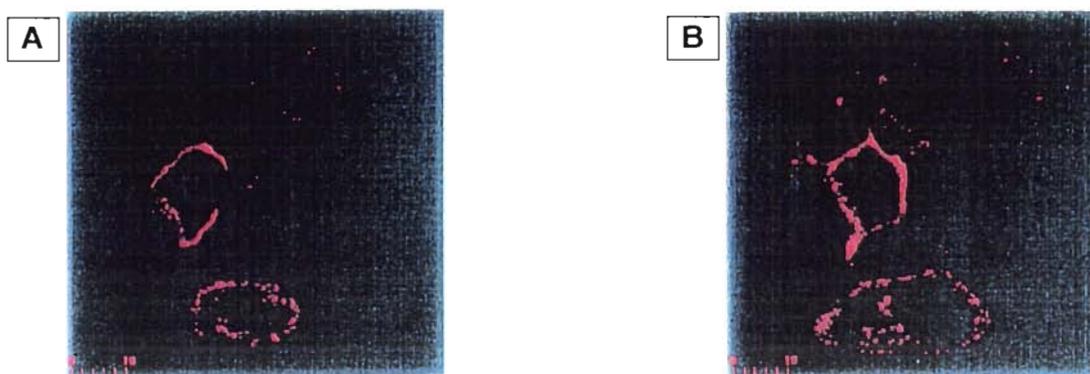


Fig. 1. Expression à la surface des cellules HeLa-Tat de l'enveloppe gp120 sauvage (**A**) et de l'enveloppe gp120 112 W/S mutée (**B**). 48 heures après la transfection les cellules HeLa-Tat ont été incubées avec l'anticorps monoclonal 902 dirigé contre la boucle V3 de la gp120. Les cellules ont ensuite été révélées avec un anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé au Texas red. Les cellules fixées au méthanol-acétone sont visualisées en microscopie confocale à fluorescence.

◆ Capacités infectieuses des pseudo-virus complémentés

La Figure 2, montre l'évolution du taux de p24 dans les surnageants de lymphocytes (préalablement activées par 10 μ g / ml de PHA et 50 U / ml d'IL2) mis en contact avec:

- le pseudovirus complémenté par la gp120 de type sauvage
- le pseudovirus complémenté par la gp120 mutée (gp120 112W/S)

Dans le premier cas, le taux de p24 diminue d'abord pour augmenter considérablement (à partir du 14^{ème} jour après l'infection), ce qui prouve la présence d'une p24 synthétisée *de novo*, produit d'une infection virale.

Dans le deuxième cas, le taux de p24 diminue progressivement pour disparaître complètement au 20^{ème} jour (après la mise en contact). Il n'y a donc pas eu infection des cellules grâce à la mutation 112W/S dans la gp120. Ce fait a été confirmé par l'absence d'expression de la protéine GFP dans les cellules incubées avec le virus muté 112W/S (visualisation en microscopie à fluorescence).

L'absence d'infection des cellules observé dans ce dernier cas, peut-être expliqué par l'absence de formation de *syncytia* visualisée précédemment avec des cellules exprimant à leur surface la gp120 112W/S.

Ce virus muté montre une similitude d'action avec le virus VIH comportant la mutation 427W/S (Cordonnier et Coll., 1989). Ce dernier était incapable d'infecter des lymphocytes activés du sang périphérique.

Les capacités infectieuses des autres virus mutants (mutations de la SUgp120 citées dans le tableau I) sont en cours d'étude dans notre laboratoire.

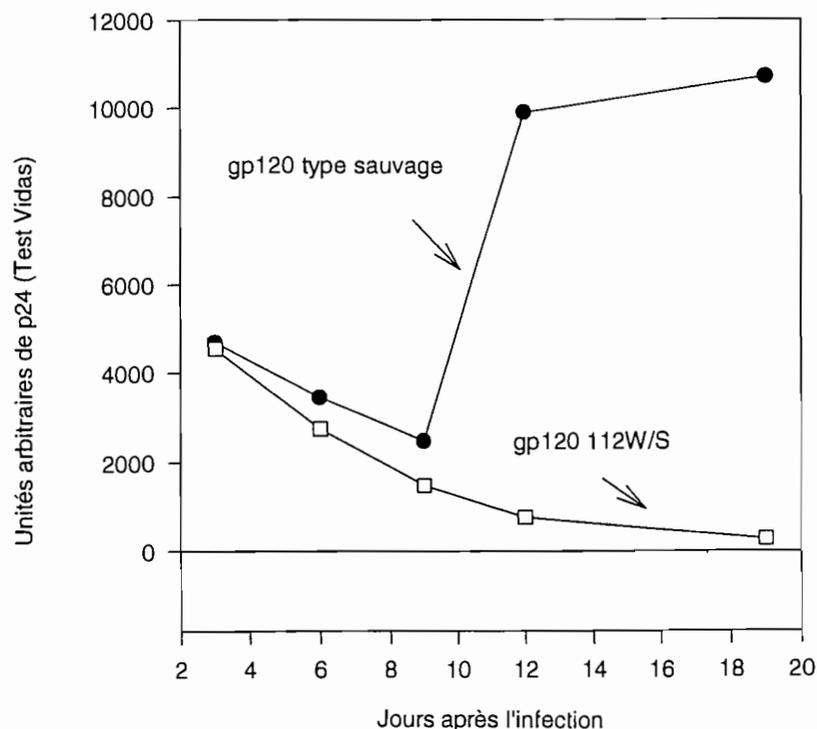


Fig. 2. Infection des lymphocytes humains par des pseudo-virus complémentés par différentes gp120.

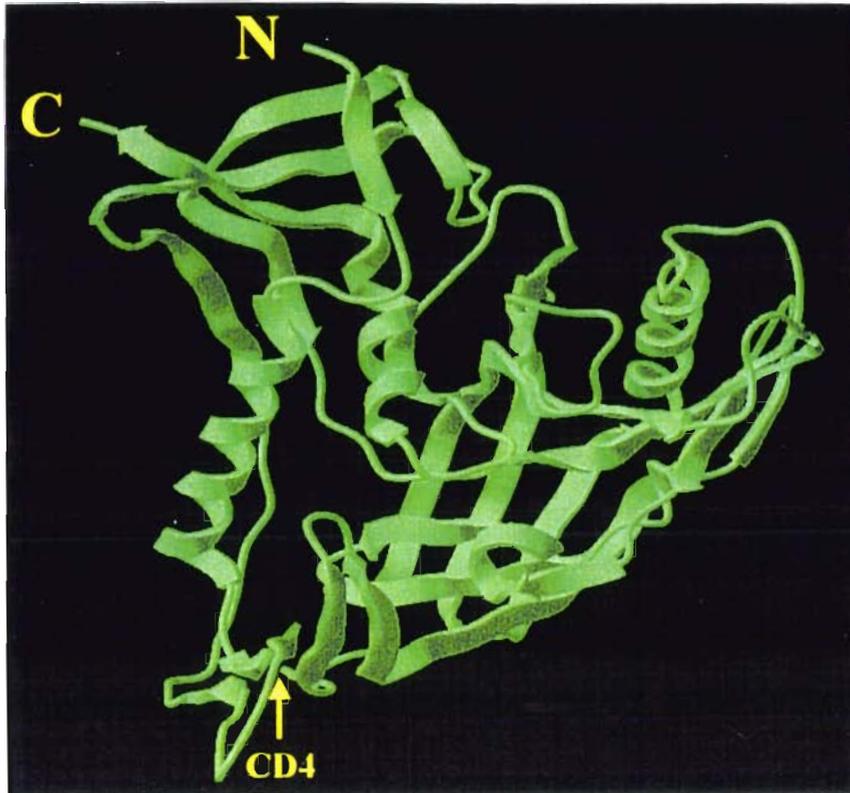


Fig. 3. Structure cristallographique de la gp120.

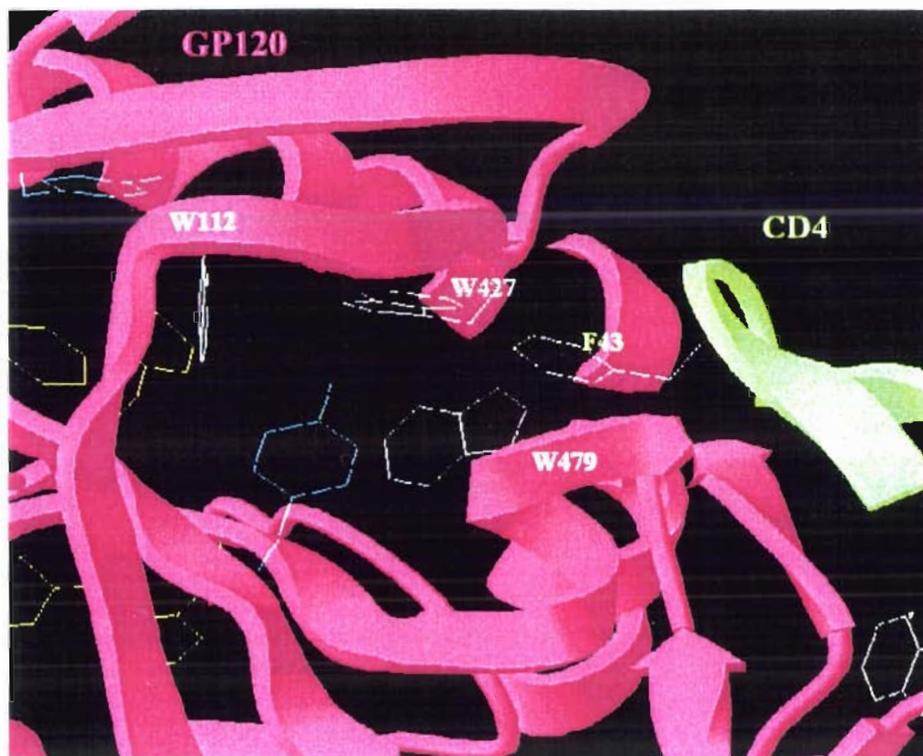


Figure 4. Structure tridimensionnelle du complexe gp120-CD4, et identification des acides aminés participant au site de liaison de la gp120 au CD4.

♦ **Analyse tridimensionnelle et localisation structurale des mutations effectuées.**

La structure cristallographique du complexe gp120-CD4-17b Fab a récemment été déterminée par Kwong et Coll. (1998) avec une résolution de 2,5 Å (Figure 3).

Nous avons analysé les coordonnées de cette structure à l'aide du logiciel Insight II, permettant de situer les acides aminés dans un contexte tridimensionnel beaucoup plus résolutif que les modèles prédictifs qui ont été à l'origine de notre démarche.

L'analyse de la structure cristallographique du complexe gp120-CD4 met en évidence un nombre de résidus réduits formant l'interface entre les deux protéines. L'interaction majoritaire entre la gp120 et le CD4 est localisée au niveau d'une poche hydrophobe, impliquant l'acide aminé W427 de la gp120 et le résidu F43 du CD4 (Wyatt et Coll., 1998) (Figure 4).

De plus, comme le montre la Figure 4, le W112 est stratégiquement localisé dans cette cavité riche en résidus aromatiques et interagit directement avec la F43 du CD4 (Figure 4). Le résidu F43 se logerait au milieu de cette poche et interagirait directement avec l'aa W112. L'interaction du W112 avec la F43 et le W427 permettrait de stabiliser l'ensemble de la poche hydrophobe. On peut noter que le W112 et le W427 sont situés à une distance inférieure ou égale à 5Å l'un de l'autre, ce qui nous indique que ces deux résidus tryptophanes sont susceptibles d'interagir fortement (Figure 5).

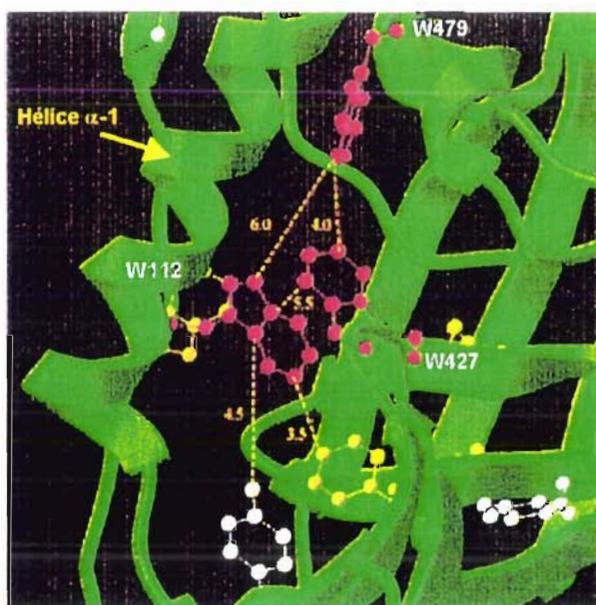


Fig. 5. Structure cristallographique de la région de la gp120 constituant la poche d'interaction avec le CD4. Les acides aminés W427 et W112 sont indiqués ainsi que les distances entre les différents résidus aromatiques.

Cette interaction pourrait être réalisée par effet d'empilement des noyaux aromatiques entre ces deux résidus ou par liaison dipôle-dipôle. De plus, ces distances peuvent s'avérer en réalité être beaucoup plus réduites en tenant compte de l'aspect dynamique des interactions moléculaires *in vivo*. Il est intéressant de noter que, dans les données cristallographiques l'acide aminé W96 n'est pas localisé dans l'hélice alpha 1 (contrairement à ce qui avait été prédit par les modèles théoriques; Gallaher et Coll., 1995; Hansen et Coll., 1996) et ne participe pas à la formation de la cavité d'interaction avec le CD4 (Figure 6).

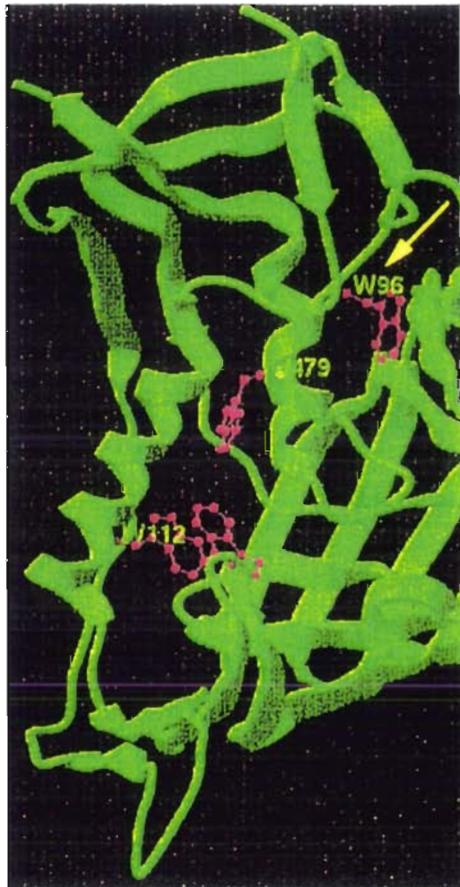


Fig. 6. Structure cristallographique de la gp120 montrant la position du résidu W96.

Discussion

Les expériences de mutagenèse dirigée sur les résidus tryptophanes de la structure conservée hélice alpha-1 de la gp120, nous ont permis d'obtenir différents mutants.

Ces mutants de gp120 ont été testés dans plusieurs systèmes biologiques :

(i) la fusion cellulaire (enveloppes mutées à la surface des cellules), (ii) les infections virales (pseudo-virus complétés par des gp120 mutées) et (iii) l'analyse de la topologie de ces gp120 mutées faite par des anticorps monoclonaux reconnaissant le « CD4 binding site » (expériences non montrées ici, en attente de répétitions de manipulations).

Ces différents travaux nous ont permis de comprendre :

- l'importance du résidu W112 dans les interactions de la gp120 avec le récepteur CD4.
- l'importance du caractère aromatique du résidu W 112. En effet, nous avons montré qu'une substitution du résidu W 112 par un résidu non aromatique tel qu'une sérine (112W/S) abolit la formation de *syncytia* entre des cellules HeLa-Tat (exprimant une gp160 contenant cette mutation) et des cellules HeLa P4. De plus, un virus contenant cette même mutation est incapable d'infecter des lymphocytes humains.

Une substitution de ce même W (résidu aromatique bicyclique) par un résidu aromatique (monocyclique) diminue ces fonctions mais ne les supprime pas.

Nos travaux donnent des résultats comparables à ceux obtenus avec les mutations 427 W/S et 427 W/F effectuées par Cordonnier et Coll (1989).

Les données cristallographiques récemment publiées (Kwong et Coll., 1998) nous ont permis de visualiser d'une part la position de l'hélice alpha 1 de la gp120 dans cette structure tridimensionnelle et d'autre part celles des résidus tryptophanes que nous avons étudiés.

Ces données ont confirmé les résultats des expériences biologiques décrites ci-dessus :

- le W 112 se trouve dans la poche hydrophobe décrite comme poche d'interaction de la gp120 au CD4 ; cette poche est constituée d'un "cluster" d'aromatique qui interagirait avec un autre résidu aromatique la F43 du CD4.

- les résidus tryptophane ont une position stratégique dans cette poche. Ainsi toute mutation de l'un d'entre eux, déstabiliserait cette cavité et donc empêcherait toute liaison avec la F43 du CD4.

Par ailleurs, les informations cristallographiques nous ont permis de constater la présence d'autres résidus aromatiques dans cette poche. L'étude des mutations de ces résidus est en cours dans notre laboratoire, afin d'évaluer leur importance dans l'interaction gp120-CD4.

Enfin, nous pouvons faire une observation liée aux « mutations naturelles » au sein des virus VIH (VIH-1 et VIH-2) : le W112 du VIH-1 est remplacé par F112 chez le VIH-2 ou le VIS (séquences publiées par Kwong et Coll., 1998), or on sait que le VIH-2 et le VIS seraient moins pathogènes que le VIH-1, donc cette mutation naturelle rejoint nos résultats sur la

mutation W/F en position 112 que nous avons effectuée et qui donne lieu à des activités atténuées de l'infection et de la fusion cellulaire.

L'approche utilisée dans ce travail concernant le rôle des structures conservées peut constituer une nouvelle façon d'aborder les interactions agents infectieux-cellules cibles. Le fait de mieux appréhender la fonctionnalité des différentes structures conservées impliquées dans les interactions agents pathogènes-cellules cibles devrait aider à la conception de molécules thérapeutiques ou immunisantes contre le VIH.

Les mutations concernant d'autres acides aminés nous informeront sur le type de forces impliquées dans les interactions virus-cellule.

CHAPITRE IV

L'interaction indépendante du CD4, entre la gp120 du VIH-1 IIIB et le CXCR4 induit leur cointernalisation dans les endosomes primaires, la phosphorylation de la PYK2 et le chimiotactisme des cellules T.

Manuscrit n° 3 - Soumis à la revue Blood

Résumé

Il est clairement démontré que la gp120 du VIH-1 peut se fixer sur les récepteurs des chimiokines indépendamment de la fixation au CD4 (Bandrés et Coll., 1998; Missé et Coll., 1998). Il était donc intéressant de savoir si cette interaction provoque des effets similaires à ceux induits par la fixation des chimiokines sur leurs récepteurs. Les chimiokines et leurs récepteurs sont impliqués dans un bon nombre de mécanismes de communications cellulaires. Les fonctions des chimiokines que nous avons testé concernent essentiellement, l'internalisation de leurs récepteurs, la mobilisation du calcium intracellulaire, l'activation de certaines protéines tyrosines kinases telles que la PYK2/CAK β (proline-rich tyrosine kinase 2 ou cell adhesion kinase β) et les ERK (extracellular-regulated kinase)/MAP (mitogen-activated protein) kinases, ainsi que l'induction d'un chimiotactisme cellulaire qui est la principale fonction des chimiokines. Afin d'étudier les effets provoqués par la fixation de la SUgp120 (HXB2) sur le CXCR4 et de façon indépendante de sa fixation sur le CD4, nous avons utilisé dans cette publication deux systèmes: (1) l'utilisation de la gp120 $\Delta\alpha$ HX1 avec des cellules CD4⁺/CXCR4⁺ ou (2) l'interaction de la gp120 wt avec des cellules CD4⁻/CXCR4⁺.

Nous avons ainsi pu montrer par microscopie confocale: (1) une internalisation du récepteur CXCR4 après interaction de la gp120 $\Delta\alpha$ HX1 sur des clones TH2 stimulés par l'IL-4, (2) une cointernalisation de la gp120 wt avec le récepteur CXCR4 dans les endosomes précoces de cellules CHOK-1 CD4⁻ / CXCR4⁺ (cette cointernalisation a été démontrée par des expériences de colocalisation avec la transférine (marqueur des endosomes précoces) (3) une faible colocalisation de la gp120 ainsi que du CXCR4 internalisés avec le LAMP-1 (marqueur des endosomes tardifs et des lysosomes).

Nous avons également observé que la gp120 wt ainsi que la gp120 $\Delta\alpha$ HX1 étaient incapables d'induire *via* le CXCR4 un flux calcique mais néanmoins activaient la protéine tyrosine kinase PYK2 (protéine activée sur tyrosine lors d'une élévation de la concentration en calcium intracellulaire). En outre, ces gp120 n'activaient pas les ERK/MAP kinases par leur interaction avec les cellules de manière CD4-indépendante.

Enfin, nous avons démontré que la transmission du signal par le CXCR4 provoqué par la fixation de la gp120 sur ce dernier entraînait un chimiotactisme des clones TH2 stimulés par l'IL-4.

Nos résultats démontrent qu'au travers du CXCR4 la gp120 est capable d'induire des effets permettant d'expliquer certains effets pathogènes de la gp120 au cours de la maladie.

A CD4-independent interaction of HIV-1 gp120 with CXCR4 induces their co-internalization, cell signaling, and T cell chemotaxis

Dorothee Misse^{1,2}, Martine Cerutti², Nelly Noraz³, Patrick Jourdan⁴,
Jean Favero⁵, Gérard Devauchelle², Hans Yssel⁴, Naomi Taylor³
and Francisco Veas^{*1,2}

¹Laboratoire d'Immunologie Rétrovirale et Moléculaire, Institut de Recherches pour le Développement, 911 Av. Agropolis, 34032 Montpellier, France. ²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), URA 2209, INRA, 30380 Saint Christol lez Alès, France, ³Institut de Génétique Moléculaire, CNRS UMR 5535, 34293, Montpellier, France; ⁴Institut National de la Recherche Médicale (INSERM), U 454, 34295 Montpellier, France; ⁵Université de Montpellier II, USTL, INSERM U 431, 34090 Montpellier, France.

The authors have reviewed the manuscript and agree with its contents (each signature is accompanied of the author name initials)

This work was supported by the Institute of Research for Development, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the World Health Organization and Sidaction-France.

*To whom correspondence should be addressed: Francisco Veas, Ph.D.

- E-mail: veas@mpl.orstom.fr
- Phone: 33 4 67 61 64 31 or 95
- Fax: 33 4 67 52 83 80

ABSTRACT

The gp120 envelope glycoprotein of HIV-1 interacts with the CXCR4 chemokine receptor but it is not known whether gp120 activates CXCR4-mediated signaling cascades in the same manner as its natural ligand, SDF1 α . We assessed the effects of wild-type gp120 and a mutant gp120 which interacts with CXCR4 but not CD4 on CD4⁻/CXCR4⁺ cells and CD4⁺/CXCR4⁺ cells, respectively. Under both experimental conditions, the interaction of CXCR4 and gp120 resulted in a CD4-independent co-internalization, followed by a translocation of both molecules into early endosomes, whereas neither protein could be detected in late endosomes. Binding of gp120 to CXCR4 resulted in a CD4-independent phosphorylation of Pyk2 and an induction of chemotactic activity demonstrating that this interaction has functional consequences. Interestingly though, while SDF1 α activated the ERK/MAP kinase pathway, this cascade was not induced by gp120. Together, these results suggest that the pathology of HIV-1 infection may be modulated by the distinct signal transduction pathway mediated by gp120 upon its interaction with CXCR4.

INTRODUCTION

Entry of HIV into target cells requires binding to CD4, as well as to one of several co-receptors, which have been identified as chemokine receptors belonging to the G-coupled seven transmembrane protein family ¹. The tropism of HIV depends on the usage of the chemokine receptor: CCR5 is primarily used by macrophagetropic (M-tropic) HIV strains, whereas lymphotropic (T-tropic) HIV strains primarily use CXCR4 as a co-receptor ²⁻⁷. However, dual tropic HIV-1 strains have been described that interact with either type of chemokine receptor. This has led to a novel classification that identifies HIV-1 strains based solely on their co-receptor usage ⁸.

Upon interaction with their receptor, SDF1 α , and RANTES, the natural ligands of CXCR4 and CCR5, respectively, are able to trigger signaling cascades, resulting in chemotaxis. In addition, a number of chemokines, including RANTES, MIP1 α , MIP1 β and SDF1 α are able to inhibit HIV-1 infection, following binding to their respective receptors⁹. Indeed, it has been demonstrated that interaction of SDF1 α with CXCR4 leads to a rapid down modulation of this receptor¹⁰⁻¹², suggesting that this phenomenon might be responsible, at least in part, for the ability of chemokines and possibly other ligands of chemokine receptors to inhibit HIV-1 infection.

The existence of a tri-molecular complex formed between CD4, gp120 and CXCR4 at the cell-surface has been reported ^{13,14}. Although the sequence of events leading to its formation has not yet been well characterized, it has been proposed that the binding of the HIV surface envelope gp120 to CD4 induces conformational changes^{15,16}, resulting in to a high affinity interaction with the co-receptors ¹⁷⁻¹⁹.

The interaction of gp120 with CD4 results in the endocytosis of the gp120-CD4 complex ²⁰⁻²⁵ with the concurrent stimulation of signaling molecules normally activated through the CD4

receptor^{23,26-28}. However, some HIV strains can infect cells in a CD4-independent pathway^{29,30} and it has recently been shown that gp120 can interact directly with CXCR4^{31,32}. Binding of the HIV envelope to one its co-receptors has been reported to induce the activation of the ERK/MAP kinase pathway, as well as the phosphorylation of the tyrosine kinase Pyk2^{33,34}. However, these studies did not exclude the involvement of CD4 in CXCR4 or CCR5-mediated signal transduction following binding of gp120. It is therefore still unclear whether gp120 can mimic its natural receptor ligand, SDF1 α , and induce a CD4-independent signaling cascade upon binding to CXCR4.

We have previously demonstrated that a recombinant gp120 protein (gp120 $\Delta\alpha$ HX1), which is deleted of its amphipatic alpha helix-1, is no longer able to bind CD4, but retains its capacity to interact with CXCR4³². Using this gp120 mutant as well as a CD4⁻/CXCR4⁻ cell line, we have analyzed the cellular localization of the CXCR4 following interaction with gp120 and addressed the question of whether the presence of CD4 is required for gp120/CXCR4-mediated signal transduction. It is demonstrated here, for the first time, that the CD4-independent interaction of HIV-1 gp120 with its co-receptor induces their co-internalization, Pyk2 phosphorylation, and T-cell chemotaxis

MATERIALS AND METHODS

Cells and culture conditions.

CD4⁺ CHO-K1 and CD4⁺ Jurkat cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), and grown in RPMI 1640 supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS; Biomedica, Toulouse, France). The CHO-K1 cell line, transfected with a CXCR4 expression vector (a generous gift of Marc Parmentier, Euroscreen Co., Bruxelles), was grown in HamF12 medium (Life Technologies, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10 % FCS and 400 µg/ml of G418. The human Th2 clone CB-828 was generated using cloning and culture conditions as previously described³⁵ and was grown in Yssel's medium (Irvine Scientific Santa Ana, CA) supplemented with 1 % AB⁻ human serum³⁶. Cell surface expression of CXCR4 on the latter cells was induced by the addition of 100 U/ml of rIL-4 in the culture medium for at least one-week prior to their use³⁷.

Antibodies and reagents.

In this study the following antibodies were used. the anti-CD4 monoclonal antibodies (mAbs) OKT4a (Ortho Diagnostic Systems, Ortho-Mune, Raritan, NJ) and ST4 (a kind gift of Dr Pierre Gros, SANOFI Recherche, Montpellier, France). the anti-CD3 UCHT1 mAb (PharMingen, La Jolla, CA), the anti-CXCR4 12G5 mAb^{38,39} kindly provided by James Hoxie (University of Pennsylvania, Philadelphia), as well as the FITC- and biotin-conjugated anti-CXCR4 12G5 mAb (R & D Systems, Oxon, UK). The anti-gp120 110.4 mAb (Genetics Systems, CA), a rabbit anti-gp120 antiserum, was produced in our laboratory after immunization with a recombinant HIV-1 IIIB gp120 (purchased at Intracel Corporation, Cambridge, MA). A FITC-conjugated anti-LAMP1 H4A3 mAb (or anti-CD107) and human transferrin coupled to Texas Red (both from Molecular Probes Europe BV, Leiden, The

Netherlands) were used for confocal microscopy studies. The anti-active ERK MAPK polyclonal Ab (Promega, Madison, WI) and anti-ERK-2 mAb (Santa Cruz Laboratories, Santa Cruz, CA), anti-Pyk2 mAb (Transduction Laboratories, Lexington, KY), anti-phosphotyrosine 4G10 mAb (Upstate Biotechnologies Inc., Lake Placid, NY) and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse secondary Abs (Amersham, Arlington Heights, IL) were used in signal transduction experiments. Stromal derived factor-1 alpha chemokine (SDF1 α) was purchased from R&D Systems.

Recombinant SUgp120 proteins.

Recombinant monomeric gp120 wild type (wt) and gp120 $\Delta\alpha$ HX1 proteins were produced in baculovirus and purified as previously described³². Briefly, a 1414 bp fragment encoding gp120 wt (from amino acid V12 to R481) was amplified by PCR, using the plasmid pHXB2R (carrying the complete genome of a clone of HIV-1 IIIB) as a template. The mutated gp120 $\Delta\alpha$ HX1 protein was generated by a deletion of 26 amino-acid residues, corresponding to the putative alpha helix-1 from the C1 region of gp120 wt. The soluble gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1 proteins were produced in insect SF9 cells infected by the respective recombinant baculovirus. Cell supernatants were collected 6 days post-infection and gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 was concentrated and immunopurified with the anti-gp120 D7324 Ab (Aalto, Dublin, Ireland) linked to bromacetyl-sepharose.

Immunofluorescence and flow cytometry analysis.

Two hundred thousand T-cells were resuspended in 50 μ l of phosphate-buffered saline (PBS), supplemented with 3 % bovine serum albumin (BSA) and 0.02 % NaN₃ in the presence of the relevant mAbs. After a 1 hr incubation with agitation at 4° C, the cells were washed twice in PBS-0.3 % BSA - 0.02 % NaN₃ and resuspended in PBS-0.3 % BSA - 0.02 % NaN₃ in the

presence of a 1/50 dilution of FITC-conjugated goat-anti-mouse Ab (Caltag, Burlingame, Ca) After an additional 1 hr incubation with agitation at 4° C, the cells were washed three times as described above, resuspended in PBS, and analyzed by single color flow cytometry using a FACSort (Becton Dickinson) and LYSIS II software. Each datum point represents the acquisition of 10,000 gated events.

Internalization assays.

Confocal microscopy studies were performed on transfected CHO-K1 cells, the T cell clone CB-828 (2×10^5 cells/ml), all of which were pre-incubated for 1 min at 37° C in an acid buffer (pH 3.0), consisting of 50 mM glycine and 100 mM NaCl, to remove any cell-bound proteins. After washing with PBS-3 % BSA, cells were incubated for 1 hr at 37° C with either gp120 proteins or SDF1 α in PBS-3 % BSA. To exclude a possible role of the CD4 in the different cellular responses induced by gp120, two different experimental procedures were used: either CD4⁻/CXCR4⁻ cells were incubated with the mutant gp120 $\Delta\alpha$ HX1 or CD4⁻/CXCR4⁻ cells were incubated with gp120 wt. After incubation with the relevant ligand, the cells were washed and fixed in PBS-3.7 % paraformaldehyde for 20 min. The cells were washed again, incubated for 15 min in PBS-0.1 M glycine to quench free aldehydes, and permeabilized by incubation with 0.05 % saponine in PBS-0.2 % BSA. Cells were incubated for 45 min at room temperature with either the anti-CXCR4 12G5 mAb or the anti-gp120 110-4 mAb, washed and subsequently incubated with an FITC- or Texas Red-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Caltag, Burlingame, CA). To identify the compartment, in which of gp120 proteins and CXCR4 were translocated following their internalization, their localization was monitored together with that of transferrin and LAMP1, markers of early and late endosomes, respectively. For this purpose, transferrin was coupled to Texas Red, and LAMP1 was detected with a FITC-conjugated anti-LAMP1 (anti-CD107) mAb. Prior to

staining with iron-loaded human transferrin, cells were incubated in serum free RPMI 1640 medium for 30 min at 37° C. Cells were slide-mounted in Mowiol, and analyzed by confocal microscopy. Simultaneous double-fluorescence acquisition was performed at wavelengths of 488 and 588 nm. The images were assembled and printed directly using Adobe Photoshop software.

Cell stimulations and immunoblot analysis.

Before stimulation, CD4⁺ Jurkat cells were cultured for 24 hr in RPMI-1640 medium, supplemented with 0.5 % FCS. For analysis of Pyk2 phosphorylation, 10⁷ cells were resuspended in 100 µl of serum free RPMI 1640 medium and incubated at 37° C for 15 min prior to stimulation with either 100 µg/ml anti-CD3 UCTH-1 mAb, 10 µg/ml of each of the gp120 proteins, 25 nM SDF1α or 10 µg/ml of the anti-CD4 ST4 mAb for different time periods. For analysis of ERK MAPK phosphorylation, 10⁶ cells were preincubated on ice for 60 min in the presence of each of the above mentioned reagents and then transferred to 37° C for the indicated times. Cells were lysed in a 1 % NP40 buffer and post-nuclear supernatants were immunoprecipitated for 1 hr at 4° C with a polyclonal anti-Pyk2 Ab, followed by collection on protein-A sepharose beads (Pharmacia, Upsalla, Sweden)⁴⁰⁻⁴². Immunoprecipitates or whole cell lysates were boiled, resolved on an 8.5 % SDS-PAGE gel and transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated for 30 min in TBS (150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.5) containing 5 % BSA and 0.1 % Tween 20 and then incubated from 1 hr with either the anti-P-tyr 4G10 mAb or an anti-active MAPK Ab which recognizes the dually phosphorylated T¹⁸³ Y¹⁸⁵ form of ERK1/2 (Promega, Madison, MD). Blots were washed in TBS containing 0.1 % Tween 20 and incubated with HRP-conjugated goat anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies. Immuno-reactive proteins were visualized using the enhanced chemiluminescence assay (Amersham). For

reblotting with the anti-Pyk2 or the anti-ERK2 mAbs, filters were stripped as previously reported⁴¹.

T cell chemotaxis.

Migration of CXCR4-expressing human T cells, in response to the chemotactic activity of SDF1 α , gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 proteins, was analyzed in Chemo Tx-96 Disposable Chambers with a 5 μ m pore size which separate the upper and lower compartments (Neuro Probe Inc., MD), using the method described by Bacon et Schall⁴³. Expression of cell surface CXCR4 was assessed by flow cytometry prior to the experiment. Twenty nine μ l of Yssel's medium 1% human serum, containing increasing concentrations of either SDF1 α , gp120 wt or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 (0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM and 1 μ M) were added to the lower wells. Fifty thousand T-cells were transferred directly in triplicate on the filter sample sites (upper compartment) in a final volume of 25 μ l. After a 1 hr incubation in 5 % CO₂ at 37° C, cells that migrated through the filter were collected in the lower compartment, resuspended in culture medium and counted through 10 power fields of a Malassez hemocytometer. Spontaneous cell migration was determined in the presence of medium alone or following the addition of SDF1 α to both upper and lower compartments. Results are expressed as the ratio (number of migrated cells in medium, containing either one of the CXCR4 ligands-number of cells migrated in medium)/total number of cells used in the assay x 100 %

RESULTS

CD4-independent internalization of cell-surface CXCR4 following interaction with a gp120 mutant protein.

Interaction of CXCR4 with its natural ligand, SDF1 α results in internalization of the receptor - ligand complex from the surface of T cells¹⁰⁻¹². To analyze whether cell surface expression of CXCR4 changes following binding to gp120, CXCR4-expressing T cells were stimulated with a recombinant wild-type gp120 protein and the expression of CXCR4 was analyzed by confocal laser scanning microscopy. As shown in Fig 1, incubation of the human T cell clone CB-828 with similar concentrations of either gp120 (Fig 1B) or SDF1 α (Fig 1D) for 1 hr at 37° C resulted in capping of CXCR4 at the cell surface and internalization of the receptor. To determine whether the gp120-induced internalization of CXCR4 was dependent on an interaction with CD4, the effect of gp120 $\Delta\alpha$ HX1, a mutant gp120 envelope protein which binds to CXCR4 but not to CD4, was assessed (Fig 1C). Similar to the effects observed with the wild type protein, incubation of T cells with gp120 $\Delta\alpha$ HX1 resulted in an internalization of CXCR4, indicating that the gp120-mediated internalization of CXCR4 can occur in the absence of a gp120-CD4 interaction.

Gp120 and CXCR4 co-internalize in early endosomes following the CD4-independent interaction of gp120 with CXCR4.

Additionally, to assess whether or not the gp120 and CXCR4 co-internalized in a CD4-independent manner, the CD4⁻/CXCR4⁻ CHO-K1 cell line was incubated with gp120 wt protein for 1 hr at 37° C and the cellular localization of the CXCR4-gp120 complex was analyzed (Fig 2C). Although a residual amount of gp120 could be detected at the surface of the cells, the majority of CXCR4 and gp120 proteins were co-localized within the cells.

demonstrating again that this process occurs independently of CD4. It is important to note that the co-localization of the gp120-CXCR4 complex can be observed in cells where endosomes are present in the same microscopic confocal laser section.

We next determined the sub-cellular localization of internalized CXCR4 and gp120 molecules following their interaction, by comparing the localization of each of these proteins with that of transferrin, a protein which is internalized and transported to early endosomes upon endocytosis, and CD107 (LAMP1), a lysosome associated membrane protein which is present exclusively in late endosomes and primary lysosomes. Following incubation of CD4⁻/CXCR4⁺ CHO-K1 cells with gp120, both CXCR4 (Fig 3 A, B, C) and gp120 (Fig 3 D) co-localized with transferrin, as detected by confocal laser microscopy. Similarly, binding of SDF1 α to CXCR4, used as a positive control, resulted in a co-localization of CXCR4 and transferrin, following endocytosis (Fig 3B). In contrast, neither gp120, nor CXCR4, could be detected in late endosomes, as shown by the absence of co-localization of either protein with LAMP1 (Fig 4). Taken together, these results indicate that following interaction of gp120 with CXCR4, the resulting receptor - ligand complex is rapidly internalized and translocated to early, but not late endosomes.

Pyk2, but not the ERK MAP kinase pathway, is activated by the binding of gp120 to CXCR4, on CD4⁻ T cells.

Interaction of CXCR4 with either SDF1 α or gp120 trigger signaling cascades, including the phosphorylation of the Pyk2 protein tyrosine kinase and the activation of the ERK/MAPK pathway^{33,34}. However, it is not clear whether binding of gp120 to CXCR4 can activate these pathways in a CD4-independent manner. As shown in Fig 5, stimulation of CD4⁻/CXCR4⁺ Jurkat cells with gp120 wt, as well as with gp120 $\Delta\alpha$ HX1 proteins, resulted in the phosphorylation of Pyk2, albeit to a lower extent than that observed upon stimulation with

SDF1 α . Additionally, as expected, Pyk2 phosphorylation was induced by engagement of the TCR/CD3 complex signaling cascade.

We next assessed the ability of gp120 to activate the ERK/MAPK pathway in CD4⁻/CXCR4⁺ Jurkat cells by measuring the dual phosphorylation of the ERK1 and ERK2 kinases on residues T¹⁸³ and Y¹⁸⁵. Stimulation of cells with either SDF1 α or an anti-CXCR4 mAb resulted in a weak, but significant, phosphorylation of both ERK1 and ERK2 as compared with the stimulations of the CD3 complex which resulted in a dramatic phosphorylation of these two proteins. Since the kinetics of ERK phosphorylation differed following CD3 and CXCR4 stimulation with maximal response at 3 and 15 minutes, respectively, the abilities of gp120 wt and gp120 $\Delta\alpha$ HX1 to induce ERK phosphorylation was assessed following both a 5 and 15 minutes stimulation at 37° C. However, irrespective of the conditions, neither gp120 wt nor gp120 $\Delta\alpha$ HX1 was able to induce the phosphorylation of ERK1/ERK2. The lack of a functional CD4 receptor on the Jurkat cells used in this study was confirmed by the inability of an anti-CD4 mAb to induce the phosphorylation of ERK1 and ERK2 (Fig 6), whereas both proteins were phosphorylated in CD4⁺ T cells following stimulation with this mAb (data not shown). Collectively, these data demonstrate that the interaction of gp120 with CXCR4, in the absence of CD4, results in a signaling cascade, which involves the phosphorylation of Pyk2, but does not induce the activation of the ERK/MAPK pathway

Gp120 induces a chemotactic response in T cells in a CD4-independent manner.

The demonstration that gp120 can induce a CXCR4-mediated signaling response prompted us to investigate whether this interaction, like the binding of SDF1 α to its receptor, would result in chemotaxis. Stimulation of CXCR4⁺ Th2 cells with either the wild type or mutant gp120 protein resulted in a similar dose-dependent chemotactic response, showing typical bell-shape curves (Fig 7). The maximal chemotactic responses induced by the gp120 wt and gp120

$\Delta\alpha$ HX1 proteins, was observed at a concentration of 100 nM with a migration of approximately 10 500 cells (22 % of the 50 000 cells). Equivalent results were observed with these two gp120 proteins indicating that the interaction of gp120 with CD4 does not modulate the capacity of gp120 to mediate a chemotactic response through the CXCR4 receptor. Interestingly, the normal “bell shape” of chemotactic response induced by SDF1 α was observed and the maximum of migration (near of 43 000 cells, 72 % of the total) was attempted at a concentration of 10 nM. The SDF1 α induced migration was significantly higher than that observed with gp120 proteins. Nevertheless, these results indicate that the gp120 of the T-tropic HIV-1 IIIB strain is able to induce a CD4-independent chemotactic response in human T cells.

DISCUSSION

In the present work, we demonstrated that the surface (SU) sub-unit of the gp120 from the T-tropic HIV-1 IIB strain induced CD4-independent cellular responses after binding to CXCR4, the fusogenic co-receptor of HIV-1. Indeed, SDF1 α , the natural ligand of the CXCR4 chemokine receptor^{44,45}, as well as gp120 both induced cell migration. To assess the importance of the gp120-CXCR4 interaction in the absence of the CD4 receptor, the experiments in the present work were performed using a gp120 $\Delta\alpha$ HX1 mutant which has been previously demonstrated to interact with CXCR4 but not with the CD4 receptor³². Additionally, equivalent results were obtained when the effects of wild type gp120 were assessed on CD4⁻/CXCR4⁻ cells.

Confocal laser scanning analysis demonstrated that CXCR4 receptor was internalized after interaction with gp120, in a CD4-independent manner. Gp120 was internalized and co-localized with CXCR4 within the early endosomes as illustrated by the co-localization of both proteins with an early endosome specific marker, transferrin. Our finding that neither CXCR4 nor gp120 was present within late endosomes suggests that CXCR4 may be recycled and re-expressed at the cell surface. Indeed, following the rapid down modulation of CXCR4 upon binding of SDF1 α , there is a subsequent re-expression of CXCR4 at the cell surface^{11,12}. The internalization of CXCR4 does not seem to be required for productive HIV-1 infection since HIV-1 can infect cells with a CXCR4 deletion, which inhibits its internalization^{10,11}. However, the presence of CXCR4 at the cell surface may be important for HIV-1 infection since its down-modulation following interaction with SDF1 α results in a decrease in HIV infection^{10,11}. In this context, the interaction of soluble gp120, shed from infected cells, with CXCR4 may inhibit HIV-1 infection by down-modulating CXCR4 levels at the cell surface. Additionally, down-modulation of surface CD4 molecules following association with the

HIV-1 envelope has been found to decrease the efficiency of subsequent HIV-1 infection⁴⁶ and in a previous work we demonstrated that both soluble the wild type gp120 and mutant gp120 proteins incubated with target cells and HIV-1 decrease the infection by the latter³². Thus, we hypothesize that co-internalization of CXCR4 and gp120, following their interaction, may be a mechanism, which prevents or decreases the infection of target cells.

The evolution and enhancement of lymphocyte infection as well as the subsequent physiopathological effects on infected lymphocytes likely results from several CXCR4-specific biological phenomena. First, at least in some instances, there is an increase in CXCR4 expression at the cell surface following T cell activation. Specifically, IL-4 treatment has been shown to result in an increase in CXCR4 expression on Th2 cells allowing them to be more efficiently infected by HIV-1³⁷. Second, we now show that gp120 can itself induce a chemotactic response in Th2 cells. Thus, the presence of soluble T-tropic gp120 during the late phase of HIV infection may participate in the recruitment (through chemotaxis) of uninfected cells to the lymph nodes. This, in turn, would increase the chance for these cells to be infected by HIV-1 and accelerate the development of AIDS. Of note, this hypothesis has been previously suggested for the M-tropic HIV-1 viruses in which chemotaxis of macrophages is induced by the interaction of gp160 with the CCR5 chemokine receptor⁴⁷.

Several groups have shown that the natural ligand of CXCR4, SDF1 α as well as gp120 triggers activation of the ERK/MAP kinase pathway^{34,37} and Pyk2 phosphorylation³³. However, in the context of the previous studies, the ability of gp120 to trigger a specific signal through CXCR4 could not be ascertained since signals could also be transduced through the CD4 receptor. Phosphorylation of the Pyk2 protein tyrosine kinase is known to be induced by ligand binding to G-protein-coupled receptors and its activation is clearly dependent on changes in osmolarity induced by the mobilization of Ca²⁺ from internal stores. In addition, Pyk2 can function as an upstream mediator of the ERK/MAPK and/or

JUN/MAPK signaling pathways⁴⁰. In the present work, we demonstrate that the binding of HIV-1 IIIB gp120 to CXCR4 triggers Pyk2 phosphorylation following Ca^{2+} mobilization in a CD4-independent manner. These data are supported by previous work showing that gp120-induced phosphorylation of Pyk2 in CD4^- cells is partially inhibited by the anti-CXCR4 12G5 mAb³³. Interestingly though, we did not observe any phosphorylation of ERK1/2 MAPK after stimulation with gp120 even though SDF1 α clearly induced ERK1/2 phosphorylation in a CD4-independent manner. Thus, gp120 and SDF1 α appear to differentially activate CXCR4-mediated signaling cascades. This is the first demonstration that interaction of different CXCR4 ligands induce distinct transduction pathways.

The ability of HIV-1 IIIB gp120 to bind the CXCR4 chemokine receptor and induce Pyk2 phosphorylation and chemotaxis suggests that this association plays a major role in the activation status of the cells and may contribute to the evolution of HIV infection. Additionally, the physiological changes induced by the binding of gp120 to CXCR4 on target cells may induce alterations in intracellular structures which favor HIV infection through cell-to-cell contact^{48,49}. An understanding of the processes involved in SU binding and fusion of HIV envelopes will allow the development of new strategies to better control HIV infection.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was made possible with the generosity and kindness of our colleagues to whom we are indebted and grateful for their scientific and technical input. We especially thank Marc Sitbon for reagents and insightful discussions, Marc Parmentier for generously providing plasmids and cell lines; James Hoxie for the 12G5 mAb and François Traincard for anti-gp120 mAbs; Christophe Duperay, Nicole Lautredu, Bernard Geoffroy, Arnaud Dupuy d'Angeac and Ilias Stefas for helpful discussions and technical assistance, and Jeanne Anne Ville for her continuous encouragement

REFERENCES

1. Baggiolini M, Dewald B, Moser B: Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 15:675, 1997
2. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA: HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272:872, 1996
3. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA: HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC- CKR-5. *Nature* 381:667, 1996
4. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR: Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381:661, 1996
5. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA: CC CKR5: a RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272:1955, 1996
6. Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR: Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* 388:296, 1997
7. Horuk R, Hesselgesser J, Zhou Y, Faulds D, Halks-Miller M, Harvey S, Taub D, Samson M, Parmentier M, Rucker J, Doranz BJ, Doms RW: The CC chemokine I-309 inhibits

CCR8-dependent infection by diverse HIV-1 strains. *J Biol Chem* 273:386, 1998

8. Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA: A new classification for HIV-1 [letter] *Nature* 391:240, 1998
9. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P: Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270: 1811, 1995
10. Amara A, Legall S, Schwartz O, Salamero J, Montes M, Loetscher P, Baggiolini M, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1 α -dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J. Exp. Med* 186:139, 1997
11. Signoret N, Oldridge J, Pelchen-Matthews A, Klasse PJ, Tran T, Brass LF, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Holmes W, Dallas W, Luther MA, Wells TN, Hoxie JA, Marsh M Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol* 139:651, 1997
12. Föster R, Kremmer E, Schubel A, Breitfeld D, Kleinschmidt A, Nerl C, Bernhardt G, Lipp M: Intracellular and surface expression of the HIV-1-coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J. Immunol.* 160:1522, 1998

13. Lapham CK, Ouyang J, Chandrasekhar B, Nguyen NY, Dimitrov DS, Golding H
Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* 274:602, 1996
14. Ugolini S, Moulard M, Mondor I, Barois N, Demandolx D, Hoxie J, Brelot A, Alizon M, Davoust J, Sattentau QJ: HIV-1 gp120 induces an association between CD4 and the chemokine receptor CXCR4. *J Immunol* 159:3000, 1997
15. Sattentau QJ, Moore JP: Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J Exp Med* 174:407, 1991
16. Sattentau QJ, Moore JP, Vignaux F, Traincard F, Poignard P: Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J Virol* 67:7383, 1993
17. Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J: CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384:179, 1996
18. Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ, Moore JP: CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 384:184, 1996
19. Wyatt R, Desjardin E, Olshevsky U, Nixon C, Binley J, Olshevsky V, Sodroski J

- Analysis of the interaction of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* 71:9722, 1997
20. Hoxie JA, Alpers JD, Rackowski JL, Huebner K, Haggarty BS, Cedarbaum AJ, Reed JC
Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV *Science*
234:1123, 1986
21. Yuille MA, Hugunin M, John P, Peer L, Sacks LV, Poiesz BJ, Tomar RH, Silverstone
AE. HIV-1 infection abolishes CD4 biosynthesis but not CD4 mRNA. *J Acquir Immune*
Defic Syndr 1:131, 1988
- 22 Amadori A, De Silvestro G, Zamarchi R, Veronese ML, Mazza MR, Schiavo G, Panozzo
M, De Rossi A, Ometto L, Mous J, et al CD4 epitope masking by gp120/anti-gp120
antibody complexes. A potential mechanism for CD4+ cell function down-regulation in
AIDS patients *J Immunol* 148:2709, 1992
23. Cefai D, Ferrer M, Serpente N, Idziorek T, Dautry-Varsat A, Debre P, Bismuth G
Internalization of HIV glycoprotein gp120 is associated with down-modulation of
membrane CD4 and p56lck together with impairment of T cell activation *J Immunol*
149:285, 1992
24. Callahan KM, Rowell JF, Soloski MJ, Machamer CE, Siliciano RF. HIV-1 envelope
protein is expressed on the surface of infected cells before its processing and presentation
to class II-restricted T lymphocytes *J Immunol* 151:2928, 1993

25. Rowell JF, Stanhope PE, Siliciano RF: Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. *J Immunol* 155:473, 1995
26. Gupta S, Vayuvegula B: Human immunodeficiency virus-associated changes in signal transduction. *J Clin Immunol* 7:486, 1987
27. Kornfeld H, Cruikshank WW, Pyle SW, Berman JS, Center DM: Lymphocyte activation by HIV-1 envelope glycoprotein. *Nature* 335:445, 1988
28. Pelchen-Matthews A, Armes JE, Marsh M: Internalization and recycling of CD4 transfected into HeLa and NIH3T3 cells. *Embo J* 8:3641, 1989
29. Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, Ahuja M, Turner JD, McKnight A, Thomas JF, Stoebenau-Haggarty B, Choe S, Vance PJ, Wells TN, Power CA, Sutterwala SS, Doms RW, Landau NR, Hoxie JA: CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* 87:745, 1996
30. Hesselgesser J, Halks-Miller M, DelVecchio V, Peiper SC, Hoxie J, Kolson DL, Taub D, Horuk R: CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr Biol* 7:112, 1997
31. Bandres JC, Wang QF, O'Leary J, Baleaux F, Amara A, Hoxie JA, Zolla-Pazner S, Gorny MK: Human immunodeficiency virus (HIV) envelope binds to CXCR4 independently of CD4, and binding can be enhanced by interaction with soluble CD4 or by HIV envelope

deglycosylation. *J Virol* 72:2500, 1998

32. Missé D, Cerutti M, Schmidt I, Jansen A, Devauchelle G, Jansen F, Veas F. Dissociation of the CD4 and CXCR4 binding properties of human immunodeficiency virus type 1 gp120 by deletion of the first putative alpha-helical conserved structure. *J Virol* 72:7280, 1998
33. Davis CB, Dikic I, Unutmaz D, Hill CM, Arthos J, Siani MA, Thompson DA, Schlessinger J, Littman DR. Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J Exp Med* 186:1793, 1997
34. Popik W, Hesselgesser JE, Pitha PM. Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway. *J Virol* 72:6406, 1998
35. Spits H, Yssel H, Terhorst C, de Vries JE. Establishment of human T lymphocyte clones highly cytotoxic for an EBV transformed B cell line in serum-free medium: isolation of clones that differ in phenotype and specificity. *J. Immunol.* 128:95, 1982
36. Yssel H, de Vries JE, Koken M, Van Blitterswijk W, Spits H. Serum-free medium for the generation and propagation of functional human cytotoxic and helper T cell clones. *J. Immunol. Methods* 72:219, 1984
37. Jourdan P, Abbal C, Noraz N, Hori T, Uchiyama T, Bousquet J, Taylor T, Pène J, Yssel H. Interleukin-4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 on human T cells

J. Immunol. 160:4153, 1998

38. Endres MJPR, Clapham M, Marsh M, Ahuja J, Davis-Turner A, Mcknight A, Thomas JF, Stoebenau-Haggarty, Choe S, Vance PJ, Wells TNC, Power CA, Sutterwala SS, Doms RW, Landau NR, Hoxie JA: CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR-4. *Cell* 87:745, 1996
39. BreLOT A, Heveker N, Pleskoff O, Sol N, Alizon M: Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity *J Virol* 71:4744, 1997
40. Tokiwa G, Dikic I, Lev S, Schlessinger J: Activation of Pyk2 by stress signals and coupling with JNK signaling pathway *Science* 273:792, 1996
41. Taylor N, Uribe L, Smith S, Jahn T, Kohn DB, Weinberg K. Correction of interleukin-2 receptor function in X-SCID lymphoblastoid cells by retrovirally mediated transfer of the gamma-c gene. *Blood* 87:3103, 1996
42. Dikic I, Tokiwa G, Lev S, Courtneidge SA, Schlessinger J: A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383:547, 1996
43. Bacon KB, Schall TJ: Chemokine-induced lymphocyte migration: analysis by filter-based bioassays, in (eds): 5th edition. Malden, MA, Blackwell Science, Inc., 1997, p 71
44. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B

The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382:833, 1996

45. Bleul CC, Wu LJ, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR: The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94:1925, 1997
46. Pang S, Koyanagi Y, Miles S, Wiley C, Vinters HV, Chen IS: High levels of unintegrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients. *Nature* 343:85, 1990
47. Weissman D, Rabin RL, Arthos J, Rubbert A, Dybul M, Swofford R, Venkatesan S, Farber JM, Fauci AS: Macrophage-tropic HIV and SIV envelope proteins induce a signal through the CCR5 chemokine receptor. *Nature* 389:981, 1997
48. Dayanithi G, Yahi N, Baghdiguian S, Fantini J: Intracellular calcium release induced by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) surface envelope glycoprotein in human intestinal epithelial cells: a putative mechanism for HIV-1 enteropathy. *Cell Calcium* 18:9, 1995
49. Iyengar S, Hildreth JE, Schwartz DH: Actin-dependent receptor colocalization required for human immunodeficiency virus entry into host cells. *J Virol* 72 5251, 1998

LEGENDS OF FIGURES

FIGURE 1 CD4-independent internalization of cell-surface CXCR4 following interaction with gp120. Cell surface expression of CXCR4 on the human Th2 clone CB-828 (A) was analyzed by flow cytometry following staining with an isotype-matched control mAb (a), and the FITC-conjugated anti-CXCR4 12G5 mAb (b). The Th2 cells (clone CB-828) were incubated with either gp120 wt (10 μ g/ml; B), a mutant gp120 $\Delta\alpha$ HX1 which associates with CXCR4 but not CD4 (10 μ g/ml, C), SDF1 α (10 μ g/ml, D), or medium alone (E) for 1 hr at 37° C. After fixation and permeabilization, the cells were stained with a FITC-conjugated anti-CXCR4 12G5 mAb and analyzed by confocal microscopy as described in the Materials and Methods.

FIGURE 2 CD4-independent internalization of the CXCR4-gp120 complex from the cell surface of a CD4⁻/CXCR4⁺ cell line. To assess CXCR4 (A) and CD4 (B) receptor surface expression by single color flow cytometry analysis, cells were incubated for 1 hr at 4° C with either medium alone (control cells, a), the anti-CXCR4 12G5 mAb (A, b) or the anti-CD4 mAb OKT4a (B, b). Cells were stained with an anti-IgG mouse FITC. To analyze the sub-cellular localization of CXCR4 and gp120, CHO-K1 cells were incubated with 10 μ g/ml of gp120 wt (C), or medium alone (D) for 1 hr at 37° C. After fixation and permeabilization, cells were stained with a rabbit anti-gp120 anti-serum and a Texas Red-conjugated anti-rabbit IgG as well as the FITC-conjugated anti-CXCR4 12G5 mAb, such that the intracellular presence of gp120 was observed as a red fluorescence and that of CXCR4 as a green fluorescence. The superposition of the two fluorochromes (yellow) is

indicative of a co-localization of gp120 and CXCR4. This co-localization can only be observed in cells where endosomes are observed in the same microscopic confocal laser section

FIGURE 3. CD4-independent internalization of CXCR4 and gp120 in early endosomes. CD4⁻/CXCR4⁺ CHO-K1 cells were incubated in medium alone (A), in medium with 10 µg/ml of SDF1α (B) or 10 µg/ml of gp120 wt (C and D) in the presence of 125 µg/ml of Texas Red-conjugated transferrin for 1hr at 37° C. After fixation and permeabilization, the cells were stained with the FITC-conjugated anti-CXCR4 12G5 mAb (A, B, C), or the anti-gp120 110-4 mAb and a FITC-conjugated anti-mouse IgG (D). The intracellular localizations of CXCR4 and transferrin (A, B, C) or gp120 and transferrin (D) were analyzed by confocal microscopy. Yellow spots are indicative of the co-localization of transferrin (red) with either CXCR4 (green) or gp120 (green) in early endosomes.

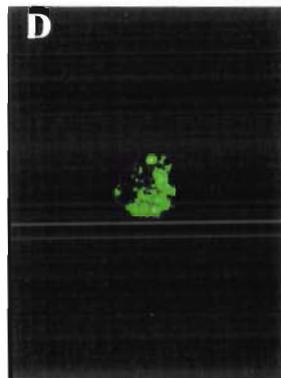
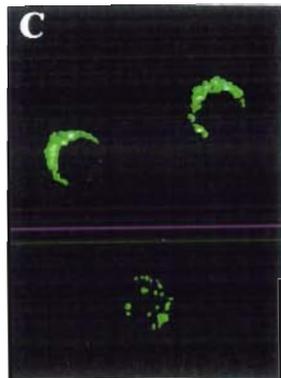
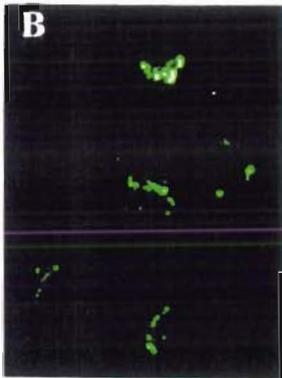
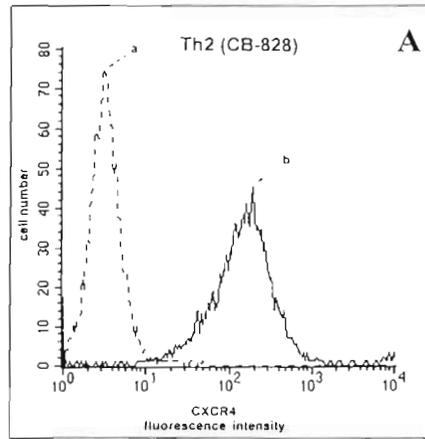
FIGURE 4. Absence of internalized CXCR4-gp120 complex in late endosomes. CD4⁻/CXCR4⁺ CHO-K1 cells were incubated in the presence of either 10 µg/ml of gp120 wt (A and D), 10 µg/ml of gp120 ΔαHX1 (B and E) or medium alone (C and F) for 1 hr at 37° C. After fixation and permeabilization, the intracellular presence of CXCR4 (red, A, B, C), gp120 (red, D, E, F) and CD107 (green) was analyzed by confocal microscopy. Cells were stained with either the biotin-conjugated anti-CXCR4 12G5 mAb followed by staining with Texas Red-conjugated streptavidin (A, B, C) or a rabbit anti-gp120 anti-serum followed by staining with a Texas Red-conjugated anti-rabbit IgG (D, E, F). Co-expression of CD107 was assessed following staining of the cells with 10 µl of the anti-CD107

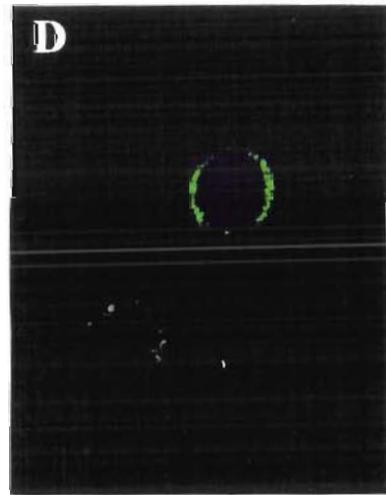
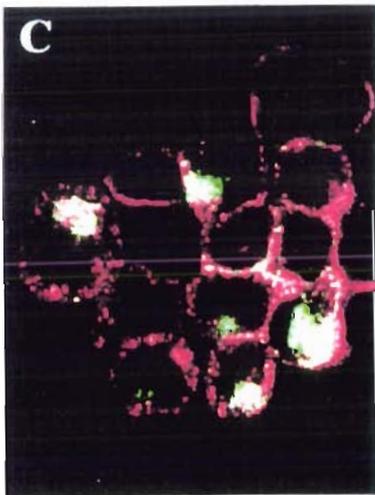
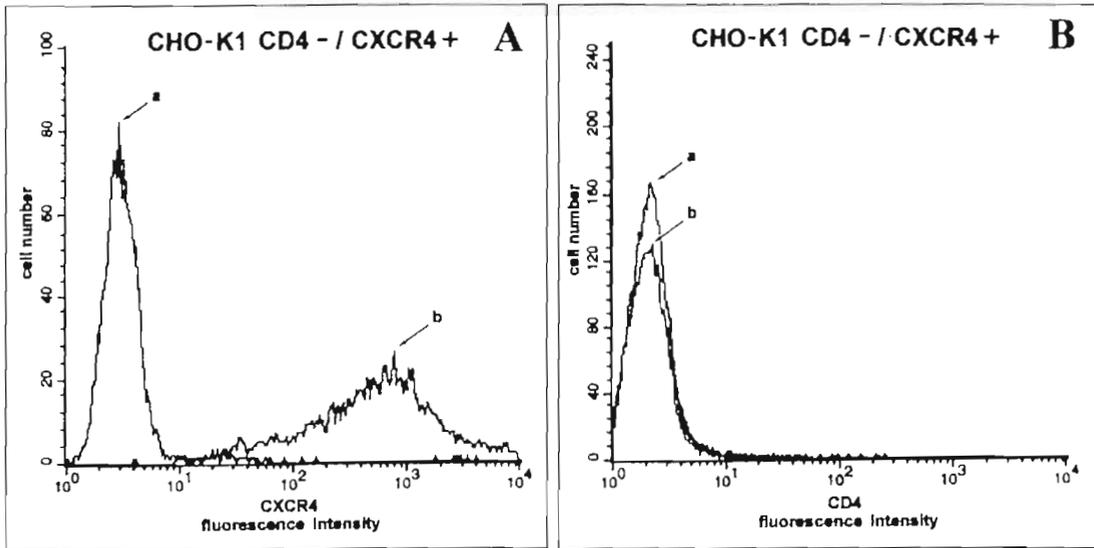
FITC-conjugated mAb.

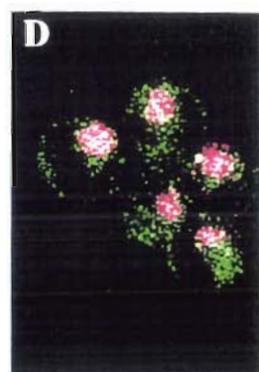
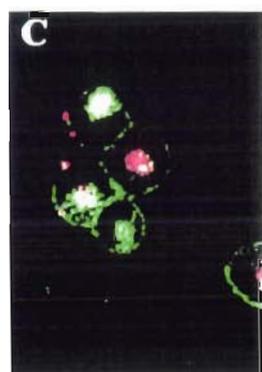
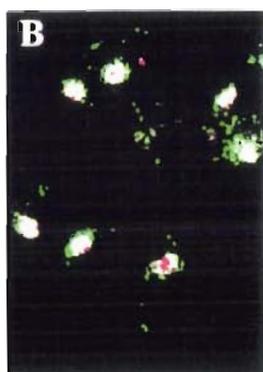
FIGURE 5. Binding of gp120 to CXCR4 results in a CD4-independent phosphorylation of Pyk2. Cell surface expression of CXCR4 and CD4 on CD4⁻ Jurkat cells was analyzed by flow cytometry (A), following staining of the cells with the anti-CD4 OKT4a mAb (a), the anti-CXCR4 12G5 mAb (b), or an isotype-matched control mAb (c). CD4⁻ Jurkat cells were incubated with either gp120 wt (10 µg/ml), gp120 ΔαHX1 (10 µg/ml), SDF1α (100 nM), or the anti-CD3 UCHT-1 mAb (10 µg/ml) for the indicated time periods at 37° C (B). Immediately after incubation, cells were lysed and Pyk2 was immunoprecipitated with an anti-Pyk2 Ab. The tyrosine phosphorylation status of Pyk2 was analyzed by immunoblotting using an anti-phosphotyrosine (anti-pTyr) monoclonal antibody. The immunoblot was stripped and reblotted with an anti-Pyk2 Ab (anti-Pyk2) to ensure that equivalent levels of Pyk2 were immunoprecipitated in each lane

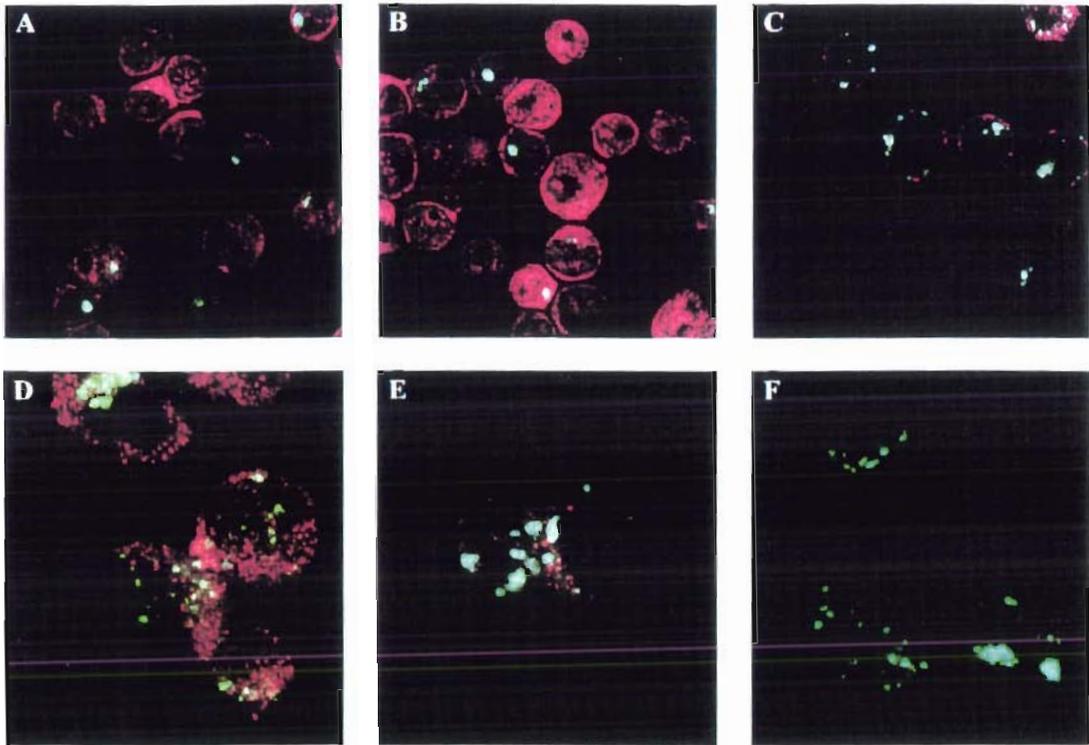
FIGURE 6. Binding of gp120 to CXCR4 does not involve activation of the ERK1/ERK2 MAP kinase pathway. CD4⁺/CXCR4⁻ Jurkat cells were preincubated in medium alone or in the presence of gp120 wt (10 µg/ml), gp120 ΔαHX1 (10 µg/ml), SDF1α (25 nM), the anti-CXCR4 12G5 mAb (10 µg/ml), the anti-CD3 UCHT-1 mAb (10 µg/ml) or the anti-CD4 ST4 mAb (10 µg/ml) for 60 min on ice. Stimulations were then performed at 37° C for the indicated time periods prior to lysis. ERK1/ERK2 activation was assessed using a polyclonal anti-active MAP kinase Ab. The immunoblot was then stripped and reblotted with an anti-ERK2 mAb.

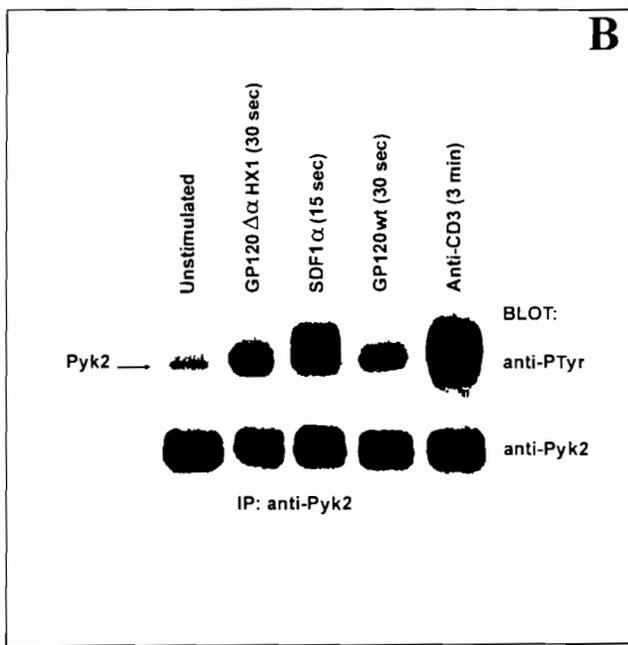
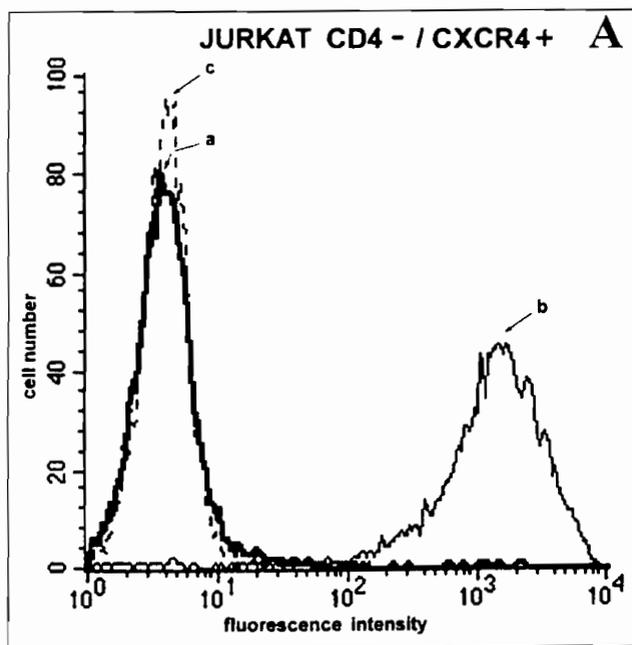
FIGURE 7. HIV-1 IIIB gp120 induces a chemotactic response in T cells in a CD4-independent manner. Migration of the human Th2 cell clone CB-828 in response to stimulation with increasing amounts (from 10^{-1} nM to 10^3 nM) of SDF1 α (circles), gp120 wt (squares) or gp120 $\Delta\alpha$ HX1 (triangles), was analyzed in an *in vitro* migration assay as described in the Material and Methods. The data depicted are representative of one of three independent experiments. Each point represents the mean ratio of the migrated cells \pm standard deviation (SD) from a representative experiment performed in triplicate.

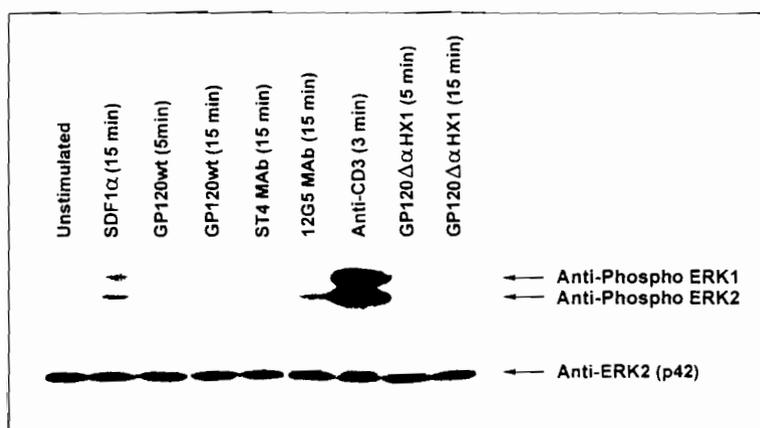


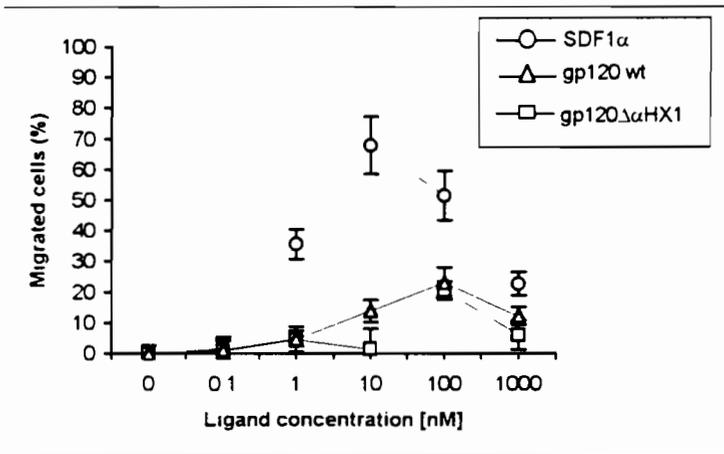












DISCUSSION

La gp120 permet au VIH-1 de se fixer sur le CD4 ainsi que sur les récepteurs de chimiokines. Dans cette publication, nous avons essayé de comprendre les fonctions induites par la gp120 sur les récepteurs de chimiokine. Sachant que nous travaillons avec une gp120 provenant d'une souche virale lymphotrope (HXB2), le co-récepteur du VIH-1 approprié fut le CXCR4.

Nous avons clairement démontré que la fixation de la gp120 (de façon similaire au ligand naturel du CXCR4, SDF1 α) sur des cellules CD4 négatives exprimant le CXCR4 était suivie d'une cointernalisation du complexe gp120/CXCR4 dans les endosomes précoces. Ces observations suggèrent que les glycoprotéines qui se détachent de la surface des virions régulent négativement l'expression des récepteurs CXCR4 et contribuent ainsi de manière significative à la vitesse d'infection. L'internalisation ainsi que le recyclage possible des récepteurs de chimiokines peuvent moduler les interactions fonctionnelles du récepteur avec les protéines d'enveloppe du VIH durant les étapes initiales de l'infection. Ce mode d'action du virus pourrait empêcher la superinfection des cellules, en diminuant le taux de récepteurs à la surface cellulaire (Pang et Coll., 1990). Il serait intéressant de voir si le virus entier comme la gp120, rentre dans les cellules par endocytose du co-récepteur utilisé. Le rôle de l'endocytose dans l'infection virale n'est pas encore élucidé (Maddon et Coll., 1986; Stein et Coll., 1987, Bedinger et Coll., 1988; McClure et Coll., 1988; Pauza et Price., 1988; Gelezunias et Coll., 1994 ; Amara et Coll., 1997 ; Signoret et Coll., 1997). L'internalisation du CXCR4 induit par la fixation de la gp120 observée lors de nos travaux peut suggérer l'existence d'une bonne affinité entre la gp120 et le CXCR4 et expliquer l'inhibition de l'infection virale par la gp120 $\Delta\alpha$ HX1 (Missé et Coll., 1998)

Nos travaux montrent que la transmission du signal par le récepteur CXCR4 provoque une entrée de calcium, observée de manière indirecte par l'activation de la protéine tyrosine kinase PYK2. La protéine PYK2 est activée par une élévation de la concentration cytoplasmique de calcium, elle répond électivement à la dépolarisation et à l'influx calcique qui en résulte (Lev et Coll., 1995, Tokiwa et Coll., 1996) Ces effets ont également été démontré par Davis et Coll (1997) avec une fixation de gp120 provenant d'isolats viraux M-tropiques sur le récepteur CCR5. La gp120 dans des cultures de neurones hippocampiques, induit une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, les voies intracellulaires activées par cette interaction semblent impliquer l'oxyde d'azote qui provoque par la suite des effets cytotoxiques (Brenneman et Coll., 1988, Dreyer et Coll.,

1990; Dawson et Coll., 1993). De telles interactions pourraient ainsi influencer les voies de transmission de signaux et pourraient expliquer des données antérieures indiquant la toxicité de la gp120 soluble dans les cellules en culture.

Avant la connaissance de l'existence des co-récepteurs du VIH-1, différentes équipes ont démontré que l'interaction gp120-CD4 était associée à une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire et une dépolarisation de la membrane, suggérant l'existence d'une étape d'activation (Gupta et Vayuvegula., 1987; Kornfeld et Coll., 1988; Neudorf et Coll., 1990). De la même manière, Dayanithi et Coll. (1995) ont montré que la fixation de la gp120 sur des cellules épithéliales de l'intestin CD4⁺/GalCer⁻ entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, qui affecte l'intégrité du réseau de microtubules des entérocytes. On sait aujourd'hui que la dégradation de l'ADN produite lors du processus d'apoptose (mort cellulaire programmée, ou mort induite par l'activation) peut-être induite plus rapidement si on augmente la mobilisation intra-cellulaire du Ca²⁺, par exemple à l'aide du ionophore calcique la ionomycine (Jones et Coll., 1989). L'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium pourrait donc contribuer au processus d'apoptose dans la pathogénèse du VIH.

La PYK2 a été mise en évidence dans les cellules PC12. Dans ces cellules, elle est stimulée par la dépolarisation, l'acétylcholine et peut phosphoryler les canaux K⁺ et activer plusieurs effecteurs de la voie Ras / MAP kinase (MAPK), conduisant à l'expression de gènes de cytokines inflammatoires (Lev et Coll., 1995). Dans nos conditions expérimentales nous n'avons pu observer aucune activation de la cascade des ERK/MAP kinases lors de la fixation de la gp120 sur le CXCR4. L'activation de cette voie par la gp120 pourrait se produire *via* une interaction avec le récepteur CD4. En effet, Popik et Coll. (1998) ont récemment montré une activation par la gp120 de la voie des ERK/MAP kinases au travers du CD4. De plus, la PYK2 est capable de stimuler aussi bien la cascade des ERK/MAP kinases que la voie d'activation de JNK (NH₂ Jun terminal kinases) Il se pourrait donc que l'activation de la PYK2 par la gp120 sur le CXCR4 ait stimulé la voie d'activation de JNK et non celle des ERK/MAP kinases. On sait également que les molécules hétérotrimériques de GTP liées aux protéines G sont capable de stimuler JNK (Briant et Coll., 1998)

Les MAP kinases sont localisés à un point crucial dans les systèmes des seconds messagers intracellulaires qui régulent la croissance et la différenciation cellulaire

Récemment, Briant et Coll. (1998) ont montré que l'activation des ERK/MAP kinases est une étape intermédiaire dans la cascade des événements qui régulent l'activation des facteurs de transcription NF-κB et AP-1 (activated protein 1) lors de l'interaction de la

gp120 avec le CD4. Cette activation pourrait contribuer au dysfonctionnement des cellules, qui pourrait être due à une activation des gènes cellulaires résultant en une expression aberrante des cytokines telles que, l'IL-6, l'IL-10, l'IFN- γ et le TNF- α (Chirmule et Pahwa., 1996; Popik et Coll., 1998). L'infection à VIH peut ainsi entraîner une modulation de l'expression des gènes des cytokines.

Récemment, il a été rapporté par des études de compétition que le complexe VIH-CD4 soluble (iHIV pour HIV-induced) ou l'incubation du complexe gp120/anti-gp120 avec le CD4 soluble entraîne une abolition de l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1. Ceci indiquant que, les voies de transduction des signaux liées au CXCR4 ne sont pas prédominantes après la fixation de la gp120 sur le CD4. Mais, la possibilité d'une implication du CXCR4 au moins ou en partie après fixation directe du VIH sur ce co-récepteur ou à travers un cocapping avec le CD4 n'est pas à exclure. Tous ces arguments vont dans le sens d'une activation de la cascade des ERK/MAP kinases par une fixation préalable de la gp120 sur le récepteur CD4.

L'activation directe ou indirecte de plusieurs voies de transmission du signal par la fixation de la gp120 à la surface des cellules pourrait aboutir à une activation de la transcription de certains gènes qui contrôlent la différenciation et la division des cellules eucaryotes. Ce dérèglement pourrait être impliqué dans la cancérogénèse ainsi que dans les phénomènes d'apoptose. En effet, il a été montré que la fixation de la gp120 sur des cellules neuronales et gliales entraîne une activation de JNK et, des ERK/MAPK indiquant que la gp120 pourrait être un effecteur induisant l'apoptose dans le système nerveux central (Lannuzel et Coll, 1997).

Ces informations montrent l'importance de l'étude de ces voies d'activation cellulaire après le contact des cellules par un agent infectieux. L'activation ou l'altération des voies de transduction des signaux lors de la fixation du VIH sur ses récepteurs ou co-récepteurs pourrait avoir des conséquences dans la pathogénèse du SIDA.

La fonction majeure des chimiokines est d'attirer des leucocytes sur le site inflammatoire (Baggiolini et Coll, 1994, Loetscher et Coll, 1996). Nos travaux montrent que la gp120 wt ainsi que la gp120 $\Delta\alpha$ HX1 induisent un chimiotactisme des clones TH2 stimulés par l'IL-4. Cette observation est importante car elle suggère que le récepteur CXCR4 pourrait être directement impliqué dans l'activation persistante du système immunitaire qui caractérise l'infection par le VIH. En outre, on sait que la réplication virale est plus efficace dans les cellules actives. On peut penser que l'activation induite par l'accrochage de la protéine d'enveloppe sur les récepteurs de chimiokines pourrait contribuer à la pathogénèse en attirant

des lymphocytes T sur le site de réplication, favorisant ainsi la propagation du virus. Des résultats semblables ont été rapportés récemment avec l'utilisation d'une gp160 à tropisme macrophagique (Weissman et Coll., 1997).

A partir de ces travaux et d'autres (Davis et Coll., 1997; Weissman et Coll., 1997), il est clair que les gp120 reproduisent en partie les effets produits lors de la fixation des chimiokines sur leur récepteur, résultant en l'activation des protéines G hétérodimériques, du flux calcique et la phosphorylation de tyrosines. De tels signaux peuvent avoir des rôles importants dans les étapes de la réplication virale qui se produisent après l'entrée du virus dans la cellule; ils pourraient aussi avoir des conséquences pathogènes pour les cellules non infectées. Par exemple on ne sait pas si la mort des cellules neuronales chez les patients infectés par le VIH est due à une infection directe des cellules ou de manière indirecte par des effets secondaires de l'interaction des neurones avec des produits viraux ou cellulaires relargués par les cellules infectées.

Ces différents travaux contribuent à la compréhension de la spécificité des mécanismes induits par chaque récepteur après leur interaction avec le virus ou les glycoprotéines d'enveloppe. Toutefois, il est très probable que ces différents récepteurs peuvent s'interéguler, et qu'il y ait un croisement des différentes voies d'activation cellulaires.

CHAPITRE V

Conclusion Générale et Perspectives

Conclusion générale et Perspectives

Actuellement, les équipes travaillant sur le VIH cherchent à mieux appréhender les interactions virus-cellules cibles afin de trouver des mécanismes permettant de bloquer l'infection virale. Pour pouvoir pénétrer dans les cellules qu'il infecte, le VIH doit tout d'abord interagir avec les protéines membranaires de l'hôte. La connaissance des sites d'interaction du virus avec les cellules cibles est donc capital.

La définition des épitopes viraux reconnus par les anticorps capables de neutraliser l'infection est l'axe de travail privilégié des dernières années par les équipes engagées dans la production de vaccins contre le VIH.

De manière générale, les agents pathogènes infectent l'hôte en utilisant des structures conservées. Ces structures sont capables de reconnaître et d'interagir avec les récepteurs cellulaires. Ces structures doivent être préservées de la variabilité, dans un but d'efficacité de l'infection dont dépend leur survie. Dans le cas contraire, il s'agirait d'un « suicide collectif » et par conséquent un arrêt de l'infection induite. Fréquemment ces régions constantes (séquences ou structures) sont soumises à une très forte pression de sélection qui maintient les structures indispensables, éléments majeurs de l'identité de chaque famille d'agent pathogène et, au-delà, de tout être vivant.

La variabilité antigénique du VIH, comme d'autres agents infectieux (*Plasmodium falciparum* agent du paludisme), a pour conséquence, de permettre l'échappement du virus à l'immuno-surveillance de l'hôte. Cette variabilité antigénique que l'on constate chez le VIH est une conséquence des mutations des régions hypervariables de la SU gp120 de l'enveloppe du VIH, désignées comme V1-V5.

Ce sont ces réflexions qui nous ont orienté vers la thématique concernant l'étude des interactions entre les structures conservées du VIH et les récepteurs des cellules cibles. Parmi les structures conservées, nous avons choisi de débiter nos travaux sur les hélices α car ces structures sont généralement impliquées dans des interactions diverses (interactions avec des protéines, des lipides ou avec l'ADN).

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse nous ont permis de définir une région supplémentaire impliquée dans l'interaction de la gp120 avec le récepteur CD4. Par délétion de l'hélice alpha 1 de la gp120, nous avons obtenu une molécule qui n'interagit plus avec le CD4 mais est capable de se lier au co-récepteur CXCR4. La délétion de l' α HX1 de la gp120 démontre l'importance des structures en hélice α conservées dans les mécanismes de reconnaissance et d'infectivité des cellules de l'hôte. Ce mutant de gp120 (gp120 $\Delta\alpha$ HX1) peut servir également d'outil, permettant de comprendre les différents mécanismes d'interaction de la gp120 avec les cellules hôtes indépendamment de la fixation au CD4. On sait aujourd'hui que la gp120 subit un changement conformationnel après sa fixation sur le récepteur CD4. Nos études en cours visent à déterminer si la délétion de l'hélice α -1 dans la gp120 a entraîné ce changement conformationnel. Si tel est le cas, nous disposerons d'une molécule potentiellement immunisante. La fabrication par la même occasion d'un virus contenant cette gp120, permettra d'étudier les mécanismes d'entrée du virus dans les cellules indépendamment du CD4.

Nous avons déterminé avec précision dans l'hélice α -1 de la gp120, l'acide aminé responsable de la fixation au récepteur CD4. Nous avons démontré que le tryptophane W112 pouvait jouer un rôle majeur dans le maintien de la poche hydrophobe d'interaction de la gp120 au CD4. Ces travaux ont pu montrer que ce résidu aromatique avait une aussi grande importance que le W427 ou "CD4 binding site". Toutes ces données laissent supposer un rôle important des tryptophanes dans les interactions gp120-cellules cibles. On peut constater que dans la majorité des cas, ces W sont très conservés (dans les différents isolats de VIH-1), ce qui souligne leur importance biologique.

Différentes mutations dans d'autres structures conservées de gp120 sont actuellement testées dans notre laboratoire.

Dans tous les cas, une meilleure compréhension du rôle des structures conservées et de leur niveau d'intervention dans les différentes étapes de l'infection, devrait permettre d'imaginer des stratégies thérapeutiques et/ou immunisantes plus efficaces. C'est une des finalités de nos recherches.

Nous avons également démontré que la glycoprotéine d'enveloppe gp120 (provenant d'une souche virale T-tropique) est capable de reproduire la plupart des effets du SDF1 α en se fixant sur le co-récepteur CXCR4 (chimiotactisme cellulaire, mobilisation de la concentration intracellulaire de calcium, internalisation du co-récepteur CXCR4). Néanmoins, parmi les effets du SDF1 α sur le CXCR4, nous n'avons pas pu mettre en évidence une activation de la voie des MAPK (erk1 / erk2) *via* le CXCR4. Il serait intéressant d'étudier la voie d'activation de JNK après fixation de la gp120 sur le CXCR4. Cette étude permettra d'élucider les mécanismes d'activation des différentes voies lors de la fixation de la gp120 sur tel ou tel récepteur. Tous ces mécanismes d'activation provoqués par la fixation de la gp120 sur le CXCR4 pourraient expliquer certains effets pathogènes observés au cours de l'infection par le VIH.

La compréhension des processus impliqués dans la fixation et la fusion de la SU de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire, ainsi que les réponses physiologiques, permettront le développement de nouvelles stratégies, afin de mieux contrôler l'infection par le VIH.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A -

Adachi A., Koenig S., Gendelman H E., Daugherty D., Cattoni-Celli S., Fauci A S. and Martin M M. 1987. Productive, persistent infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. *J Virol.* 61: 209.

Adachi A., Ono N., Sakai H., Ogawa K., Shibata R., Kiyomasu T., Masuike H. and Ueda S. 1991. Generation and characterization of the human immunodeficiency virus type 1 mutants. *Arch. Virol.* 117: 45.

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

Albert J., Bredberg U., Chiodi F., Böttiger B., Fenyö E. M., Norrby E. and Biberfeld G. 1987. A new human retrovirus isolate of West Africa origin and its relationship to HTLV-IV, LAV-II and HTLV-IIIB. *AIDS Res Hum Retrovir.* 3: 3.

Albright A V., Strizki J M., Harouse J M., O'Connor M., Lavi E. and Gonzales-Scarano F. 1996. HIV-1 infection of cultured human adult oligodendrocytes. *Virology.* 217 :211-9. *Virology.*

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

Alizon M., Barré-Sinoussi F., Sonigo P., Chermann J C., Tiollais P., Montagnier L. and Wain-Hobsons S. 1984. Molecular cloning of lymphadenopathy associated virus (LAV). *Nature* 312: 757.

Alizon M., Wain-Hobson S., Montagnier L. and Sonigo P. 1986. Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from two African patients. *Cell* 46: 63.

Alizon M. and Dragic T. 1994. CD26 antigen and HIV fusion? (Technical Comments) *Science* 264: 1161.

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

Alkhatib G., Liao F., Berger E A., Farber J M. and Peden K W. 1997. A new SIV co-receptor, STRL33. *Nature* 388: 238.

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

Amadori A., De Sylvestro G., Zamarchi R., Veronese M L., Mazza M R., Schiavo G., Panozzo M., De Rossi A., Ometto L., Mouss J., Barelli A., Borri A., Salmaso L., and Chieco-Bianchi L. 1992. CD4 epitope masking by gp120/anti-gp120 antibody complexes. A potential mechanism for CD4⁺ cell function down regulation in AIDS patients. *J. Immunol.* 148:2709.

Amara A., Le Gall S., Schwartz O., Salamero J., Montes M., Loetscher P., Baggolini M., Virelizier J L. and Arenzana-seidedos F. 1997. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle : SDF-1 α -dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med.* 186: 139.

Anderson S., Lenberg M., Landau N R., and Garcia V J. 1994. The cytoplasmic of the CD4 is sufficient for its down-regulation by from the cell surface by human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J. Virol.* 68:3092.

Arthos J., Deen K C., Chaikin M A., Fornwald J A., Sathe G., Sattentau Q J., Clapham P R., Weiss R A., Mc Dougal J S., Pietropaolo C., Axel R., Truneh A., Maddon P J., and Sweet R W. 1989. Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV. *Cell.* 57: 469.

Armstrong J A. and Horne R. 1984. Follicular dendritic cells and virus-like particles in AIDS-related lymphadenopathy. *Lancet* ii: 370.

Ashkenazi A., Presta L.G., Marster S.A., Camerato T R., Rosenthal K A., Fendly B M., and Capon D J. 1990. Mapping the CD4 binding site for human immunodeficiency virus by alanine-scanning mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:7150.

Asjö B., Ivhed I., Gildlund M., Fuerstemberg S., Penyo E M., Nilsson K., and Wigzell H. 1987. Susceptibility to infection by the human immunodeficiency virus (HIV) correlates with T4 expression in parental monocytoid cell line and its subclones. *Virology* 157:359.

- B -

Bachelder R E., Bilancieri J., Lin W. and Letvin N L. 1995. A human recombinant Fab identifies a human immunodeficiency virus type 1-induced conformational change in cell surface-expressed CD4. *J Virol.* 69 :5734

Baggiolini M., Delwald B., Moser B. 1994. Interleukine-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines. *Adv. Immunol.* 55: 97-179.

Baggiolini M., Dewald B, Moser B. 1997. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15: 675.

Baier M., Werner A., Bannert N., Metzner K. and Kurth R. 1995. HIV suppression by interleukin-16. *Nature.* 378: 563.

Bandres J C., Wang Q F., O'Leary J., Baleaux F., A. Amara, Hoxie J A., Zolla-Pazner

- Biti R., French R., Young J., Bennetts B., Stewart G., Liang T.** 1997. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR-5 deletion allele. *Nature Med.* 5: 252.
- Blazquez M V., Madueno J A., Gonzalez R., Jurado R., Bachovchin W W., Pena J., Munoz E.** 1992. Selective decrease of CD26 expression in T cells from HIV-1-infected individuals. *J Immunol* 149: 3073.
- Bleul C C., Farzan M., Choe H., Parolin C., Clark Lewis I., Sodroski J., and Springer T.A.** 1996. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature.* 382: 829.
- Böhnlein E., Berger J. and Hauber J.** 1991. Functional Mapping of the human immunodeficiency type 1 Rev RNA binding domain: New insights into the domain structure of Rev and Rex. *J Virol.* 65: 7051.
- Borrito-Esoda K., and Boone L R.** 1991. Equine infectious anemia virus and human immunodeficiency virus DNA synthesis *in vitro*: characterization of the endogenous reverse transcriptase reaction. *J. Virol.* 65:1952.
- Borzy M S., Connell R S. and Kiessling A A.** 1988. Detection of human immunodeficiency virus in cell-free seminal fluid. *J Acquired Immune Defic Syndr.* 1: 419.
- Boyd M T., Simpson G R., Cann A J., Johnson M A., and Weiss R A.** 1993. A single Amino acid substitution in the V1 loop of human immunodeficiency virus type 1 gp 120 alters cellular tropism. *J. Virol.* 67: 3649.
- Boyer V., Desgranges C., Trabaud M A., Fisher E. and Kazatchkine M D.** 1991. Complement mediates human immunodeficiency virus type 1 infection of a human T cell line in a CD4- and antibody- independent fashion. *J Exp Med.* 173: 1151.
- Boyer V., Delibrias C., Noraz N., Fisher E., Kazatchkine M D. and Desgranges C.** 1992. Complement receptor type 2 mediates infection of the human CD4-negative Raji B-cell line with opsonized HIV. *Scand J Immunol.* 26: 879.
- Brady H J M., Pennington D J., Miles C G. and Dzierzak.** 1993. CD4 cell surface down regulation in HIV-1 Nef transgenic mice is a consequence of intracellular sequestration. *EMBO J.* 12: 4923.
- Briant L., Robert-Hebmann., Sivan V., Brunet A., Pouysségur J. and Devaux C.** 1998. Involvement of extracellular signal-regulated kinase module in HIV-mediated CD4 signals controlling activation of nuclear factor-kB and AP1 transcription factors. *J Immunol.* 160: 1875.
- Brelot A., Heveker N., Pleskoff O., Sol N. and Alizon M.** 1997. Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity. *J Virol.* 71: 4744.
- Brenneman D E, Westbrook G L, Fitzgerald S P, Ennist D L, Elkins K L, Ruff M R and Pert C B.** 1988. Neuronal cell killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide. *Nature.* 335: 639.

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

Broder C C., Nussbaum O., Gutheil W G., Bachovchin W W. and Berger E A. 1994. CD26 antigen and HIV fusion?. *Science*. 264:1156.

Bullough P A., Hughson F M., Skehel J J. and Wiley D C. 1994. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature*. 371: 37.

Buonaguro L., Barillari G., Chang H K., Bohan C A., Kao V., Morgan R., Gallo R C. and Ensoli B. 1992. Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines. *J Virol*. 66: 7159.

Burkrinsky M I., Sharova N., Dempsey M P., Stanwick T L., Burinskaya A G., Haggerty, S., and Stevenson, M. 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6580.

Bushman F D., Fujiwara T., and Craigie R. 1990. Retroviral DNA integration directed by integrase protein *in vitro*. *Science*. 249: 155.

- C -

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

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

Camerini D., Planelles V and Chen I S. 1994. CD26 antigen and HIV fusion?. *Science* 264: 1160.

Cann A J., and Karn J. 1989. Molecular biology of HIV: new insights into the virus life-cycle. *AIDS* 3 Suppl 1:S19.

Cao Y., Fridman-Rien A E., Huang Y., Li X., Mirabil M., Moudgil T., Zucker-Franklin D. and Ho D D. 1991. CD4-independent, productive human immunodeficiency virus type-1 infection of hepatoma cell lines *in vitro*. *J Virol*. 64: 2553.

Cefai. D., Ferrer M., Serpente N., Idziorek T., Dautry-Varsat A., Debre P. and Bismuth G. 1992. Internalization of HIV glycoprotein gp120 is associated with down-modulation of membrane CD4 and p56lck together with impairment of T cell activation. *J. Immunol*. 149:285.

Centers for disease control. 1981a. *Pneumocystis pneumonia*. Los Angeles. *MMWR*. 30: 250.

Centers for disease control. 1981b. Follow-up on Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis*

pneumonia. MMWR 30: 409.

Centers for disease control. 1982a. Update on Kaposi's sarcoma and opportunistic infections in previously healthy persons - United States. MMWR 31:294.

Centers for disease control. 1982b. *Pneumocystis carinii* pneumonia among persons with hemophilia. A. MMWR. 31: 365.

Centers for disease control. 1982c. Update on acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) among patients with hemophilia. A. MMWR 31: 644.

Centers for disease control. 1982d. Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California. MMWR 31: 652.

Centers for disease control. 1982e. Unexplained immunodeficiency and opportunistic infections in infants. New York, New Jersey, California. MMWR; 31: 665.

Centers for disease control. 1982f. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS) = United States. MMWR 31: 507.

Centers for disease control. 1983. Immunodeficiency among female sexual partners of males with acquired immunodeficiency syndrome. MMWR 31: 697.

Chaffee S., Leeds J.M., Matthews T J., Weinhold K J., Skinner M., Bolognesi D P. and Hershfield M S. 1988. Phenotypic variation in the response to the human immunodeficiency virus among derivatives of the CEM T and Wil-2 B cell lines. J. Exp. Med. 168:605.

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

Chamat S., Nara P., Berquist L., Whalley A., Morrow W J., Köhler H. and Kang C Y. 1992. Two major groups of neutralizing anti-gp120 antibodies exist in HIV-infected individuals. J Immunol. 149: 649.

Chan D C., Fass D., Berger J M., and Kim P S. 1997. Core structure of gp41 from the HIV-1 envelop glycoprotein. Cell. 89: 263.

Chanh T., Dreesman G., Kanda P., Linette G., Sparrow J., Ho D. and Kennedy R. 1986. Induction of anti-HIV neutralising antibodies by specific peptides. EMBO J. 11: 3065.

Chehimi J., Bandyopadhyay S., Prakash K., Perussia B., Hassan N F., Kawashima H., Campbel D., Kornbluth J. and Starr S E. 1991. *In vitro* infection of natural killer cells with different human immunodeficiency virus type-1 isolates. J Virol 65: 3615.

Chehimi J., Starr S E., Frank L., C'andrea A., Ma X., MacGregor R., Sennelier J. and Trinchieri G. 1994. Impaired interleukine 12 production in human immunodeficiency-infected patients. J Exp Med. 179: 1361.

Chen S., Lee C. N., Lee W R., McIntosh K. and Lee T H. 1993. Mutational analysis of the

leucine zipper-like motif of the human immunodeficiency virus type 1 envelope transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 67: 3615.

Chen S S L. 1994. Functional role of the zipper motif region of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41. *J. Virol.* 68 2002.

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

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

Cheng-Mayer C. 1990. Biological and molecular features of HIV-1 related to tissue tropism. *Aids* 4: 49.

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

Chesebro B., Buller R., Portis J., and Wehrly K. 1990. Failure of human immunodeficiency virus entry and infection in CD4-positive human brain and skin cells. *J. Virol.* 64: 215.

Chikao M., Lord C L., Zhang C., Duke-Cohan J S., Letvin N L. and Schlossman S F. 1994. Role of CD26 / dipeptidyl peptidase IV in human immunodeficiency virus type 1 infection and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA).* 91: 9960.

Chirmule N. and Pahwa S. 1996. Envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1: profound influences on immune functions. *Microbiol Rev.* 60:386.

Choe H., Farzan M., Sun Y., Sullivan N., Rollins B., Pinath P. D., Wu L., Mackay C R., LaRosa G., Newman W., Gerard N., Gerard C. and Sodroski J. 1996. The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85: 1135.

Choe H., Martin K A., Farzan M., Sodroski J., Gerard N P., Gerard C. 1998. Structural interactions between chemokine receptors gp120 Env and CD4. *Semin Immunol.* 249-57.

Chollet-Martin S., Simon F., Matheron S., Joseph C.A., Elbin C. and Gougerot-Pocidalo M.A. 1994. Comparison of plasma cytokine levels in african patients with HIV-1 and HIV-2 infection. *AIDS* 8: 879.

Chun T W., Carruth L., Finzi D., Shen X., DiGiuseppe J A., Taylor H., Hermankova M., Chadwick K., Margolick J., Quinn T C., Kuo Y H., Brookmeyer R., Zeiger M A., Barditch-Crovo P. and Siliciano R F. 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature.* 387: 183.

Clapham P R. 1997. HIV and chemokines : ligands sharing cell surface receptors. *Trends Cell Biol.* 7: 264.

- Clapham P R., Blanc D. and Wess R.A.** 1991. Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by simian immunodeficiency virus. *Virology* 181:703.
- Clavel F., Guetard D., Brun-Vezinet F., Chamaret S., Rey M A., Santos-Ferreira M O., Laurent A G., Dauguet C., Katlama C., Rouzioux C., Klatzmann D., Champalimaud J L., and Montagnier L.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West Africa patient with AIDS. *Science* 233: 343.
- Clavel F., Hoggan D. and Willey R.** 1989. Genetic recombination of HIV. *J. Virol.* 63:1455.
- Clavel F. and P. Charneau.** 1994. Fusion from without directed by human immunodeficiency virus particles. *J. Virol.* 68: 1179.
- Clayton L K., Sieh M., Pious D A. and Reinherz E L.** 1989. Identification of human CD4 residues affecting classII MHC molecules versus HIV-1 gp120 binding. *Nature.* 339: 548.
- Clements G J., Prince-Jones M J., Stephens P E., Sutton C., Schulz T F., Clapham P R., McKeating J A., McClure M O., Thomson S., Marsh M., Weiss R A. and Moore J P.** 1991. The V3 loops of the HIV-1 and HIV-2 surface glycoproteins contain proteolytic cleavage sites: a possible function in viral fusion? *AIDS Res Hum Retroviruses.* 7: 3.
- Clerici M., Stocks N I., Zajac R A., Boswell R N., Lucey D R., Via C S. and Shearer G M.** 1989. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, HIV-seropositive patients: Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. *J Clin Invest.* 84: 1892.
- Clerici M. and Shearer G.M.** 1993. A TH-1/TH-2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today* 14: 07.
- Clerici M., Hakim F T., Venzon D J., Blatt S P., Hendrix C W., Wynn T A. and Shearer G M.** 1993a. Changes in interleukin-2 and interleukine-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest.* 91: 759.
- Clerici M., Sison A V., Berzofsky J A., Rakusan T A., Brandt C D., Ellaurie M., Colie C., Venzon D J., and Shearer G M.** 1993b. Cellular immune factors associated with mother-to-infant transmissible HIV. *AIDS.* 7: 1427.
- Clerici M. and Berzofski J A.** 1994. Cellular immunity and cytokines in HIV infection. *AIDS.* 8: S175.
- Clerici M. and Shearer.** 1994. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insight. *Immunol Today.* 15: 575.
- Cocchi F., DeVico L A., Garzino Demo A., Arya S K., Gallo R C. and Lusso P.** 1995. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ cells. *Science.* 270: 1811.
- Coffin J M., Haase A., Levy J A., Montagnier L., Oroszlan S., Teich N., Temin H., et al.** 1986. What to call the AIDS virus. *Nature* 321: 10.

Coffin J M. 1995. HIV population dynamics *in vivo*: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*. 267: 483.

Cohen E A., Terwilliger E F., Sodroski J. and Haseltine W A. 1990. Identification of HIV-1 vpr product and function. *J Acquired Immune Defic Syndr*. 3: 11.

Conley A J., Kessler J A., Boots L J., Tung J S., Arnold B., Keller P M., Shaw A. and Emini E. 1994. Neutralization of divergent human immunodeficiency virus type 1 variants and primary isolates by IAM-41-2F5, an anti-gp41 human monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 91: 3348.

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

Cook D G., Fantini J., Spitalnik S L. and Gonzalez-Scarano, F. 1994. Binding of human immunodeficiency virus type I (HIV-1) gp120 to galactosylceramid (GalCer): relationship to the V3 loop. *Virology*. 201(2): 206.

Corbeau P., Olive D. and Devaux C. 1991. Anti-HLA antigen class I heavy chain monoclonal antibodies inhibit human immunodeficiency virus production by peripheral blood mononuclear cells. *Eur. J. Immunol*. 21: 865.

Corbeau P., Benkirane M., Weil R., David C., Emiliani S., Olive D., Mawas C., Serre A., and Devaux C. 1993. Ig CDR-3 like region of CD4 molecule is involved in syncytia formation but not in viral entry. *J. Immunol*. 150: 290-301.

Cordell J. Moore J P., Dean C J., Klasse P J. and Weiss R A. 1991. Rat monoclonal antibodies to non-overlapping epitopes of human immunodeficiency virus type 1 gp120 block CD4 binding *in vitro*. *Virology*. 185: 72.

Cordonnier A., Montagnier L., and Emmerman M. 1989. Single amino-acid changes in HIV envelope affect viral tropism and receptor binding. *Nature* 340:571.

Craigie R. and Fujiwara T. 1990. The IN protein from Moloney murine leukemia virus processes the viral DNA ends and accomplishes their integration *in vitro*. *Cell* 62:829.

Craven R C., Leure-duPree A E., Weldon R A. and Will J W. 1995. Genetic analysis of the major homology region of Rous Sarcoma virus gag protein. *J. Virol*. 69: 4213.

Curtis B M., Scharnowske S. and Watson A J. 1992. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Sci (USA)*. 89: 8356.

- D -

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

Dagleish A G. 1995. HIV and CD26. *Nature Med.* 1: 881.

Davis C B., Dikic I., Unutmaz D., Hill C M., Arthos J., Siani M A., Thompson D A., Schlessinger J S. and Littman D R. 1997. Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J. Exp. Med.* 186. 10: 1793.

Dawson V L, Dawson T M, Uhl G R and Snyder S H. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 coat protein neurotoxicity mediated by nitric oxide in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 90: 3256.

Dayanithi G, Yahi N, Baghdiguan S, Fantini J. 1995. Intracellular calcium release induced by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) surface envelope glycoprotein in human intestinal epithelial cells: a putative mechanism for HIV-1 enteropathy. *J Cell Calcium.* 18: 9.

De Maria A., Pantaleo G., Schnittman S M., Greenhouse J J., Baxler M., Greinstein J M. and Fauci A S. 1991. Infection of CD8+ T lymphocytes with HIV. *J. Immunol.* 146: 2220.

Dean M., Carrington C., Winkler G. A. Huttley M. W., Smith R., Allikmets J. J., Goebert S P., Bachbinder E., Vittinghoff E., Gomperts S., Doufield D., Vlahov R., Kaslow A., Saah C., Rinaldo R., Detels and S J. O'Brien. 1996. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia growth and development study, multicenter AIDS cohort study, multicenter hemophilia cohort study, San Francisco city cohort, ALIVE study. *Science* 273: 1856.

Dedera D., Vander Heyden N., and Ratner L. 1990. Attenuation of HIV-1 infectivity by an inhibitor of oligosaccharide processing. *Aids Res. Hum. Retroviruses.* 6: 785.

Dedera D, Ratner L. 1991. Demonstration of two distinct cytopathic effects with syncytium formation-defective human immunodeficiency virus type 1 mutants. *J Virol.* 65: 6129.

Dedera D., Gu R., and Ratner L. 1992. Role of asparagine-linked glycosylation in human immunodeficiency virus type 1 transmembrane envelope function. *Virology.* 187: 377.

Delwart E L. and Mosialos G. 1990. Retroviral envelope glycoproteins contain a "leucine zipper"-like repeat. *Aids Res. Hum. Retoviruses.* 6: 703.

Denesvre C., Sonigo P., Corbin A., Ellerbrok H. and M. Sitbon. 1995. Influence of transmembrane domains on the fusogenic abilities of human and murine leukemia retrovirus envelopes. *J. Virol.* 69: 4149.

Deng H., Liu R., Elmeier W., Choe S., Unutmaz D., Burkhart M., Di Marzio P., Marmon S., Sutton R E., Hill C M., Davis C B., Peiper S C., Schall T J., Littman D R.

- and Landau N R.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 381: 661.
- Deng H., Unutmaz D., Kewalramani V N., Littman D R.** 1997. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature*. 388 : 296.
- DeVries G H. and Norton W T.** 1974. The lipid composition of axons from bovine brain. *J Neurochem*. 22: 259.
- Di Marzio P., Tse J., and Landau N R.** 1998. Chemokine receptor regulation and HIV type 1 tropism in monocyte-macrophages. *Aids Research and Human Retroviruses*. 14: 129.
- Dimitrov D S., Willey R., Sato H., Chang L-J., Blumenthal R. and Martin M.** 1993. Quantitation of Human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics. *J. Virol*. 67:2182.
- Dirckx L., Lindemann D., Ette R., Manzoni C., Moritz D. and Mouss J.** 1990. Mutation of conserved N-glycosylation sites around the CD4-binding site of human immunodeficiency virus type 1 gp120 affects viral infectivity. *Virus Res*. 18: 9.
- Ditzel H J., Parren P W., Binley J M., Sodroski J., Moore J P., and Barbas C F.** 1997. Mapping the protein surface of human immunodeficiency virus type 1 gp120 using human monoclonal antibodies from phage display libraries. *J. Mol. Biol*. 267: 684.
- Doranz B J., Rucker J., Yi Y., Smyth R J., Samson M., Peiper S C., Parmentier M., Collman R G. and Doms R W.** 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85: 1149.
- Dormont D., Le Grand R.** 1996. Vaccination contre les infections par le VIH – Possibilités théoriques et problèmes actuels. *Médecine et Armées*. Tome 24 (4): 263.
- Dragic T., Charneau P., Clavel F., Alizon M.** 1992. Complementation of murine cells for human immuno-deficiency virus envelope/CD4-mediated fusion in human-murine heterokaryons. *J. Virol*. 66: 4794.
- Dragic T., Litwin V., Allaway G., Martin S R., Huang Y., Nagashima K A., Cayanan C., Maddon P J., Koup R A., Moore J P. and Paxton W A.** 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR5. *Nature* 381: 667.
- Dreyer E B, Kaiser P K, Offermann J T. and Lipton S A.** 1990. HIV-1 coat protein neurotoxicity prevented by calcium channel antagonists. *Science*: 248: 364.
- Dukes C S., Yu Y., Rivadeneira E D., Sauls D L., Liao H X., Haynes B F. and Weinberg J B.** 1995. Cellular CD 44s as a determinant of human immunodeficiency virus type 1 infection and cellular tropism. *J. Virol*. 69: 4000.
- Durak D T.** 1981. Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma in homosexual men. *N. Engl. J. Med*. 305: 1439.
- Durum S K., Quinn D G. and Muegge K.** 1991. New cytokines and receptors make their

debut in San Antonio. *Immunol. Today* 12: 54.

Dyda F., Hickman A B., Jenkins T M., Engelman A., Craigie R. and Davies D R. 1994. Cristal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: Similarity to other polynucleotidyl transferase. *Science*. 266: 1981.

- E -

Edinger A L., Mankowski J L., Doranz B J., Margulies B J., Lee B., Rucker J., Sharron M., Hoffman T L., Berson J F., Zink MC, Hirsch V M, Clements J E, Doms R W. 1997. CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain. *Proc Natl Acad Sci (U S A)*. 94: 14742.

Elghazali G E B., Paulie S., Andersson G., Hansson Y., Holmquist G., Sun J B., Olsson T., Ekre H P. and Troye-Blomberg M. 1993. Number of interleukin-4 and interferon-g-secreting human T cells reactive with tetanus toxoid and the mycobacterial antigen PPD or phytohemagglutinin: distinct response profiles depending on the type of antigen used for activation. *Bur. J. Immunol.*, 23:2740.

Emmerman M R., Vazeux R. and Peden K. 1989. The Rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell*. 57: 1155.

Endres M J., Clapham P.R., Marsh M., Ahuja M., Turner, J D. McKnight A., Thomas J F., Stoebenau Haggarty B., Choe S., Vance P J., Wells T N., Power C A., Sutterwala S S., Doms R W., Landau N R. and Hoxie J A. 1996. CD4-independant infection infection by HIV-2 is mediated by fusion/CXCR4. *Cell* 87: 745.

Engelman A., Hickman A B. and Craigie R. 1994. The core and carboxyl-terminal domains of the integrase protein of human immunodeficiency virus type 1 each contribute to nonspecific DNA binding. *J. Virol.* 68:5911.

Erard F., Bunbar P R. and Le Gros G. 1994. The IL-4-induced switch of CD8+ T cells to a TH2 phenotype and its possible relationship to the onset of AIDS. 1993. *Res Immunol.* 145: 643.

- F -

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

Farzan M., Choe H., Martin K., Marcon L., Hofmann W., Karlsson G., Sun Y., Barrett P., Marchand N., Sullivan N., Gerard N., Gerard C., Sodroski J. 1997. Two orphan seven-transmembrane segment receptors which are expressed in CD4-positive cells support

simian immunodeficiency virus infection. *J. Exp. Med.* 186 : 405.

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

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

Fenouillet E., Gluckmann J C. and Barhaoui E. 1990. Role of N-linked glycans of envelope glycoproteins in infectivity of human immunodeficiency Virus type 1. *J. Virol.* 64: 2841.

Fenouillet E. and Gluckmann J C. 1991. Effect of a glucosidase inhibitor on the bioactivity and immunoreactivity of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J. Gen Virol.* 72: 1919.

Fenouillet E., Jones I., Powell B., Schmitt D., Kiény M P., and Gluckman J C. 1993. Functional role of the glycan cluster of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 ectoderm. *J. Virol.* 67: 150.

Fenyo E M., Albert J. and Asjo B. 1989. Replicative capacity, cytopathic effect and cell tropism. *Aids* 3: 5.

Fiore J R., Bjorndal A., Peipke K A., Di Stefano M., Angarano G., Pastore G., Gaines H., Fenyo E M. and Albert J. 1994. The biological phenotype of HIV-1 is usually retained during and after sexual transmission. *Virology* 204: 297.

Fisher R A., Bertonis J M., Meier W., Johnson V A., Costopoulos D S., Liu T., Tizar R., Walker B D., Hirsh M S., Schooley R T. and Flavell R A. 1988. HIV infection is blocked *in vitro* by recombinant soluble CD4. *Nature* 331: 76.

Fleury-Feith J., Van Nheieu J T., Picard C., Escudier E. and Bernaudin J F. 1992. Bronchoalveolar lavage eosinophilia associated with pneumocystis carinii pneumonitis in AIDS patients. Comparative study with non-AIDS patients, *Chest* 95: 1198.

Folks T M., Kessler S W., Greinstein J M., Justement J. and Fauci A I. 1988. Infections and replication of human immunodeficiency virus type-1 in highly purified progenitor cells from normal human bone.

Förster R., Kremmer E., Schubel A., Breitfeld D., Kleinschmidt A., Nerl C., Bernhardt G. and Lipp M. 1998. Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets : rapid internalization and recycling upon activation. *The Journal of Immunology.* 1522: 1531.

Franchini G., Robert Guroff M., Ghrayeb J., Chang N. and Wong-Staal F. 1986. Cytoplasmic localization of HTLV-III 3'orf protein in cultured T cells. *Virology.* 155: 593.

Freed E O., Delwart E L., Buchshacher, G L. and Panganiban A T. 1992. A mutation in

the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89: 70.

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

Fust G., Dierich M P. and Hidvegi T. 1995. Role of humoral factors in the progression of HIV disease. *Immunology Today.* 16: 167.

- G -

Gabuzda D., Olshevsky U., Bertaini P., Haseltine W A. and Sodroski J. 1991. Identification of membrane anchorage domains of the HIV-1 gp160 envelope glycoprotein precursor. *J Acq Immune Defic Syndr.* 4: 34.

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

Gallaher W R., Ball J M., Griffin M C. and Montelaro R C. 1989. A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5: 431.

Gallaher W R., Ball J M., Garry R F. Martin-Amedee A M. and R C. Montelaro. 1995. A general model for the surface glycoproteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11: 191.

Gallo R C., Salahuddin S Z., Popovic M., Shearer G M., Kaplan M., Haynes B F., Palker T J., Redfield R., Oleske J., Safai B., White G., Foster P., and Markham P D. 1984. Frequent detection and isolation of cytopathic retrovirus (HTLVIII) from patient with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224: 500.

Gallo R C. and Wong-Staal F. 1985. A human T-lymphotropic retrovirus (HTLV-III) as the cause of the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Int. Med.* 103: 679.

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

Garcia R., Feijoo E., Guerrero M F., de Gorgolas M., Munoz-Fernandez M A., Fernandez-Cruz E., and Ortiz F. 1996. Immune complexes from HIV-1+ patients contain infectious virus able to infect normal lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol.* 98: 827.

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

Gartner S. and Popovic M. 1990. Macrophage tropism of HIV-1. *AIDS. Res. and Hum. Retro.* 6: 1017.

- Gaynor R B.** 1995. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 gene expression by transactivator protein Tat, in: *Transactivating Functions of Human Retroviruses, Current Topics in Microbiology and Immunology.* 193:51.
- Gelderblom H.R., Hausmann E.H., Ozel G., Pauli G. and Koch M.A.** 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156: 171.
- Geleziunas R., Bour S., Wainberg M M A.** 1994. Cell surface down-modulation of CD4 after infection by HIV-1. *FASEB J.* 8: 593.
- Gendelman H E., Orenstein J M., Baca L M., Weiser B., Burger H., Kalter D C. and Meltzer J M.** 1989. The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection. *AIDS.* 3: 475.
- Gershoni JM, Denisova G, Raviv D, Smorodinsky NI, Buyaner D.** 1993. HIV binding to its receptor creates specific epitopes for the CD4/gp120 complex. *FASEB J.* 7: 1185.
- Geyer H., Holschbach C., Hunsmann G. and Schluter J.** 1988. Carbohydrates of human immunodeficiency virus. *J. Biol. Chem.* 263: 11760.
- Ghiara J B., Stura E A., Stanfield R.L., Profy A T. and Wilson I A.** 1994. Crystal structure of the principal neutralization site of HIV-1. *Science* 264: 82.
- Giorgi J V., Fahey J L., Smith D C., Hultin L E., Cheng H L., Mitsuyasu R T. and Detels R.** 1987. Early effects of HIV on CD4 lymphocytes *in vivo*. *J Immunol.* 138: 3725.
- Golding H., Dimitrov D S. and Blumenthal R.** 1992. LFA-1 adhesion molecules are not involved in the early stages of HIV-1 env mediated cell membrane fusion. *AIDS Res. and Hum. Retrovirus* 8:1593.
- Gomez M B. and Hildreth J E K.** 1995. Antibody to adhesion molecule LFA-1 enhances plasma neutralization of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 69: 4628.
- Gonzalez-Scarano F M., Waxham M N., Ross A M., and Hoxie J A.** 1987. Sequence similarity between human immunodeficiency virus gp41 and paramyxovirus fusion proteins. *AIDS. Res. Hum. Retrovirus* 3: 245.
- Gorelick R J., Chabot D J., Rein A., Henderson L E. and Arthur L O.** 1993. the two zinc fingers in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein are not functionally equivalent. *J. Virol.* 67: 4027.
- Gottlieb M S., Schroff R., Schanker H M., Weisman J D., Fan P T., Wolf R A. and Saxon A.** 1981. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. Evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 305: 1425.
- Göttlinger H G., Sodroski J G. and Haseltine W A.** 1989. Role of the capsid precursor processing and myristylation in morphogenesis and infectivity of the human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 5781.

- Goudsmit J., Boucher C A B., Meloen R H., Epstein L G., Smit L., Van der Hoek. and Bakker M.** 1988. Human antibody response to a strain-specific HIV-1 gp120 epitope associated with cell fusion inhibition. *AIDS*. 2: 157.
- Gras G S. and Dormont D.** 1991. Antibody-dependent and antibody-independent complement mediated enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection in a human, Epstein-Barr virus-transformed B-lymphocytic cell line. *J. Virol.* 65: 541.
- Graziosi C., Pantaleo G., Gantt K R., Fortin J P., Demarest J F., Cohen O J., Sekaly R P. and Fauci A S.** 1994. Lack of evidence for the dichotomy of TH1 and TH2 predominance in HIV-infected individuals. *Science* 265:248.
- Greenway A., Azad A. and McPhee D.** 1995. Human immunodeficiency virus type-1 Nef protein inhibits activation pathways in peripheral blood mononuclear cells and T-cell lines. *J Virol.* 69: 1842.
- Groenink M., Fourchier R A., Broersen S., Baker C H., Koot M., Van't Wout A B., Huisman H G., Miedema F., Tersmette M. and Schuitemaker H.** 1993. Relation of phenotype evolution of HIV-1 to envelope V2 configuration. *Science*. 260-1513.
- Guillon C., van der Ende M E., Boers P H., Gruters R A., Schutten M. and Osterhaus A D.** 1998. Coreceptor usage of human immunodeficiency virus type 2 primary isolates and biological clones is broad and does not correlate with their syncytium-inducing capacities. *J Virol.* 72: 6260
- Gupta S. and Vayuvegula B.** 1987. Human immunodeficiency virus-associated changes in signal transduction. *J Clin Immunol.* 7: 486.
- Gupta P., Blachandran R., Ho M., Enrico A. and Renaldo C.** 1989. Cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1 in the presence of azidothymidine and neutralizing antibody. *J. Virol.* 63:2361.
- Guteil W G., Subramanyam M., Flentke G R., Sanford D G., Munoz E., Huber B T. and Bachovchin W W.** 1994. Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl aminopeptidase IV (CD26): A possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 91: 6594.
- Guy B Y., Rivière K., Dott K., Regnault A. and Kiény M P.** 1990. Mutational analysis of the HIV nef protein. *Virology.* 176: 413.
- Guyader M., Emmerman M., Montagnier L. and Peden K.** 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type-2. *Nature (London).* 326: 662.

- H -

- Hallenberger S, Bosch V, Angliker H, Shaw E, Klenk H D. and Garten W.** 1992. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature*. 360: 358.
- Hammerschmidt M., Palmeri D., Ruhl H., Jaksche H., Weichselbraun I., Böhnlein E., Malim M H. and Haubert J.** 1994. Scanning mutagenesis of the arginine-rich region of the human immunodeficiency virus type 1 Rev trans activator. *J Virol*. 68: 7329.
- Hansen J E., Lund O., Nielsen J O., Brunak S. and Hansen J E S.** 1996. Prediction of the secondary structure of HIV-1 gp120. *Proteins* 25: 1.
- Harouse J., Bhat S., Spitalnik S., Laughlin M A., Stefano K., Silberberg D. and Gonzalez-Scarano F.** 1991. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science*. 253 :320.
- Harouse J., Collman R G. and Gonzalez-Scarano F.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 infection of SK-N-MC cells: domains of gp120 involved in entry into a CD4-negative, galactosyl ceramide/3' sulfo-galactosylceramide-positive cell line. *J Virol*. 69: 7383.
- Hart D N J. and McKenzie J.** 1988. Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. *J Exp Med*. 169: 157.
- Hattori T., Koito A., Takatsuki K., Kido H., and Katunuma N.** 1989. Involvement of Trypsin-Related Cellular Protease(s) in human immunodeficiency virus type 1 infection. *FEBS LETTERS* 248: 48.
- He J., Chen Y., Farzan M., Choe H., Ohagen A., Gartner S., Busciglio J., Yang X., Hofmann W., Newman W., Mackay C R., Sodroski J., Gabuzda D.** 1997. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* 385 : 645.
- Heaphy S., Dingwall C., Ernberg I., Gait M J., Green S M., Karn J., Lowe A., Singh M. and Skinner M A.** 1990. HIV-1 regulator of virion expression to an RNA Stem-loop structure located within the Rev Response Element Region. *Cell*. 60: 685.
- Heinzinger N K., Bukrinsky M I., Haggerty S A., Ragland A M., Kewalramani V., Lee M A., Gendelman H E., Ratner L., Stevenson M., and Emerman M.** 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localisation of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7311.
- Helseth E., Olshevsky U., Furman C. and Sodroski J.** 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein region important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J. Virol*. 65: 2119.
- Henin Y., Mandelbrot L., Henrion R., Prandaud J P., Coulaud J P. and Montagnier L.** 1993. Virus excretion in the cervicovaginal secretions of pregnant and non pregnant HIV-infected women. *J Acquired Immune Defic Syndr*. 6: 72.

human immunodeficiency virus type 1 Rev transactivator: Mapping cryptic functions of the arginine-rich Motif. *Proc Natl Acad (USA)*. 87: 7787.

Horuk, R., J. Hesselgesser, Y. Zhou, D. Faulds, M. Halks-Miller, S. Harvey, D. Taub, M. Samson, M. Parmentier, J. Rucker, B.J. Doranz, and R.W. Doms. 1998. The CC Chemokine I-309 inhibits CCR8-dependent infection by diverse HIV-1 strains. *J. Biol. Chem.* 273: 386.

Hoxie J A., Alpers J D., Rackowski J. L., Huebner K., Haggarty B S., Cedarbaum A J. and Reed J C. 1986. Alteration in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cell infected with HIV. *Science*. 234: 1123.

Hoxie J A., Haggarty B S., Bonser S E., Rackowski J L., Shan H. and Kanki P J. 1988. Biological characterization of a simian immunodeficiency virus-like retrovirus (HTLV-IV): evidence for CD4-associated molecules required for infection. *J. Virol.* 62: 2557.

Huang L M. and Jeang K T. 1993. Increased spacing between Sp1 and TATAA renders human immunodeficiency virus type 1 replication defective: implication for Tat function. *J Virol.* 67: 6937.

Huang Y., Paxton W A., Wolinsky S M., Neumann A U., Zhang L., He T., Kang S., Ceradini D., Jin Z., Yazdanbakhsh K., Kunstman K., Erickson D., Dragon E., Landau N R., Phair J., Ho D D. and Koup R A. 1996. The role of mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* 2:1240.

Hwang S S., Boyle T J., Lyerly H K. and Cullen B R. 1991. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* 253: 71.

Hymes K B., Cheung T., Greene J B., Prose N S., Marcus A, Ballard H, William D C., Laubenstein L J. 1981. Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases. *Lancet* 2: 598.

- J -

Jabbar M A. 1995. The human immunodeficiency virus type-1 Vpu protein: Role in virus releases and CD4 downregulation. *Transacting Functions of Human Retroviruses, Current Topics in Microbiology and Immunology.* 193: 107.

Jameson B A., Rao P E., Kong L I., Hahn B H., Shaw G M., Hood L E., Kent S B H et al. 1988. Location and chemical synthesis of a binding site for HIV-1 on the CD4 protein. *Science.* 240: 1335.

Javaherian K., Langlois A J., McDanal C., Ross K L., Eckler L I., Jellis C L., Profy A T., Rusche J R., Bolognesi D P., Putney S D. and Matthews T J. 1989. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6768.

Jiang M., Mak J., Ladha A., Cohen E., Klein M., Rovinski B. and Kleiman L. 1993. Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 67:3246.

Joklik W K. 1974. Evolution in viruses. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 24: 293.

Jones D P., McConkey D J., Nicotera P., Orenus S. 1989. Calcium-activated DNA fragmentation in rat liver nuclei. J. Biol. Chem. 264: 6398.

Jourdan P., Abbal C., Nora N., Hori T., Uchiyama T., Vendrell J P., Bousquet J., Taylor N., J. Pène J. and H. Yssel H. 1998. IL4 induces functional cell-surface expression of CXCR4 on human T cells. J Immunol. 160 : 4153.

- K -

Kabat D., Kozak S., Wehrly K., and Chesebro B. 1994. Differences in CD4 dependence for infectivity of laboratory-adapted and primary patient isolates of human immunodeficiency virus type 1. J. Virol. 68: 2570.

Kanki, P.J., M'Boup, S., Ricard, D., Barin, F., Denis F., Boye, C., Sangare, L., Travers, K., Albaum, M., Marlink, R., Romet-Lemonne, J.L. and Essex, M. 1987. Human T-lymphotropic virus type 4 and the human immunodeficiency virus in West Africa, Science 236: 827.

Kappes J C. 1995. Viral protein X: Transactivating Functions of Human Retroviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology. 193: 121.

Katz R. A. and Skalka A. M. 1994. The retroviral enzymes. Annu. Rev. Biochem. 63: 133.

Katz R A., Merkel G., Kulkosky J., Leis J., and Skalka A M. 1990. the avian retroviral IN protein is both necessary and sufficient for integrative recombination *in vitro*. Cell 63: 87.

Kawanami J. and Tsuji T. 1968. Lipids of cancer tissues IV. Glycolipids of human gastric carcinoma. J Exp Med. 38: 123.

Kekow J., Wachsman W., McCutchan A., Cronin M., Carson D A. and Lotz M. 1990. Transforming growth factor B and noncytopathique mechanism of the human immunodeficiency virus infection. Proc Natl Acad (USA). 87: 8321.

Kido H., Fukotomi A., and Katunuma N. 1990. A novel membrane-bound serine esterase in human T4+ lymphocytes immunologically reactive with antibody inhibiting syncytia induced by HIV-1. Purification and characterization. J. Biol. Chem. 265: 21979.

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

Klatzmann D., E. Champagne S. Chamaret J. Gruest., D. Guetard T. Hercend J C. Gluckman. and L. Montagnier 1984a. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. Nature. 312: 767.

Klatzmann D., Barre-Sinoussi F., Nugeyre M.T., Dauquet C., Vilmer E., Gricelli C., Brun-Vezinet F., Roziou C., Gluckman J.C., Cherman J.C. and L. Montagnier 1984b. Selective tropism of lymphadenopathy-associated virus (LAV) for helper inducer T-lymphocytes. *Sciences*. 225: 59.

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

Knight D M., Macatonia S E. and Patterson S. 1990. HIV-1 infection of dendritic cells. *Int Rev Immunol*. 144: 94.

Koga Y., Sasaki M., Yoshida H., Wigzell H., Kimura G., and Nomoto K. 1990. Cytopathic effect determined by the amount of CD4 molecules in human cell lines expressing envelope glycoprotein of HIV. *J. Immunol*. 144: 94.

Kohleisen B., Neumann M., Hermann R., Brack-Werner R., KrohnK J E., Ovod V., Ranki A and Erfle V. 1992. Cellular localization of Nef expressed in persistently HIV-1 infected low-producer astrocytes. *AIDS*. 6: 1427.

Koito A., Harrowe G., Levy J A. and Cheng-Mayer C. 1994. Functional role of the V1/V2 region of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120 in infection of primary macrophages and soluble CD4 neutralization. *J Virol*. 68: 2253.

Kornfeld H., Cruickshank W W., Pyle S W. and Berman J S. 1988. Lymphocyte activation by HIV-1 envelope glycoprotein. *Nature*. 335: 445.

Kowalski M., Poltz J., Basiripour L., Dorfman T., Goh W C., Terwilliger E., Dayton A., Rosen C., Haseltine W. and Sodroski J. 1987. Functional region of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science*. 237: 1351.

Krensky A M., Sanchez-Madrid F., Robbins E., Nagy J A., Springer T A. and S J. Burakoff. 1983. The functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2, and LFA-3 : cell surface antigens associated with CTL-target interactions. *J. Immunol*. 131: 611.

Kuppuswamy P D, Subramanian T, Srinivasan A. and Chinnadurai G. 1989. Multiple functional domains of Tat, the transactivator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucleic Acid Res*. 17: 3351.

Kwong P D., Wyatt R., Robinson J., Sweet R W., Sodroski J. and Hendrickson W A. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and neutralizing human antibody. *Nature*. 393: 648.

- L -

La Femina R L., Callahan P L., and Cordingley M G. 1991. Substrate specificity of recombinant human immunodeficiency virus integrase protein. *J. Virol*. 65: 5624.

- Lamarre D., Ashkenazi A., Fleury S., Smith D H., Sekaly R P. and Capon D J.** 1989. The MHC-binding and gp120 binding functions of CD4 are separable. *Science*. 245: 743.
- Landau N R., Warton M. and Littman D E.** 1988. The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4. *Nature* 334: 159.
- Lane H C., Depper J M., Greene W C., Whalen G., Whalen G Waldmann T A. and Fauci A S.** 1985. Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome: Evidence for selective defect in soluble antigen recognition. *N Engl J Med*. 313: 79.
- Lange J M., Coutinho R A., Krone W J., Verdonck L F., Danner S A., Van der Noorda J., and Goudsmit J.** 1986. Distinct IgG recognition patterns during progression of subclinical and clinical infection with lymphadenopathy associated virus / human T lymphotropic virus. *Br. Med. J. [Clin. Res.]* 292: 228.
- Lannuzel A., Barnier J V., Hery C., Huynh V T., Guilbert B., Gray F., Vincent J D., Tardieu M.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 and its coat protein gp120 induce apoptosis and activate JNK and ERK mitogen-activated protein kinases in human neurons. *Ann Neurol*. 42: 847.
- Lapham C K., Ouyang J., Chandrasekhar B., Nguyen N Y., Dimitrov D S., Golding H.** 1996. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science*. 274: 602.
- Larcher C., Schulz T F., Hofbauer J., Hengster P., Romani N. and Wachter H.** 1990. Expression of the C3d/EBV receptor and of other cell membrane surface markers is altered upon HIV-1 infection of myeloid, T and B cells. *J Acq Immune Defic Syndr*. 3: 103.
- Lasky L A., Nakamura G., Smith D H., Fennie C., Shimasaki C., Patzr E., Berman P., Gregory T. and Capon D T.** 1987. Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp 120 glycoprotein critical for interaction with CD4 receptor. *Cell*. 50: 975.
- Lathey J L., Kanangat S., and Rouse B T.** 1994. Differential expression of tumor necrosis factor α and interleukin 1 β compared with interleukin 6 in monocytes from human immunodeficiency virus-positive individuals measured by polymerase chain reaction. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 7: 109.
- Lazaro I., Nanche D., Signoret N., Bernard A M., Marguet D., Klatzmann D., Dragic T., Alizon M. and Sattentau Q.** 1994. Factors involved in entry of the human immunodeficiency virus type 1 into permissive cells : lack of evidence of a role of CD26. *J. Virol*. 68: 6535.
- Lee T H., Coligan J E., Allan J S., McLane M F., Groopman J E. and Essex M., Lee T H.** 1986. A new HTLVIII/LAV protein encoded by a gene found in cytopathic retroviruses. *Science*. 231: 1546.
- Lee W.R., Yu X-F., Syu W-J., Essex M., Lee T-H.** 1992. Mutational analysis of conserved N-linked glycosylation sites of human immunodeficiency virus type 1 gp41. *J. Virol*. 66:1799.

- Leonard C K., Spellman M W., Riddle L., Harris R J., Thomas J N. and Gregory T J.** 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 265: 10373.
- Lev S., Moreno H., Martinez R., Canoll P., Peles E., Musacchio J M., Plowman G D., Rudy B., and Schlessinger J.** 1995. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca²⁺-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature.* 376: 737.
- Lever A., Haseltine W., and Sodroski J.** 1989. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. *J. Virol.* 63:4085.
- Levine M., Bain J., Narashimhan R., Palmer B., Yates A J. and Murray R K.** 1976. A comparative study of the glycolipids of human, bird and fish testes and of human sperm. *Biochim. Biophys. Acta.* 441: 134
- Levy J A., Hoffman A D., Kramer S M., Landis J A., Shimabukuro J M., and Oshiro L S.** 1984. Isolation of lymphocytopathic retrovirus from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225: 840.
- Levy J A., Cheng-Mayer C., Diana D., and Luciw P.** 1986. AIDS retrovirus (ARV-2) clone replicates in transfected human and animal fibroblasts. *Science* 232: 998.
- Levy J A.** 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.* 57: 183.
- Levy J A.** 1994. In *HIV and the pathogenesis of AIDS.* American Society for Microbiology, Washington DC, VA.
- Levy D N., Refaeli Y. and Weiner D B.** 1995. The Vpr regulatory gene of human immunodeficiency virus: Transacting Functions of Human Retroviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 193: 209.
- Liao F., Alkhatib G., Peden K W., Sharma G., Berger E A. and Farber J.M.** 1997. STRL33, a novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J. Exp. Med.* 185: 2015.
- Liederman D., Wilhem R., Renard P., Althage A., Zingernagel R., and Mous J.** 1994. Severe immunodeficiency associated with a human immunodeficiency virus type 1 Nef/3'-long terminal repeat transgene. *J. Exp. Med.* 179:797.
- Liu R., Paxton W A., Choe S., Ceradini D., Martin S R., Horuk R., MacDonald M E., Stuhlmann H., Koup R A. and Landau N R.** 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86: 367.
- Loetscher P., Seitz M., Bagglioni M., and Moser B.** 1996. Interleukine-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 183: 2437.

Lori F., Hall L., Lusso P., Popovic M., Markham P., Franchini G., and Reitz, M. S. Jr. 1992. Effect of reciprocal complementation of two defective human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) molecular clones on HIV-1 celltropism and virulence. *J. Virol.* 66: 5553.

Lu YL., Spearman P. and Ratner L. 1993. HIV-1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J Virol.* 67: 6542.

Lu M., Blacklow S C. and Kim P S. 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nature Struct Biol.* 2: 1075.

Lucey D R., Zajac R A., Melcher G P., Butzin C A. and Boswell R N. 1990. Serum IgE levels in 662 persons with human immunodeficiency virus infection; IgE elevation with marked depletion of CD4+ T cells. *AIDS Res Hum Retrovir.* 6: 427.

Luciw P A., Potter S J., Steimer K., Dina and Levy J A. 1984. Molecular cloning of AIDS associated virus. *Nature (London)* 312: 20.

Luo L., Li Y. and Kang C Y. 1990. Expression of gag precursor protein and secretion of virus-like gag particles of HIV-2 from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Virology* 179: 874.

Lusso P., DiMaarzo Veronese F., Ensoli B., Franchini G., Jemma C., DeRocco S E., Kalyanaraman V S., Gallo R C. 1990. Expanded HIV-1 cellular tropism by phenotypic mixing with murine endogenous retroviruses. *Sciences* 247: 848.

- M -

Macreadie I G., Castelli L A., Hewish D R., Kirkpatrick A., Ward A C. and Azad A A. 1995. A domain of human immunodeficiency virus type 1 Vpr containing repeated H (S/F) RIG amino acid motifs causes cell growth arrest and structural defect. *Proc Natl Acad Sci.*

Maddon P J., Dalglish A G., Mc Dougal J S., Clapham P R., Weiss R A. and Axel R. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47: 333.

Maddon P J., McDougal J S., Clapham P R., Dalglish A R, Jamal S., Weiss R A., and Axel R. 1988. HIV infection does not require endocytosis of its receptor. *Cell.* 54: 865.

Maggi E., Mazzetti M., Ravina A., Manetti R., DeCarli M., Annunziato F., Piccini M P., Carbonari M., Apresco A M., Del Prete G. and Romagnani S. 1994. Ability of HIV to promote a Th1 to TH2 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. *Science.* 265: 244.

Mahalingam S., Khan S., Murali R., Jabbar M A., Monken C E., Collman R G. and Srinivasan A. 1995. Mutagenesis of the putative alpha-helical domain of the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1: effect on stability and virion incorporation. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 92. 3794.

- Malim M H., Böhnlein S., Hauber J. and Cullen B R.** 1989. Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator-derivation of a trans dominant repressor of Rev function. *Cell*. 58: 205.
- Malim M H., Tiley L S., McCarn D F., Rushe J R., Haubert J. and Cullen B R.** 1990. HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell*. 60: 675.
- Malim M H. and Cullen B R.** 1991. Structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomere to the viral RRE : implication of HIV-1 latency. *Cell*. 65: 241.
- Malim M H., Tiley L S., McCarn D F. and Cullen B R.** 1991. Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. *J Virol*. 65: 4248.
- Mariani R. and Skowronski J.** 1993. CD4 down-regulation by nef alleles isolated from human immunodeficiency virus type-1 infected individuals. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 90: 5549.
- Martensson E.** 1963. *Acta Chem Scand*. 17: 1174.
- Martin K A., Wyatt R., Farzan M., Choe H., Marcon L., Desjardins E., Robinson J., Sodroski J., Gerard C. and Gerard NP.** 1997. CD4-independent binding of SIV gp120 to rhesus CCR5. *Science*. 278: 1470.
- Massiah M A., Starich M R., Paschall C., Summers M F., Chritensen A M. and Sundquist W. L.** 1994. Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J. Mol. Biol.* 244: 198.
- Masur H., Michelis M A., Greene J B., Onorato I., Stouwe R A., Holzman R S., Wormser G., Brettman L., Lange M., Murray H W., and Cunningham-Rundles S.** 1981. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 305: 1431.
- Masur H., Michelis M A., Wormser G P., Lewin S., Gold J., Tapper M L., Giron J., Lerner C W., Armstrong D., Setia U., Sender J A., Siebken R S., Nicholas P., Arlen Z., Maayan S., Ernst J A., Siegal F P., Cunningham-Rundles S.** 1982. Opportunistic infection in previously healthy women. Initial manifestations of a community-acquired cellular immunodeficiency. *Ann. Intern. Med.* 97: 533.
- Matheson P B; Weedon J; Cappelli M; Abrams E J; Shaffer N; Bamji M; Krasinski K; Lambert G; Kaul A; Grimm K; et al.** 1995. Comparison of methods of estimating the mother-to-child transmission rate of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *Am J Epidemiol.* 142: 714.
- Matthews T J., Langlois A J., Robey W G., Chang N T., Gallo R C., Fischinger P J. and Bolognesi D P.** 1986. Restricted neutralization of divergent human T-lymphotropic virus type III isolates by antibodies to the major envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 83: 9709.

- McClure M O., Sattentau Q J., Beverly P C L., Hearn J P., Fitzgerald A K., Zuckerman A J. and Weiss R A.** 1987. HIV infection of primate lymphocytes and conservation of the CD4 receptor. *Nature*. 330: 487.
- McClure M O., Marsh M. and Weiss R A.** 1988. Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *EMBO J.* 7:513.
- McClure M O., Moore J P., Blanc D F., Scotting P., Cook G M., Keynes R J., Weber J N., Davies D. and Weiss R A.** 1992. Investigations into the mechanism by which sulfated polysaccharides inhibit HIV infection *in vitro*. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1992. *Aids Res Hum Retroviruses*. 8: 19.
- McCurre J M., Rabin L B., Feinberg M B., Lieberman M., Kosek J C., Reyes G R. and Weissman I L.** 1988. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 53: 55.
- McDougal J S., Kennedy M S., Sligh J M., Cort S P., Nawle A. and Nicholson J K A.** 1986a. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of 110K viral protein and T4 molecules. *Science* 231: 382.
- McDougal J S., Nicholson J K A., Cross G D., Cort S P., Kennedy M S. and Mawle A C.** 1986b. Binding of the human retrovirus HTLV-III/LAV/ARV/HIV to the CD4 (T4) molecule: conformation dependence, epitope mapping antibody inhibition and potential for idiotypic mimicry. *J. Immunol.* 137:2937.
- McKeating J A. and Willey R L.** 1989. Structural and function of the HIV-1 envelope. *AIDS* 3: S35.
- McKeating J A., McKnight A. and Moore J P.** 1991a. Differential loss of envelope glycoprotein gp120 from virions of human immunodeficiency virus type 1 isolates: effects on infectivity and neutralization. *J Virol.* 65: 852.
- McKeating J A., Moore J P., Ferguson M., Graham S., Almond J W., Evans D J. and Weiss R A.** 1991b. Monoclonal antibodies to the C4 region of human immunodeficiency virus type 1 gp120 :Use in topological analysis of a CD4 binding site. *AIDS. Res. Hum. Retrovirus*.
- McKeating J A., Thali M Furman C., Karwowska S., Gorny M K. and Cordell J.** 1992. Amino acid residues of the HIV-1 gp120 critical for binding of rat and human neutralizing antibodies that block the gp120-sCD4 interaction. *Virology*. 190: 134.
- McKeating J A., Shotton C., Cordell J., Graham S., Balfe P., Sullivan N., Charles M., Page M., Blomstedt A., Olofsson S., Kayman S C., Wu Z., Pinter A., Dean C., Sodroski J. and Weiss R A.** 1993. Characterization of neutralizing monoclonal antibodies to linear and conformation-dependent epitopes within the first and second variable domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol.* 67: 4932.
- McKnight A. and Clapham P R.** 1995. Immune escape and tropism of HIV. *Trends Microbiol.* 3: 356.

- Meyaard L., Otto S A., Keet I P M., VanLier R A W. and Miedema F.** 1994. Changes in cytokine secretion patterns of CD4+ T-cell clones in human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 84: 4262.
- Miedema F, Tersmette M, van Lier R A.** 1990. AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system. *Immunol Today*. 11: 293.
- Miedema F., Meynard L., Koot M., Klein M R., Roos M T L., Groenink M., Fouchier R A M., Van't Wout A B., Tersmette M., Schellekens P T A., and Shuitemaker H.** 1994. Changing virus-host interactions in the course of HIV-1 infection. *Immunol. Rev.* 140: 35.
- Milani D, Mazzone M, Zauli G, Mischiati C, Gibellini D, Giacca M, Capitani S.** 1998. HIV-1 Tat induces tyrosine phosphorylation of p125FAK and its association with phosphoinositide 3-kinase in PC12 cells. *AIDS*. 12: 1275.
- Milman D., Mathur U., Enlow R W., Romain P L., Winchester R J., Colp C., Singman H., Adelsberg B R. and Spigland L.** 1982. Opportunistic infections and immune deficiency in homosexual men. *Ann Intern Med*. 96: 700.
- Miller M D., Warmerdam M T., Page K A., Feinberg M B. and Greene W C.** 1995. Expression of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nef gene during HIV-1 production increases progeny particle infectivity independently of gp160 or viral entry. *J Virol*. 69: 579.
- Missé D., Cerruti M., Schmidt I., Jansen A., Devauchelle G., Jansen F. and Véas F.** 1998. Dissociation of the CD4 and CXCR4 binding properties of human immunodeficiency virus type 1 gp120 by deletion of the first putative alpha-helical conserved structure. *J Virol*. 72: 7280.
- Modrow S., Hahn B H., Shaw G M., Gallo R C., Wong-Stall F. and Wolf H.** 1987. Computer-assisted analysis of envelope protein sequences of seven Human Immunodeficiency Virus isolates: prediction of antigenic epitopes in conserved and variable regions. *J. Virol*. 61: 570.
- Mondor I., Ugolini S. and Q. Sattentau.** 1998. Human immunodeficiency virus type 1 attachment to Hela CD4 cells is CD4 independent and gp120 dependent and requires cell surface heparans. *J. Virol*. 72: 3623
- Montagnier L., Grust J., Chamaret S., Dauguet C., Ascaler C., Guetard D., Nugeyre M., Barre-Sinoussi F., Chermann J C., Brunet J B., Klatzmann D. and Gluckman J C.** 1984. Adaptation of human lymphadenopathy-associated virus (LAV) to replication in EBV-transformed B lymphoblastoid cell lines. *Science*. 225: 63.
- Montefiori D C.** 1997. Role of complement and Fc receptors in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Springer Semin Immunopathol*. 18: 371.
- Moore J P., McKeating J A., Norton W A. and Sattentau Q J.** 1991. Direct measurement of soluble CD4 binding to human immunodeficiency virus type 1 virions: gp120 dissociation and its implications for virus-cell binding and fusion reactions and their neutralization by soluble CD4. *J. Virol*. 65: 1133.

- Moore J P. and Nara P L.** 1991. The role of the V3 loop of gp120 in HIV infection. *Aids* 5: 21.
- Moore J P. and Ho D D.** 1993. Antibodies to discontinuous or conformationally sensitive epitopes of gp120 glycoprotein of HIV type 1 are highly prevalent in sera of infected humans. *J Virol* 67: 863.
- Moore J P. Jameson B A. Weiss R A. and Sattentau Q J.** 1993a. The HIV-Cell fusion reaction. CRC Press Boca Raton. FL. 233.
- Moore J P., Burkly L C., Connor R I., Cao Y., Tizard R., Ho D D., and Fisher R A.** 1993b. Adaptation of two primary human immunodeficiency virus type 1 isolates to growth in transformed T cell lines correlates with alterations in the responses of their envelope glycoproteins to soluble CD4. *AIDS. Res. Hum. Retroviruses* 9:529.
- Moore J., Sattentau Q., Yoshiyama H., Thali M., Charles M., Sullivan N., Poon S W., Traincard F., Pincus M., Robey G., Robinson J E., Ho D D. and Sodroski J.** 1993c. Probing the structure of the V2 domain of HIV type 1 surface glycoprotein gp120 with a panel of eight monoclonal antibodies: Human immune response to the V1 and V2 domains. *J. Virol.* 68: 469.
- Moore J., Thali M., Jameson B A., Vigneaux F., Lewis G K., Poon S W., Charles M., Fung M S., Sun B., Durda P M., Åkerblom L., Warhen B., Ho D D., Sattentau Q. and Sodroski J.** 1993d. Immunochemical analysis of the gp120 surface glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1: Probing the structure of the C4 domain with the V3 loop. *J Virol.* 67: 4785.
- Moore J., Sattentau Q., Wyatt R. and Sodroski J.** 1994. Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J. Virol.* 68: 469.
- Moore J.P., A. Trkokla, and T. Dragic.** 1997. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr. Opin. Immunol.* 9: 551.
- Morellet N., Jullian N., de Rocquigny H., Maignet B., Darlix J L. and Roque B.** 1992. Determination of the structure of the nucleocapsid protein Ncp7 from the human immunodeficiency virus type 1 by ¹H NMR. *EMBO. J.* 11: 3059.
- Muesing M A., Smith D H., Cabradilla C., Benton C V. Lasky L., and Capon D J.** 1985. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS /lymphadenopathy retrovirus. *Nature (London).* 313: 450.
- Myers G., Korber H., Wain-Hobson S., Smith R F. and Pavlakis G N.** 1993. Human retroviruses and AIDS. Los Alamos National Laboratory.

- N -

Nakajima K., Martinez-Maza O., Hirano T., Breen E C., Nishanian P G., Salazar-Gonzalez F J., Fahey J L., and Kishimoto T. 1989. Induction of IL-6 (B cell stimulatory factor/IFN-B2) production by HIV. *J. Immunol.* 142: 531.

Nelson J A., Wiler C A., Reynolds-Kohler C., Reese E., Margaretten W. and Levy J A. 1988. Human immunodeficiency virus detected in bowel epithelium from a patient with gastrointestinal symptoms. *Lancet* i: 259.

Neudorf S M, Jones M M, McCarthy B M, Harmony J A, Choi EM. 1990. The CD4 molecule transmits biochemical information important in the regulation of T lymphocyte activity. *Cell Immunol.* 125:301.

Nygren A., Bergman T., Mathews T., Jornvall H., and Wigzel H. 1988. 95- and 25 kDa fragments of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 bind to the CD4 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 85: 6543.

- O -

O'Brien W A., Koyanagi Y., Namazie A., Zhao J Q., Diagne A., Idler K., Zack J A. and Chen I S Y. 1990. HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp 120 outside the CD 4-binding domain. *Nature* 348: 69.

O'Brien W A., Chen I S Y., Ho D D. and Daar E S. 1992. Mapping genetic determinants for human immunodeficiency virus type 1 resistance to soluble CD4. *J. Virol.* 66: 3125.

Oberlin E., Amara A., Bachelerie F., Bessia C., Virelizier J L., Arenzana Seisdedos F., Schwartz O., Heard J M., Clark Lewis I., Legler D F., Loetscher M., Baggiolini M., and Moser B. 1996. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382: 833.

Olsen H S., Nelbock P., Cochrane W. and Rosen C A. 1990. Secondary structure is the major determinant for interaction of HIV rev protein with RNA. *Science.* 247: 845.

Olshevsky U., Helseth E., Furman C., Li J., Haseltine W. and J. Sodroski. 1990. Identification of individual human immunodeficiency virus type 1 gp120 amino acids important for CD4 receptor binding. *J. Virol.* 64: 5701.

Oravecz T., Rodriquez G., Koffi J., Wang J., Ditto M., Bou-Habib D C., Lusso P. and Norcross M. 1995. CD26 expression correlates with entry, replication and cytopathicity of monocytotropic HIV-1 strains in a T-cell line. *Nature Medicine* 1: 919.

Oravecz T., Pall M., Roderiquez G., Gorrell M D., Ditto M., Nguyen N Y., Boykins R., Unsworth E and Norcross M A. 1997. Regulation of the receptor specificity and function of the chemokine RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) by dipeptidyl peptidase IV (CD26)-mediated cleavage. *J Exp Med.* 186: 1865.

- P -

Pang S., Koyanagi Y, Miles S., Wiley C., Vinters H. V. and Chen I.S.Y. 1990. High levels of unintegrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients. *Nature* 343: 85.

Pantaleo S., Butini L., Graziosi C., Poli G., Schnittman S M., Greenhouse J J., Gallin J L. and Fauci A S. 1991. Human immunodeficiency virus (HIV) infection in CD4+ T lymphocytes genetically deficient in LFA-1: LFA-1 is required for HIV mediated cell fusion but not for viral transmission. *J. Exp. MED.* 173:511.

Parmentier M., Libert F., Vassart G. 1995. La famille des récepteurs couplés aux protéines G et ses orphelins. *Médecine/Sciences* 11: 222.

Patience C., Mcknight A., Clapham P R., Boyd M T., Weiss R A. and Schultz T F. 1994. CD26 antigen and HIV fusion?. *Science.* 264: 1156.

Patterson S., and Knight S C. 1987. Susceptibility of human peripheral blood dendritic cells to infection by human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* 68: 1177.

Patterson S., Macatonia S E., Gross J. and Knight S C. 1990. Infection of bone marrow derived dendritic cells with HIV. *Modern Pathology of AIDS and other retroviral infections.* 51.

Pauza C D. and Price T M. 1988. Human immunodeficiency virus infection of T cells and monocytes proceeds *via* receptor-mediated endocytosis. *J Cell Biol.* 107: 959.

Paxton W A., Dragic T., Koup R A. and Moore J P. 1996. The beta-chemokines, HIV type 1 second receptors, and exposed uninfected persons. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12: 1203.

Peliska J A. and Benkovic S J. 1992. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 258:1112.

Peterson A. and Seed B. 1988. Genetic analysis of monoclonal antibody and HIV binding sites on the human lymphocyte antigen CD4. *Cell.* 54: 65.

Phillips D M. 1994. The role of cell-to-cell transmission in HIV infection. *AIDS* 8:719.

Phillips D M. and Bourinbaier A S. 1992. Mechanism of HIV spread from lymphocytes to epithelia. *Virology* 186:261.

Pinter A., Honnen W J., Tilley S A., Bona C., Zaghouani H., Gorny M K. and Zolla P S. 1989. Oligomeric structure of gp 41, the transmembrane protein of human immunodeficiency. *J. Virol.* 63: 2674.

Pinter A., Honnen W J. and Tilley S A. 1993. Conformational changes affecting the V3 and CD4-binding domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120 associated with env processing and with binding of ligands to these sites. *J. Virol.* 67:5692.

Plata F., Garcia-Pons F., Ryter A., Lebargy F., Goodnow M., Huyn Quan Dat M.,

Autran B. and Mayaud C. 1990. HIV-1 infection of lung alveolar fibroblasts and macrophages in humans. *AIDS Research*. 8: 979.

Pleskoff O., Sol N., Labrosse B. and Alizon M. 1997. Human immunodeficiency virus strains differ in their ability to infect CD4+ cells expressing the rat homolog of CXCR-4 (fusin). *J Virol*. 71: 3259.

Poli G. et Fauci A S. 1993. Cytokine modulation of HIV expression. *Semin Immunol* 5: 165.

Pollard S R., Rosa M.D., Rosa J J. and Wiley D C. 1992. Truncated variants of gp120 bind CD4 with high affinity and suggest a minimum CD4 binding region. *EMBO. J.* 11: 585.

Popik. W., J E. Hesselgesser, and P M. Pitha. 1998. Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signaling pathway. *J. Virol.* 72: 6406.

Posner S R., Hidshima T., Cannon T., Mukherjee M., Mayer K H. and Byrn R A. 1991. An IgG human monoclonal antibody that reacts with HIV-1/gp120, inhibits virus binding to cells, and neutralises infection. *J Immunol.* 146: 4325.

Posner M R., Cavacini L A., Emes C., Power J. and Byrn R. 1993. Neutralization of HIV-1 by F105, a human monoclonal antibody to the CD4 binding site of gp120. *J Acq Immune Defic Syndr.* 6: 7.

Preston B D., Poiesz B J. and Loeb L A. 1988. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 242: 1168.

Proost P., Struyf S., Schols D., Durinx C., Wuyts A., Lenaerts J P., De Clercq E., De Meester I. and Van Damme J. 1998. Processing by CD26/dipeptidyl-peptidase IV reduces the chemotactic and anti-HIV-1 activity of stromal-cell-derived factor-1alpha. *FEBS Lett.* 432: 73.

Putney S D., Matthews T J., Robey W G., Lynn D L., Robert-Guroff M., Mueller W T., Langlois A., Ghayeb J., Petteway S R., Weinhold K J., Fishinger P J., Wong-Staal., Gallo R C. and Bolognesi D P. 1986. HTLVIII/LAV-neutralizing antibodies to an E. coli-produced fragment of the virus envelope. *Science.* 234: 1392.

- Q -

Quershi N M., Coy D H., Garry R F., Henderson L A. 1990. Characterization of putative cellular receptor for HIV-1 gp41 using synthetic peptides. *AIDS.* 4: 553.

Quillent C., Oberlin E., Braun J., Rousset D., Gonzales-Canali G., Métais P., Montagnier L., Virelizier JL., Arenzana-Seisdedos F. and Beretta A. 1998. HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet.* 351: 14.

- R -

Ramsey C.A. and Panganiban A.T. 1993. Replication of the retroviral terminal repeat sequence during *in vivo* reverse transcription. *J. Virol.* 67: 4114.

Rao Z., Belyaev A S., Fry E., Roy P., Jones I M. and Stuart D I. 1995. Crystal structure of SIV matrix antigen and implications for virus assembly. *Nature.* 378: 743.

Ratner L., Haseltine W., Patarca R., Livak K J., Starcich B., Josheps S F., Doran E R., Rafalski A., Whitehorn E A., Baumeister K et al. 1985. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature.* 313: 227.

Ratner L. and Niederman T M J. 1995. Nef. Transacting Functions of Human Retroviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* 193: 169.

Reisinger E C., Vogetseder W., Berzow D., Köfler D., Bitterlich G., Lehr H. A., Wachter H. and Dierich M. P. 1990. Complement-mediated enhancement of HIV-1 infection of the monoblastoid cell line U 937. *AIDS.* 4: 961.

Rivadeneira E D., Sauls D L., Yu Y., Haynes B F. and Weinberg J B. 1995. Inhibition of HIV type 1 infection of mononuclear phagocytes by anti-CD44 antibodies. *Aids Res. Hum. Retroviruses* 11: 541.

Rizzuto C D., Wyatt R., Hernandez-Ramos N., Sun Y., Kwong P D., Hendrickson W A., Sodroski J. 1998. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science.* 280: 1949.

Rizvi T A., and Panganiban, A T. 1993. Simian immunodeficiency virus RNA is efficiently encapsidated by human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* 67:2681.

Roberts D L., Bebenek K. and Kunkel T A. 1988. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* 242: 1171.

Robey W G., Arthur L O., Mathews T J., Langlois A., Copeland T D., Lerche N W., Oroszlan S., Bolognesi D P., Gilden A V. and Fischinger P J. 1986. Prospect for prevention of human immunodeficiency virus infection: Purified 120kDa envelope glycoprotein induces neutralizing antibody. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 83: 7023.

Rogel M E., Wu L I. and Emerman M. 1995. The human immunodeficiency virus type 1 Vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J Virol.* 69: 882.

Rogers M F. 1985. AIDS in children: A review of the clinical, epidemiologic and public health aspects. *Pediatr Infect Dis.* 4: 230.

Romagnani S. 1992. Induction of TH-1 and TH-2 response: a key role for the « natural » immune response. *Immunol. Today* 13: 379.

Romero I A., Teixeira A, Strosberg A D., Cazaubon S. and Couraud P O. 1998. The HIV-1 nef protein inhibits extracellular signal-regulated kinase-dependent DNA synthesis in a

human astrocytic cell line. *J Neurochem.* 70: 778.

Rosen C A., Sodroski J. and Haseltine W A. 1985. The location of cis-acting regulatory sequences in human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. *Cell.* 41: 813.

Rouzioux C., Costagliola D., Burgard M., Blanche S., Mayaux M J., Griscelli C., Valleron A J. 1993. Timing of mother-to-child HIV-1 transmission depends on maternal status. The HIV Infection in Newborns French Collaborative Study Group. *AIDS.* 2: S49.

Rucker J., Samson M., Doranz B J., Libert F., Berson J F., Yi Y., Smyth R J., Collman R G., Broder C C., Vassart G., Doms R W. and Parmentier M. 1996. Regions in beta-chemokine receptors CCR5 and CCR2b that determine HIV-1 cofactor specificity. *Cell.* 87: 437.

Rusche J R., Javaherian K., McDanal C., Petro J., Lynn D L., Grimalia R., Langlois A., Gallo R C., Arthur L O., Fischinger P J., Bolognesi D P., Putney S. and Mathews T J. 1988. Antibodies that inhibits fusion of HIV-1 infected cells bind to 24 amino acid sequence of the viral envelope, gp120. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 85: 3198.

Ryu S E., Kwong P D., Truneh A., Porter T G., Arthos J., Rosenberg M., Dai X P., Xuong N H., Axel R., Sweet R W., et al. 1990. Crystal structure of an HIV -binding recombinant fragment of human CD4. *Nature.* 348. 419.

- S -

Saag M S., Hahn B H., Gibbons J., Li Y., Parks E S. and Shaw, G.M. 1988. Extensive variation of human immunodeficiency virus *in vivo*. *Nature (London)* 334: 440.

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

Salghetti S., Mariani R. and Skowronski J. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef and P56lck protein-tyrosine kinase interact with a common element in CD4 cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad (USA).* 92: 349.

Samson M., Libert F., Doranz B J., Rucker J., Liesnard C., Farber C M., Saragosti S., Lapoumeroulie C., Cognaux J., Forceille C., Muyldermans G., Verhofstede C., Burtonboy G., Georges M., Imai T., Rana S., Yi Y., Smyth R J., Collman R G., Doms R W., Vassart G. and M. Parmentier. 1996. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382: 722.

Santos N C., Prieto M. and Castanho M A R B. 1998. Interaction of the major epitope region of HIV protein gp41 with membrane model systems. A fluorescence spectroscopy study. *Biochemistry.* 37: 8674.

Sato H., Orenstein J M., Dimitrov D. and Martin, M. 1992. Cell-to-cell spread of HIV-1

occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles. *Virology* 186: 712.

Sattentau Q. J., Dalglish A. G., Weiss R. A. and Beverley P. C. L. 1986. Epitopes of the CD4 antigen and HIV infection. *Science* 234: 1120.

Sattentau Q J., Arthos J., Deen K., Hanna N., Healey D., Beverley P C L. and Sweet R. 1989. Structural analysis of human immunodeficiency virus-binding domain of CD4. Epitope mapping with site- directed mutants and anti-idiotypes. *J. Exp. Med.* 170: 1319.

Sattentau Q J. and Moore J P. 1991. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J. Exp. Med.* 174: 407.

Sattentau Q J. and Moore J. P. 1993. The role of CD4 in HIV binding and entry. *Biological Sciences* 342: 59.

Sattentau Q J., Moore J P., Vignaux F., Traincard F. and Poignard P. 1993. Conformational changes induced in the envelope glycoproteins of the human and simian immunodeficiency viruses by soluble receptor binding. *J. Virol.* 67: 7383.

Sattentau Q J., Zolla-Pazner S. and Poignard P. 1995. Epitope exposure on functional, oligomeric HIV-1 gp41 molecules. *Virology.* 206: 713.

Sattentau Q J. 1996. The role of the envelope glycoproteins in HIV-1 transmission and pathogenesis. In : HIV Infection in CD4- cells. J. Fantini and J.M. Sabatier (eds.), *Perspectives in Drug Discovery and Design*, vol. 5 : 1.

Sattentau QJ. 1998. HIV gp120: double lock strategy foils host defences. *Structure.* 6:945.

Schawaller M., Smith G E., Skehel J J. and Wiley D C. 1989. Studies with cross-linking reagents on the oligomeric structure of the env glycoprotein of HIV. *Virology* 172: 367.

Schmidtayerova H., Sherry B. and Bukrinsky M. 1996. Chemokines and HIV replication. *Nature* 382: 767.

Schols D., Struyf S., Van Damme J., Esté J A., Henson G. and De Clercq E. 1997. Inhibition of T-tropic HIV strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J. Exp. Med.* 186: 1383.

Scott W S. and Griffith J D. 1994. Human Immunodeficiency virus type 1 may preferentially integrate into chromatin occupied by L1Hs repetitive elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5557.

Schubert U., Bour S., Ferrer-Montiel A., Montal M., Maldarelli F. and Strebel K. 1996. The twobiological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *J Virol.* 70: 809.

Sharon M W., Orenstein J M. and Smith P D. 1996. Macrophage functions in HIV-1 infection. In : *Immunology of HIV infection*, S. Gupta (ed.), Chap. 15: 303.

Shearer G M., Bernstein D C., Tung K S K., Via C S., Redfield R., Salihuddin S Z. and Gallo RC. 1986. A model for the selective loss of the major histocompatibility complex self-restricted T cell immune responses during the developing of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *J Immunol.* 137: 2514.

Sherman M A., Dickson M L., and Fufe J A. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 integration protein: DNA sequence requirements for cleaving and joining reactions. *J. Virol.* 66:3593.

Shioda T., Kato H., Ohnishi Y., Tashiro K., Ikegawa M., Nakayama E E., Hu H., Kato A., Sakai Y., Liu H., Honjo T., Nomoto A., Iwamoto A., Morimoto C., Nagai, Y. 1998. Anti-HIV-1 and chemotactic activities of human stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α) and SDF-1 β are abolished by CD26/dipeptidyl peptidase IV-mediated cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 6331.

Shotton C., Arnold C., Sattentau Q., Sodroski J. and McKeating J A. 1995. Identification and characterization of monoclonal antibodies specific for polymorphic antigenic determinants within the V2 region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein.

Siegal F P., Lopez C., Hammer G S., Brown A E., Kornfeld S J., Gold J., Hassett J., Hirschman S Z., Cunningham-Rundles C., Adelsberg B R. 1981. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative Herpes simplex lesions. *N. Engl. J. Med.* 305: 1465.

Signoret N., Oldridge J., Pelchen-Matthews A., Klasse P J., Tran T., Brass L F., Rosenkilde M M., Schwartz T W., Holmes W., Dallas W., Luther M A., Wells T N C., Hoxie J A., Marsh M. 1997. Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *The Journal of Cell Biology.* 139: 651.

Simmon J H M, Stumbles P., Signoret N., Somoza C., Puklavec M., Sattentau Q J., Barclay A N, and James W. 1997. Role of CD4 epitope outside the gp120-binding site during entry of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.* 71: 1476.

Simon F., Maucière P., Roques P., Loussert-Ajaka I., Müller-Trutwin M C., Saragosti S., Georges-Courbot M C., Barré-Sinoussi F. and Brun-Vézinet F. 1998. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Medicine.* 4: 1032.

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

Slepishkin V A., Kornilaeva V G., Andreev S M., Sidorova M V., Petrukhina, A O. 1993. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) penetration into target cells by synthetic peptides mimicking the N-terminus of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Virology* 194: 294.

Smith K J., Shelton H G., Drabick J J., McCarthy W F., Ledsky R. and Wagner K F. 1994. Hypereosinophilia secondary to immune dysregulation in patients with HIV disease.

Arch Dermatol. 130: 119.

Sodroski J, Patarca R, Rosen C, Wong-Staal F. and Haseltine W. 1985. Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* 229: 74.

Sodroski J., Goh W C., Rosen K., Campbell K. and Haseltine W A. 1986a. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation cytopathicity. *Nature*. 322: 470.

Sodroski J., Goh W C., Rosen K., Dayton A., Terwilliger E. and Haseltine W. A. 1986b. a second post-transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* 321: 74.

Sol N., Ferchal F., Braun J., Pleskoff O., Trébouté C. and Alizon M. 1997. Usage of the coreceptors CCR-5, CCR-3, and CXCR-4 by primary and cell line-adapted human immunodeficiency virus type 2. *J. Virol.* 71: 8237.

Sonigo P., Alizon M., Ktaskus K., Klatzmann D., Cole S., Danos O., Retzel E., Tiollais P., Haase A. and Wain-Hobson S. 1985. Nucleotide sequence of the Visna lentivirus; relationship to the AIDS virus. *Cell* 42: 369.

Stamatos L. and Cheng-Mayer. 1993. Evidence that the structural conformation of envelope gp120 affects human immunodeficiency virus type 1 infectivity, host range and syncytium formation ability. *J. Virol* 67: 5635.

Steimer K S., Scandella C J., Stiles P V. and Haigwood N L. 1991a. Neutralization of divergent HIV-1 isolates by conformation dependent human antibodies to gp120. *Science*. 254: 105.

Steimer K S., Klasse P J., and McKeating J A. 1991b. HIV-1 neutralization directed to epitopes other than linear V3 determinants. *AIDS* 5: 135.

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

Stein B S. and Engleman G E. 1990. Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. *J. Biol. Chem.* 265: 2640.

Stern B., Denisova D G., Buyaner D., Raviv D. and Gershoni J M. 1997. Helical epitopes determined by low-stringency antibody screening of a combinatorial peptide library. *FASEB J.* 11: 147.

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

Sullivan N., Thali M., Furman C., Ho D D. and Sodroski J. 1993. Effect of amino acid changes in the V1/V2 region of the human immunodeficiency virus type 1 gp 120 glycoprotein on subunit association, syncytium formation and recognition by neutralizing antibody. *J Virol.* 67: 3674.

Sullivan N, Sun Y, Sattentau Q, Thali M, Wu D, Denisova G, Gershoni J, Robinson J, Moore J. and Sodroski J. 1998. CD4-Induced conformational changes in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein: consequences for virus entry and neutralization. *J Virol.* 72: 4694.

Sun N C., Ho D D., Sun C R Y., Liou R S., Gordor W., Fung M S C., Li X L., Ting R S., Lee T H., Chang N T. and Chang T W. 1989. Generation and characterization of monoclonal antibodies to the putative CD4-binding domain of HIV-1 gp120. *J. Virol.* 63: 3579.

Syu W J., Huang J H., Essex M., and Lee T H. 1991. The N-terminal region of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120 contains potential binding site for CD4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 3695.

- T -

Tanese N., Telesnitsky A., Goff S P. 1991. Abortive reverse transcription by mutants of Moloney murine leukemia virus deficient in the reverse transcriptase-associated RNase H function. *J. Virol.* 65: 4387.

Taneto M., Ganzales-Scarano F. and Levy J A. 1989. Human immunodeficiency virus can infect CD4-negative human fibroblastoïde cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 63: 2527.

Taylor J., Pomerantz R., Bagasra O., Chowdhury M., Pappaport J., Khalili K. and Amini S. 1994a. TAR-independent transactivation by Tat in cells derived from the CNS: a novel mechanism of HIV-1 gene regulation. *EMBO J.* 11: 3395.

Taylor J., Pomerantz R., Raj G V., Kashanchi F., Brady N., Amini S. and Khalili K. 1994b. Central nervous system-derived cells express a κ B-binding activity that enhances human immunodeficiency virus type-1 transcription *in vitro* and facilitates TAR-independent transactivation by Tat. *J Virol.* 68: 3971.

Temin HM. 1993. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proc Natl Acad Sci U S A .* 90: 6900.

Thali M., Olshevsky U., Furman C., Gabuzda D., Postner M., and Sodroski J. 1991. Characterization of a discontinuous HIV-1 gp120 epitope recognized by a broadly reactive neutralizing human antibody. *J. Virol.* 65: 6188.

Thali M., Furman C., Ho D D., Robinson J., Tilley S., Pinter A. and Sodroski J. 1992. Discontinuous conserved neutralization epitopes overlapping the CD4 binding region of HIV-1 gp120 envelope glycoprotein. *J Virol.* 66: 5641.

Thali M., et al. and Sodroski J. 1993. Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J. Virol.* 67: 3978.

Thomas D J., Wall J S., Hainfeld J F., Kaczorek M., Boody F P., Trus B L., Eiserling F A. and Steven A C. 1991. GP160, the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1, is a dimer of 125-kilodalton subunits stabilized through interactions between their gp 41 domain. *J.Virol.*65: 3797.

Todd B J., Kedar P. and Pope J H. 1995. Syncytium induction in primary CD 4+ t-cell lines from normal donors by human immunodeficiency virus type 1 isolates with non-syncytium-inducing genotype and phenotype in MT-2. *J. Virol.* 69: 7099.

Tokiwa G, Dikic I, Lev S. and Schlessinger J. 1996. Activation of Pyk2 by stress signals and coupling with JNK signaling pathway. *Science.* 273: 792.

Tornatore C., Nath A., Amemiya K. and Mayor E O. 1991. Persistent human immunodeficiency virus type 1 infection in human fetal glial cells reactivated by T-cell factor(s) or by the cytokines tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta. *J Virol.* 65: 6094.

Trkola A., Dragic T., Arthos J., Binley J., Olson W., Allaway G., Cheng-Mayer C., Robinson J., Maddon P., and Moore J. 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 384: 184.

Trono D. 1992. Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses. *J; Virol.* 66: 4893.

- U -

Ugolini S., Moulard M., Mondor I., Barois N., Demandolx D., Hoxie J., BreLOT A., Alizon M., Davoust J. and Sattentau Q J. 1997. HIV-1 gp120 induces an association between CD4 and the chemokine receptor CXCR4. *J. Immunol.* 159: 3000.

- V -

Valentin A., Albert K., Feup E M. and Asjo B. 1994. Dual tropism for macrophages and lymphocytes is a common feature of primary human immunodeficiency virus 1 and 2 isolates. *J. Virol.* 68: 6684.

Van't Wout A B., Kootstra N A., Mulder-Kampinga G A., Albrecht- van-Lent N., Sherpier H J., Veenstra J., Boer K., Coutinho R A., Miedema F. and Schuitemaker H. 1994. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J. Clin. Invest.* 94: 2060.

Vanini S., Longhi R., Lazzarin A., Vigo E., Siccardi A. and Viale, G. 1993. Discrete regions of HIV-1 gp41 defined by syncytia-inducing affinity purified human antibodies. *AIDS.* 7: 167.

Varmus H E., and Swanstrom R. 1985. replication of retroviruses. In *RNA Tumor Viruses.*

Cold Spring Harbor, New York: 75.

Veronese F. D., DeVico A L., Copeland T D., Oroszlan S., Gallo R C. and Sarngadharan M G. 1985. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by HTLV-III/LAV envelope gene. *Science* 229: 1402.

Vesonen M., Linna T. and Vaheri A. 1991. Persistent inapparent HIV-1 infection of human neuroblastoma cells. *Arch Virol.* 120: 253.

Vincent M J., Raja N U. and Abdul-jabbar M. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induced degradation of chimeric envelope glycoprotein bearing the cytoplasmic and anchor domains of the CD4: Role of the cytoplasmic domain in Vpu-induced degradation in endoplasmic reticulum. *J Virol.* 67: 5538.

Vink C., Yeheskiely E., Van der Marel G A., Van Boom J H. and Plasterk R H. 1991. Site-specific hydrolysis and alcoholysis of human immunodeficiency virus DNA termini mediated by the viral integrase protein. *Nucleic Acids Res.* 19: 6691.

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

Vogel J., Hinrichs S H., Reynolds R K., Luciw P A. and Jay G. 1988. The HIV Tat gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice. *Nature (London).* 335:606.

Von Briesen, H., Andreesen, R., and Rusamen-Waigmann, H. 1990. Systematic classification of HIV biological subtypes on lymphocytes and monocytes/macrophages. *Virology* 178: 597.

- W -

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

Wain-Hobson S. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 quasispecies *in vivo* and *ex vivo*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 176: 181.

Walker C M., Moody D J., Stites D P. and Levy J A. 1986. CD8+ lymphocytes can control HIV infection *in vitro* by suppressing virus replication. *Science.* 234: 1563.

Wang J H., Yan Y W., Garrett T P Liu J H, Rodgers D W, Garlick R L, Tarr G E, Husain Y, Reinherz E L. and Harrison S C. 1990. Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature.* 348: 411.

Warrier S V., Pinter A., Honnen W J., Girard M., Muchmore E. and Tilley S A. 1994. A novel, glycan dependent epitope in the V2 domain of human immunodeficiency virus type 1 gp120 is recognized by a highly potent, neutralizing chimpanzee monoclonal antibody. *J Virol.* 68: 4636.

- Weber J., Clapham P R., McKeating J., Stratton M., Robey E. and Weiss R A.** 1989. Infection of brain cells by diverse human immunodeficiency virus isolates: role of CD4 as receptor. *J Gen Virol.* 70: 2653.
- Weiss R A.** 1996. HIV receptors and the pathogenesis of AIDS. *Science* 272: 1885.
- Weiss R A. and P R. Clapham.** 1996. Hot fusion of HIV. *Nature* 381: 647.
- Weissman D., Rabin, R L., Arthos J., Rubbert A., Dybul M., R. Swofford S. Venkatesan J.M. Farber A S. Fauci.** 1997. Macrophage-tropic HIV and SIV envelope proteins induce a signal through the CCR5 chemokine receptor. *Nature* 389: 981.
- Weistendorp M O., Li-Weber M., Frank R W. and Krammer P H.** 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion activated T cells. *J Virol.* 68: 4177.
- Werner A. and Levy, J.A.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120 is cleaved after incubation with recombinant soluble CD4. *J. Virol.* 67: 2566.
- Westervelt P., Trowbridge D B., Epstein L G., Blumberg B M., B M., Li Y., Hahn B H., Shaw G M., Price R W. and Ratner L.** 1992. Macrophage tropisme of human immunodeficiency virus type 1 *in vivo*. *J. Virol* 66: 2577.
- White J.M.** 1990. Viral and cellular membrane fusion proteins. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 675.
- Wild C., Greenwell T. and Matthews T.** 1993. A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS. Res. Hum. Retrovirus* 9: 1051.
- Willey R L., Madarelli F., Martin M A. and Strebel K.** 1992a. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J. Virol.* 66: 226.
- Willey R L., Madarelli F., Martin M A. and Strebel K.** 1992b. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* 66: 7193.
- Williams A F. and Barclay A N.** 1988. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition. *Ann Rev Immunol.* 6: 381.
- Wood G S., Warner N L. and Warnke R A.** 1983. Anti-Leu3/T4 antibodies react with cells of monocyte/ macrophage and Langerhans lineage. *J Immunol.* 131: 212.
- Wolinsky S M., Wike C M., Korber B T M., Hutto C., Parks W P., Rosenblum L L., Kuntsman K J., Furtado M R. and Munoz J L.** 1992. Selective transmission of human immunodeficiency virus type 1 variants from mothers to infants. *Science* 255: 1134.
- Wu X., Liu H., Ziao H., Kim J., Seshaiyah P., Natsoulis G., Boeke J D., Hahn B H. and Kappes J C.** 1995. Targeting fusion proteins to human immunodeficiency virus particles *via* fusion with Vpr and Vpx. *J Virol.* 69: 3389.

Wu L., N. Gerard R. Wyatt H. Choe C. Parolin N. Ruffing A. Boresetti A. Cardoso E. Desjardins W. Newman C. Gerard and J. Sodroski. 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384: 179.

Wyatt R., Sullivan N., Thali, M., Repke H., Ho D., Robinson J. Posner M. and Sodroski J. 1993. Functional and immunologic characterization of human immunodeficiency virus 1 envelope glycoproteins containing deletions of the major variable regions. *J. Virol.* 67: 4557.

Wyatt R., Desjardin E., Olshevsky U., Nixon C., Binley J., Olshevky V. and Sodroski J. 1997. Analysis of interaction of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 71: 9722.

Wyatt R., Kwong P D., Desjardins E., Sweet R W., Robinson J., Hendrickson W A and Sodroski J G. 1998. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature*, 393 : 705.

- Y -

Yahi N., Baghdiguiian S., Moreau H. and Fantini J. 1992. Galactosyl ceramide (or closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelia HT29 cells. *J. Virol.* 66: 4848.

Yahi N., Sabatier J M., Baghdiguiian S., Gonzalez-Scarano F. and Fantini J. 1995. Synthetic multimeric peptides derived from the principal neutralization domain (V3 loop) of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp120 bind to galactosylceramide and block HIV-1 infection in a human CD4-negative mucosal epithelial cell line. *J Virol.* 69: 320.

Yi Y., Rana S., Turner J D., Gaddis N., Collman R G. 1998. CXCR-4 is expressed by primary macrophages and supports CCR5-independent infectin by dual-tropic but not T-tropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72:

Yu Y G., King D S., and Shin Y K. 1994. Insertion of a coiled-coil peptide from influenza virus hemagglutinin into membranes. *Science*, 266: 274.

- Z -

Zack J A., Arrigo S J., Weitsman S R., Go A S., Haislip A. and Chen I S Y. 1990. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes : Molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell.* 61: 213.

Zapp M L., Hope T J., Parslow T G. and Green M R. 1991. Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: A dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc Natl Acad Sci (USA).* 88: 7734.

Zhao L J., Mukherjee S. and Narayan O. 1994. Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function. Specific interaction with a cellular protein. *J Biol Chem.* 269: 15577.

Zhang H., Bagasra O., Niikura M., Poiesz B J. and Pomerantz R J. 1994. Intravirion reverse transcripts in the peripheral blood plasma on human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 68: 75914.

Zhang L., Huang Y., He T., Cao Y. and Ho D D. 1996. HIV-1 subtype and second receptor use. *Nature* 383: 768.

Zhu T., Mo H., Wang N., Nam D S., Cao Y., Koup R A. and Ho D D. 1993. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 261: 1179.

Zinkernagel R. and Hengartner H. 1994. T cell-mediated immunopathology versus direct cytolysis by virus: implications for HIV and AIDS. 15: 263.

Zolla-Pazner S. and Gorny M K. 1998. Human immunodeficiency virus (HIV) envelope binds to CXCR4 independently of CD4, and binding can be enhanced by interaction with soluble CD4 or by HIV envelope deglycosylation. *J. of Virology.* 72. 3: 2500.

RESUME

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est l'agent étiologique du Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA). Pour pouvoir entrer dans les cellules qu'il infecte, le VIH doit tout d'abord interagir avec les protéines membranaires de l'hôte. Il est donc important de connaître les sites d'interaction des glycoprotéines d'enveloppe du virus avec les cellules cibles.

De manière générale, les agents pathogènes infectent l'hôte en utilisant des structures conservées. Ces structures sont capables de reconnaître les sites de fixation et de pénétration cellulaire.

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse nous ont permis de démontrer le rôle de l'hélice amphipatique alpha 1 (structure hautement conservée) de la gp120 dans les interactions entre la glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 et le récepteur CD4. Nous avons pu, après délétion de cette hélice alpha (E91-S115), obtenir une gp120 qui ne se fixe plus sur le CD4 mais qui maintient son interaction sur le co-récepteur CXCR4. Des mutations ponctuelles dans cette structure conservée de la gp120, nous ont permis de déterminer avec précision l'acide aminé (aa, W112) impliqué dans l'interaction gp120-CD4. Les données cristallographiques de la gp120, actuellement disponibles, nous ont permis de localiser avec précision, le W112. L'aa W112 est un élément majeur de la cavité de la gp120 impliquée dans l'interaction avec le CD4, et ce au même titre que le W 427 (de la région C4 de la gp120), décrit pendant plus de dix ans comme « site de fixation de la gp120 sur le CD4 ».

Outre la détermination de cette région d'interaction, nous avons également démontré que la glycoprotéine d'enveloppe gp120 est capable de reproduire les effets des chimiokines sur les cellules possédant leur récepteur (ici le CXCR4). Les réponses cellulaires observées sont : un chimiotactisme cellulaire, une mobilisation de la concentration intracellulaire de calcium, l'internalisation du co-récepteur CXCR4. Ces résultats sont observés indépendamment d'une fixation de la gp120 sur le récepteur CD4. Ces données pourraient expliquer qu'au travers du CXCR4, la gp120 serait capable d'induire des effets physiopathologiques "inconnus" jusqu'ici.

L'ensemble des résultats rapportés dans cette thèse nous permettent d'une part de mieux appréhender les mécanismes d'interaction entre la gp120 du VIH-1 et les récepteurs cellulaires, d'autre part d'appréhender des effets de la gp120 sur la physiopathologie du VIH.

Mots Clés : VIH-1, gp120, CXCR4, CD4, Structures Conservées, Interactions, Récepteurs, Co-récepteurs, Signalisation Cellulaire, Internalisation, Chimiotactisme.