

Université de Montréal

**ÉTUDE DU RÔLE DE NEF DANS L'ALTÉRATION DE LA TRANSDUCTION DU
SIGNAL CHEZ LES SOURIS TRANSGÉNIQUES CD4C/HIV^{NEF}**

Par

Patrick Vincent

**Département de microbiologie et immunologie
Programme de virologie et immunologie
Faculté de médecine**

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph.D) en microbiologie et immunologie,
option virologie et immunologie**

mars, 2006

© Patrick Vincent, 2006



W

4

U58

2006

V.052

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Cette thèse intitulée :

**ÉTUDE DU RÔLE DE NEF DANS L'ALTÉRATION DE LA TRANSDUCTION
DU SIGNAL CHEZ LES SOURIS TRANSGÉNIQUES CD4C/HIV^{NEF}**

présentée par:

Patrick Vincent

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

**Guy Lemay
président-rapporteur**

**Paul Jolicoeur
directeur de recherche**

**Zaher Hanna
Codirecteur de recherche**

**Anne Gatignol
membre du Jury**

**Thomas Moss
examineur externe**

**Pierre Chartrand
représentant du doyen de la FES**

RÉSUMÉ

Nef est une protéine de 27-31 kilodaltons (kDa) retrouvée chez tous les lentivirus primates. Une des caractéristiques conservées de la protéine Nef du virus de l'immunodéficience humain de type 1 (VIH-1) et du virus de l'immunodéficience simien (VIS) est son interaction avec une sérine/thréonine kinase identifiée comme étant membre de la famille p21-activated kinase (PAK). Cette fonction de Nef est très peu documentée *in vivo*, spécialement dans les cibles naturelles du VIH-1. La corrélation entre cette interaction et le développement de la pathogenèse n'est pas bien déterminée.

La première partie de cette thèse qui porte principalement sur l'importance de l'association entre Nef et PAK2 *in vivo* fut examinée dans trois types majeurs de cellules immunitaires chez les souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV^{mut} : les thymocytes, macrophages et cellules dendritiques. Nous avons démontré, tout comme dans les cellules humaines, que HIV-1 Nef s'associe et active seulement PAK2 dans les cellules lymphoïdes murines étudiées. Cette association mène à la phosphorylation de deux substrats de la kinase en plus de son autophosphorylation. Les substrats p85 et p95 semblent appartenir à la famille de PAK interacting exchanging factor – Cloned Out Of Library (PIX-COOL). Afin de mieux comprendre le rôle de l'interaction entre Nef et PAK2 dans le développement de la maladie similaire au SIDA *in vivo*, nous avons généré de nouvelles lignées transgéniques exprimant différentes mutations de la protéine Nef. Des souris Tg exprimant les mutations P⁶⁹A, P⁷²AxxP⁷⁵A or RR¹⁰⁶AA (toutes reconnues pour abolir l'interaction entre Nef et PAK2 chez les lignées cellulaires humaines) n'ont développé aucune maladie et n'ont démontré aucun phénotype retrouvé chez les souris exprimant l'allèle sauvage sauf une régulation négative de la molécule de surface CD4 et une déplétion des lymphocytes T. D'autres souris Tg exprimant une forme mutée de Nef dans les domaines reconnus pour abolir la régulation négative du CD4, Nef^{RD35AA} et Nef^{D174K}, n'ont également développé aucun signe de maladie. Chez ce groupe de souris, l'interaction entre Nef et PAK2 fut maintenue. La mutation du site de myristylation, domaine important pour le ciblage de Nef à la membrane plasmique abolit également l'association entre Nef et la kinase ainsi que la progression de la maladie chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef^{G2A}. En conclusion, nous avons démontré que l'association entre Nef et PAK2 pourrait être requise mais n'est pas suffisante pour induire la maladie similaire au SIDA chez les souris Tg.

La deuxième partie de la thèse porte sur la caractérisation de certains phénotypes retrouvés chez les macrophages péritonéaux provenant des souris Tg CD4C/HIV-Nef. Nous avons premièrement démontré que la morphologie des macrophages Tg est modifiée suite à leur adhésion sur une matrice. La taille ainsi que l'élongation des cellules Tg est plus petite que celle de leur témoin non-Tg. La production de Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) et d'oxide nitrique (NO) était significativement plus élevée chez les macrophages Tg que chez les cellules témoins. L'internalisation de complexes immuns ainsi que la phagocytose de particules de zymosan ont été également plus élevées chez les macrophages Tg. La stimulation des cellules par le lipopolysaccharide (LPS) n'a pu augmenter le niveau de phagocytose et d'endocytose chez les cellules Tg contrairement aux cellules non-Tg. Un essai de migration cellulaire en réponse au MCP-5 a démontré une faible diminution de la migration des macrophages Tg comparativement aux cellules non-Tg. Une diminution de la viabilité cellulaire ainsi qu'une augmentation du marqueur apoptotique annexin V furent observées chez les macrophages exprimant la protéine Nef. Ces mêmes cellules démontrent également un délai de la mobilisation du calcium suite à une stimulation par l'IL-17 comparativement aux cellules témoins. Le contenu en protéines phosphorylées sur des résidus de tyrosine provenant d'extraits cellulaires de macrophages Tg et non-Tg démontre une augmentation du niveau de phosphorylation chez les cellules Tg et spécialement pour une protéine d'environ 70 kDa. Aucune différence significative ne fut observée entre les cellules Tg et non-Tg pour leur capacité à éliminer le pathogène intracellulaire *Listeria*. Finalement, les molécules iNOS et eNOS ne sont pas impliquées dans le développement de la maladie chez les souris Tg. En conclusion, les macrophages péritonéaux provenant de la souris CD4C/HIV-Nef démontrent des défaillances fonctionnelles face à divers stimuli.

Nous avons également étudié chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef l'effet de Nef sur l'état d'activation de la protéine Rac, reconnue pour son interaction avec les membres de la famille PAK. Nous avons démontré que Nef provoque une augmentation de la forme non activée de Rac liée au GDP et ce dans trois populations cellulaires étudiées : les thymocytes, les macrophages péritonéaux et les cellules dendritiques. Ces résultats suggèrent que l'inactivation de Rac par Nef soit un mécanisme important impliqué dans plusieurs phénotypes retrouvés chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef.

MOTS CLÉS : VIH, Souris transgénique, Nef, PAK2, Rac, cellules primaires, macrophages péritonéaux.

ABSTRACT

Nef is a 27-31 kilodaltons (kDa) protein found in all primate lentiviruses. One of the conserved characteristics of HIV or SIV Nef protein is its interaction with a serine/threonine kinase identified as one member of the p21-activated kinase (PAK). However, this Nef function is poorly documented *in vivo*, especially in the natural target of HIV-1. In addition, the correlation between this interaction and the Nef-associated pathogenesis is not well understood.

The first part of this thesis concerns the importance of the Nef/PAK2 interaction *in vivo*, in three major immune cell types: the thymocytes, macrophages and dendritic cells, in CD4C/HIV transgenic (Tg) mice. We showed that, as in human cells, HIV-Nef interacts with and specifically activates PAK2 in murine lymphoid cells. This interaction leads to the phosphorylation of two substrates in addition to the autophosphorylation of the kinase. The p85 and p95 phosphorylated substrates appear to belong the PAK-interacting exchanging factor family (PIX-COOL). In order to better understand the role of the Nef/PAK2 interaction in the development of the AIDS-like disease *in vivo*, we have generated new Tg lines expressing different Nef mutants. Tg mice expressing the P⁶⁹A, P⁷²AxxP⁷⁵A or RR¹⁰⁶AA mutations (all known to abolish the Nef/PAK interaction in human cell lines) failed to develop AIDS-like disease and did not show any of the phenotypes found in Tg mice expressing the wild type allele except a CD4 downregulation from cell surface and T cells depletion. Other Tg mice expressing Nef mutated in domains known to abolish CD4 downregulation, RD35AA and D174K, did not develop AIDS-like disease. In these groups of Tg mice, the Nef/PAK2 interaction was maintained. Mutation of myristylation site, an important domain to target Nef to the membrane, also abolished the Nef/PAK2 interaction and the AIDS-like disease in CD4C/HIV-Nef^{G2A} Tg mice. In conclusion, we have shown that the interaction between Nef and PAK2 could be required but is insufficient for the development of the AIDS-like disease in Tg mice.

The second part of the thesis concerns the characterization of some phenotypes found in peritoneal macrophages from CD4C/HIV-Nef Tg mice. We first demonstrated an altered morphology of Tg peritoneal macrophages following matrix adhesion. The size and the elongation of the Tg cells were reduced as compared to the wild type (non-Tg) control.

TNF- α and Nitric Oxide (NO) production is significantly increased in Tg cells compared to their control. Internalisation of immune complexes and phagocytosis of zymosan particles are also increase in Tg macrophages. LPS stimulation did not increase phagocytosis and endocytosis level in Tg cells while it does in non-Tg macrophages. A migration assay showed a slightly decreased migration of Tg macrophages in response to MCP-5 as compared to the control. In addition, these Tg macrophages displayed decrease viability and an increase Annexin V staining by FACS analysis was observed in macrophages expressing Nef. These cells also displayed a delay of calcium mobilization in response to IL-17 stimulation. Phosphotyrosine content analysis of macrophage lysates displayed higher levels of protein tyrosine phosphorylation and especially of a 70 kDa phosphoprotein. No significative difference was observed between Tg and wild type (non-Tg) macrophages in their capacity to kill intracellular *Listeria*. eNOS and iNOs were found to be dispensable for the development of the AIDS-like disease in Tg mice. In conclusion, Tg peritoneal macrophages displayed several impairments toward different stimuli.

We also studied the role of Nef on the activation of Rac protein in CD4C/HIV-Nef Tg mice. We found that the presence of Nef in Tg thymocytes, macrophages and dendritic cells increased the level of inactivated GDP-Rac compared to wild type non-Tg cells. These results suggest that the Nef-induced inactivation of Rac might be involved in several phenotypes observed in CD4C/HIV-Nef Tg mice.

KEYWORDS: HIV, transgenic mice, Nef, PAK2, Rac, primary cells, peritoneal macrophages

TABLE DES MATIÈRES

Page titre	i
Page d'identification du jury	ii
Résumé	iii
Abstract	v
Tables des matières	vii
Liste des figures	xii
Liste des tableaux	xiii
Liste des abréviations	xiv
Dédicace	xvii
Remerciements	xviii
Chapitre I	1
Introduction	2
1 Rétrovirus	2
1.1 Classification et caractéristiques	2
1.2 VIH	3
1.2.1 Génome	3
1.2.1.1 Gènes structuraux	5
1.2.1.2 Gènes régulateurs	8
1.2.1.3 Gènes auxiliaires	9
1.2.2 Cycle de réplication	11
1.2.2.1 Entrée	11
1.2.2.2 Transcription inverse	13
1.2.2.3 Intégration génomique	14
1.2.2.4 Transcription génique et exportation nucléaire	14
1.2.2.5 Assemblage viral	15
1.2.2.6 Bourgeonnement et maturation	16
1.3 Syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA)	17
1.3.1 Infection primaire	17
1.3.2 Phase de latence	19

1.3.3	Infection tardive	19
1.4	Structure et caractéristiques de la protéine Nef du VIH-1.	20
1.4.1	Régulation négative de la molécule CD4.	22
1.4.2	Régulation négative de la molécule CMHI	24
1.4.3	Augmentation de l'infectivité des particules virales	25
1.4.4	Altération de la transduction des signaux intracellulaires	26
1.4.4.1	Protéines reliées à Src	28
1.4.4.2	Mitogen-activated protein kinase (MAPK)	30
1.4.4.3	p21-activated kinase (PAK)	31
1.4.4.4	Autres kinases	33
1.4.4.5	Réarrangement du cytosquelette et chémotaxie	33
1.4.4.6	Survie cellulaire et apoptose	35
1.5	Fonctions <i>in vivo</i> de la protéine Nef	38
1.5.1	Nef chez les macaques	38
1.5.2	Nef chez les rongeurs.	41
1.5.2.1	Souris SCID.	41
1.5.2.2	Souris transgénique exprimant la protéine Nef	43
1.5.3	Rôle de la protéine Nef chez les individus infectés par le VIH-1	47
2	PAK	49
2.1	Description	49
2.1.1	Structure et régulation de l'activité enzymatique.	50
2.1.1.1	Activation de PAK dépendante des GTPases et sphingolipides	52
2.1.1.2	Activation de PAK indépendante des GTPases	52
2.1.1.3	Activation de PAK par phosphorylation et liaison protéique	53
2.2	Fonctions cellulaires des PAK 1-3	55
2.2.1	Réarrangements du cytosquelette	55
2.2.1.1	Effecteurs de PAK lors du réarrangement du cytosquelette	58
2.2.2	Transduction du signal intracellulaire	60
2.2.3	Apoptose et survie cellulaire	60
2.3	Fonctions biologiques <i>in vivo</i> des membres de la famille PAK	62
2.4	GTPase de la famille Rho	64
2.4.1	Fonctions cellulaires des GTPases dans les fibroblastes.	64

2.4.2	Fonctions biologiques des GTPases Rac in vivo.	66
Objectifs	69
Chapitre II	Activation of PAK2 and its association with Nef are conserved in murine cells, but are not sufficient to induce an AIDS-like disease in CD4C/HIV transgenic mice	71
	Avant-Propos	72
	Abstract	73
	Introduction	74
	Material and methods.	76
	Results	79
	Discussion	87
	References	91
Appendice I	109
	p95PKL est une protéine présente dans le complexe Nef/PAK2	109
	L'association entre Nef et NAK est indépendante de la présence de VAV.	111
	Le mutant Nef ^{T71R} démontre une plus grande phosphorylation de NAK et ses substrats	113
	L'interaction entre Nef et NAK est également présente chez différents allèles du VIH-1.	115
	L'expression de Nef dans une seule sous population cellulaire est suffisante pour permettre son interaction avec NAK.	117
	NAK est présent dans les thymocytes doubles négatifs des souris CD4C/SHIV-Nef ^{SIV}	119
	NAK est absent dans la moelle épinière des souris MBP/HIV ^{Nef}	122
Chapitre III	Functional characteristics of Nef-expressing peritoneal macrophages of CD4C/HIV ^{MutG} transgenic mice with clinically no evident diseases ...	124
	Avant-Propos	125
	Abstract	127
	Introduction	128
	Material and methods.	130
	Results	136
	Discussion	142

References	147
Appendice II	170
Les macrophages péritonéaux provenant des souris Tg où Nef interagit avec NAK démontrent un retard dans la formation de filipodes	170
Nef provoque la désactivation de Rac chez les cellules provenant des souris Tg	172
Chapitre IV	175
Conclusions	176
4.1 HIV-1 Nef interagit avec PAK2 dans un complexe protéique incluant β - PIX et p95PKL chez les souris Tg CD4C/HIV ^{mut}	176
4.1.1 VAV n'est pas présent dans le complexe Nef/NAK	177
4.1.2 L'interaction entre Nef et NAK est également présente chez Les souris Tg exprimant l'allèle T71R.	178
4.1.3 La présence de Nef dans une seule sous population cellulaire est suffisante pour permettre son interaction avec NAK	179
4.1.4 L'interaction entre Nef et NAK est un phénomène conservé chez divers allèles du VIH-1	180
4.1.5 NAK est présent dans les thymocytes double négatifs des souris Tg CD4C/ SHIV-nef ^{SIV}	1801
4.1.6 NAK est absent dans les oligodendrocytes des souris Tg MBP/HIV ^{Nef} ...	181
4.1.7 L'interaction entre Nef et PAK2 n'est pas suffisante pour induire la maladie.	182
4.2 Les macrophages exprimant la protéine Nef du VIH-1 démontrent un phénotype activé.	184
4.2.1 Nef provoque des changements au niveau de la structure du cytosquelette des macrophages.	184
4.2.2 Les macrophages péritonéaux Tg démontrent une déficience dans leurs activités d'endocytose et de phagocytose.	186
4.2.3 Nef augmente la phosphorylation des résidus de tyrosines des macrophages péritonéaux stimulés par le Fcy récepteur	186
4.3 Nef provoque une diminution de l'activité de Rac	188

4.4	L'interaction entre Nef et PAK2 joue-t-elle un rôle dans l'activation des cellules Tg ?	191
4.5	Quel est le rôle de Rac dans les phénotypes observés chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef ?	193
	Bibliographie	195

LISTE DES FIGURES

Figure 1-1:	Représentation schématique de la forme provirale du VIH-1 et les différents épissages alternatifs des ARNm	4
Figure 1-2:	Cycle de réplication du VIH-1.	12
Figure 1-3:	Structure de la protéine Nef du VIH-1.	21
Figure 1-4:	Structure du transgène CD4C/HIV ^{mutG}	45
Figure 1-5:	Structure des protéines membres de la classe PAKI	51
Figure 1-6:	Mécanismes d'activation des membres de la classe PAKI	56
Figure 1-7:	Mécanismes de régulation des GTPases de la famille Rho	65
Figure 2-1:	p95PKL est l'une des protéines cellulaires membre du complexe Nef/PAK2	110
Figure 2-2:	La protéine VAV n'est pas impliquée dans la formation du complexe Nef/NAK.	112
Figure 2-3:	Un variant naturel de Nef ayant une mutation dans la région de polyproline (T71R) démontre une phosphorylation accrue de NAK et ses substrats	114
Figure 2-4:	L'interaction entre Nef et NAK est également présente chez divers allèles du VIH-1	116
Figure 2-5:	L'expression de Nef dans une seule sous population cellulaire est suffisante pour permettre l'interaction Nef/NAK.	118
Figure 2-6:	NAK est présent chez les thymocytes doubles négatifs des souris CD4C/SHIV	121
Figure 2-7:	L'interaction entre Nef et NAK est absente chez les souris Tg MBP/HIVNef	123
Figure 3-1:	Nef retarde la formation de filipodes chez les macrophages péritonéaux provenant des souris Tg CD4C/HIV-Nef	171
Figure 3-2:	Nef inhibe l'activation de Rac dans les souris Tg CD4C/HIV-Nef	174

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Protéines cellulaires connues pour interagir avec Nef lors de ses différentes fonctions biologiques	37
Tableau II	Partenaires cellulaires et substrats connus des différents isoformes de PAK	63

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Abl:	abelson
ADN:	acide désoxyribonucléique
ADF:	actin depolymerization factor
AIDS:	acquire immunodeficiency syndrome
APOBEC3G:	apolipoprotein B editing catalytic subunit 3G
AP-1:	activated protein 1
AP-2:	activated protein 2
ARF-6:	ADP-ribosylation factor-6
ARN:	acide ribonudéique
ARNm:	acide ribonucléique messenger
ARNt:	acide ribonucléique de transfert
ASK-1 :	apoptosis signal regulation kinase-1
β-TRCP:	beta-transducing repeat-containing protein
CA:	protéine de la capsid
CAT :	cool-associated tyrosine phosphorylated
CDK1:	cyclin dependant kinase 1
CDK9:	cyclin dependant kinase 9
CTL:	cytotoxic T lymphocyte
CMHI:	complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
COOL:	cloned out of library
CRIB:	Cdc42 and Rac interactive binding
CypA:	cyclophiline A
DOCK:	dedicator of cytokinesis
ELISA:	enzyme-link immunosorbent assay
env:	gène de l'enveloppe
Env:	protéines de surface gp120 et gp41
ELMO:	engulfment and cell motility gene
ERK:	extracellular signal-regulated kinase
ESCRT:	endosomal sorting complexes required for transport
FAK:	focal adhesion kinase
gag:	group antigen surface; gène codant pour les protéines de l'enveloppe
Gag :	protéines de la matrice, capsid, nucléocapsid et p6
GAP:	GTPase activating protein
GDI:	guanidine nucleotide dissociating inhibitor
GDP:	guanosine di-phosphate
GTP:	guanosine tri-phosphate
GEF:	guanine nucleotide exchange factor
GIT1:	protein-coupled receptor kinase-interactor 1
gp:	glycoprotéine
GST:	Glutathione-S-transferase
HTLV:	human T-lymphotropic virus
IN:	intégrase
INOS:	inducible nitric oxide synthetase
JNK:	c-Jun N-terminal kinase

ITAM:	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
kb:	Kilo paire de base
kDa:	kilodalton
K.O.:	knockout
LAT:	Linker of activation of T cell
Lck:	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LPS:	lipopolysaccharide
LTR:	long terminal repeat
NF- κ B:	nuclear factor kappa B
NFAT:	nuclear factor of activated T cells
μ M:	micro molaire
MA :	protéine de la matrice
MAG:	myelin associated glycoprotein
MAPK:	mitogen-activated protein kinase
MBP:	myelin basic protein
MCP:	macrophage chemoattractant protein
MDCK:	Madin-Darby canine kidney
MLCK:	myosin light chain kinase
MIP:	macrophage inflammatory protein
NC:	rotéine de la nucléocapside
NAK:	Nef-associated kinase
nef:	gène codant pour negative factor
Nef:	protéine négative factor
nm:	nanomètre
NO:	nitric oxide
eNOS:	endothelial nitric oxide synthase
iNOS:	inducible nitroci oxide synthase
pol:	gène codant pour la polymerase
p95PKL:	p95 paxilin kinase linker
PACS-1:	phosphofurin acidic cluster sorting-1
PAK:	p-21 activated kinase
PBD:	p-21 binding domain
PBL:	peripheral blood lymphocytes
PBMC:	peripheriral blood mononuclear cell
PDK1:	phosphoinositide dependant kinase 1
PGDF:	prostaglandine derived factor
PI3K:	phosphatidyl inositol-3 kinase
PIX:	PAK interacting exchange factor
PKA:	proteine kinase A
PKC:	protein kinase C
PKL:	paxillin kinase linker
PMA:	phorbol myristil acetate
pol:	gene viral codant pour la transcriptase inverse, protease, RnaseH et intégrase
Pol:	protéines de l'intégrase, la transcriptase inverse et la protéase
POPX1:	partner of PIX1

POPX2:	partenr of PIX2
PP2A:	protein phosphatase 2A
PR:	protéase
pro:	gene codant pour la protease
P-TEF-b:	positive transcriptional elongation factor b
RACK1:	receptor for activated C kinase 1
R-MLK:	regulatory myosin light chain
rev :	gène codant pour la protéine responsable de l'export nucléaire des ARNm
Rev:	protéine responsable de l'export nucléaire des ARNm
RNA pol II:	DNA dependant RNA polymerase type II
ROK α :	RhoA-binding kinase α
RRE:	rev response element
RT:	transcriptase inverse
SCID:	severe combined immune deficient
SDF-1 α :	stromal-derived factor 1 α
SIDA :	syndrome d'immunodéficience acquise humain
SIV :	simian immunodeficient virus
SH3:	Src homology type 3
STAT3:	signal transducer and activator of transcription 3
SU:	protéine de surface des rétrovirus
TAR:	trans-activating response element
tat:	gène codant pour la protéine transactivatrice
Tat :	protéine transactivatrice
TBP:	TATA-box binding protein
TcR:	T-cell receptor
TFIID:	transcription factor IID
TM:	protéine trans-membranaire
TNF- α :	tumor necrosis factor α
VIH-1:	virus de l'immunodéficience humain de type 1
vif:	gene codant pour virion infectivity factor
Vif:	protéine virion infectivity factor
VIS:	virus de l'immunodéficience simien
vpr:	gène codant pour viral protein R
Vpr:	protéine viral protein R
vpu:	gène codant pour viral protein U
Vpu :	protéine viral protein U
vpx:	gène codant pour viral protein X
Vpx :	protéine viral protein X

A Karina,
Léane et Marika,

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier dans un premier temps le Dr Paul Jolicoeur pour m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche et pour m'avoir soutenu financièrement tout au long de mon doctorat. J'aimerais également remercier le Dr Zaher Hanna qui a agit en temps que co-directeur. Ces deux personnes m'ont grandement aidé dans mon cheminement scientifique dans le but d'accomplir mon doctorat. Je remercie Dragan Jovanovic, Denis Kay, Éléna Priceputu et Chunyan Hu pour avoir contribué aux travaux de recherche présentés dans les deuxièmes et troisièmes chapitres de cette thèse ainsi qu'à Johanne Poudrier et Marc Cool pour leurs précieux conseils

Dans un autre ordre d'idée, j'aimerais remercier les étudiants du laboratoire François, Xiujie, Soheila et Munir qui ont agit en temps que personnes ressources mais également en temps qu'amis sans qui le temps aurait paru très long. Également j'aimerais remercier les étudiants qui ont quitté le laboratoire, Marie-Chantal et Mathieu, qui ont été également de très bons amis.

Je m'en voudrais de ne pas souligner le travail essentiel, mais souvent dans l'ombre, de personnes ayant contribué aux travaux de recherche. Premièrement, les assistants techniques de laboratoire Benoît, Patrick, Lin et Ginette. Également, j'aimerais souligner le travail important des techniciens en santé animale Karina, Jean-René, Evelynne, Marie-Eve, Caroline, Stéphanie, Isabelle et Paule qui ont maintenu les colonies de souris et procuré les animaux de laboratoire de façon rapide et efficace. Finalement, j'aimerais remercier les secrétaires Rita, Chantal et Monique qui m'ont permis de surpasser quelques petits problèmes reliés à l'utilisation des logiciels.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1 Rétrovirus

1.1 Classification et caractéristiques

Les rétrovirus sont regroupés à l'intérieur d'une taxonomie basée sur différents facteurs. Parmi ceux-ci on retrouve entre autre la structure, la composition et les propriétés de répliation des virus. Les virions possèdent un diamètre d'environ 80 à 100 nanomètres (nm) et leur enveloppe externe contient les glycoprotéines de surface. L'ARN viral est d'une taille de 7 à 12 kb linéaire, simple brin, non segmenté et de polarité positive. La particularité de la famille des rétrovirus est sa stratégie de répliation qui inclue comme étape essentielle une transcription inverse de l'ARN viral en une molécule d'ADN double brin suivi d'une intégration de cette molécule dans le génome de la cellule hôte (Coffin *et al*, 1998).

Aujourd'hui, les rétrovirus sont divisés en sept genres. Ces derniers sont 1) les gammarétrovirus dont fait parti le Mouse mammary tumor virus (MMTV) 2) les epsilon-rétrovirus 3) les alfa-rétrovirus 4) les beta-rétrovirus 5) les delta-rétrovirus incluant le human T-lymphotropic virus (HTLV) 6) les lentivirus possédant cinq sous-genres; le groupe des lentivirus bovins, équins, ovins/caprins, félins et primates qui inclue le VIH-1 et VIH-2 ainsi que le virus de l'immunodéficience simien (SIV) et 7) les spumarétrovirus (ICTV, 2005). Jusqu'à la fin des années 1980, les rétrovirus étaient divisés en deux catégories: simple et complexe distinguables par leur organisation génomique. Tous les rétrovirus possèdent trois gènes codants majeurs contenant l'information nécessaire pour la production de protéines virales. Ces gènes sont : *gag*, *pol* et *env*. Un autre gène, plus petit, est également présent chez tous les rétrovirus. Il s'agit de *pro* qui code pour la protéase virale. Les rétrovirus simples ne possèdent habituellement que ces quatre gènes de base. Par contre, les rétrovirus complexes contiennent des éléments d'information additionnels codant pour des protéines de régulation non structurales. Ces gènes additionnels se retrouvent en nombre différent selon la complexité de la famille virale. Autrefois, les rétrovirus étaient sous divisés en sept groupes selon leurs degrés de similitude au niveau

phylogénique. Ces sous-groupes sont 1) le groupe des sarcomes aviaires et leucoses virales 2) le groupe viral de type B chez les mammifères 3) le groupe de leucémie virale murine 4) le groupe de leucémie des cellules T chez l'humain et leucémie bovine 5) le groupe viral de type D 6) les lentivirus et 7) les spumavirus. Cinq de ces groupes représentent des rétrovirus avec un potentiel oncogénique autrefois nommés oncovirus. Les virus oncogènes se retrouvent chez toutes les classes de vertébrés et agissent comme agent carcinogène naturel chez leur hôte. Les lentivirus se retrouvent également chez de nombreuses espèces. Ils induisent une maladie principalement en induisant une perte de fonction cellulaire ou tissulaire spécifique (Coffin *et al*, 1998).

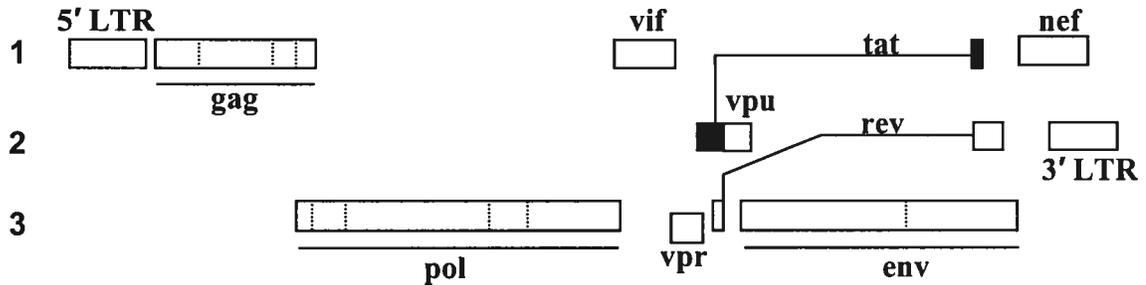
Les lentivirus sont généralement associés avec des maladies chroniques du système immunitaire et du système nerveux central. Ils contiennent des gènes additionnels qui sont essentiels pour une réplication virale efficace et persistante. Le prototype des lentivirus, le VIH-1, contient six gènes additionnels étant *tat*, *rev*, *vif*, *vpu*, *vpr* et *nef*. Le VIH-2 et VIS ne possèdent pas le gène *vpu* mais détiennent un gène nommé *vpx*. Les lentivirus non-primates possèdent moins de ces gènes complémentaires mais ils détiennent tous les gènes *tat* et *rev*, nécessaires pour l'activation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de l'expression des gènes viraux (Tang *et al*, 1999).

1.2 VIH

1.2.1 Génome

Le génome du VIH (représenté à la figure 1-1) et de tous les lentivirus est constitué d'un ARN flanqué par deux courtes séquences redondantes (R) à chaque extrémité. Elles sont adjacentes à des séquences uniques U5 et U3, retrouvées respectivement aux extrémités 5' et 3' du génome. La particularité d'un rétrovirus est de convertir son génome d'ARN en un ADN intermédiaire à partir de l'enzyme virale transcriptase inverse. Une importante modification résultant de la transcription inverse et l'intégration dans le génome est la duplication des séquences U5 et U3 de telle sorte que le provirus (génome viral intégré dans le génome de la cellule hôte) contiendra la séquence U3-R-U5 à ces deux extrémités. Cette séquence est désignée LTR; acronyme de l'expression "Long Terminal Repeat" La duplication des LTR devient essentielle car plusieurs éléments de régulation

ADN proviral du VIH-1



Épissage alternatif des ARNm du VIH-1

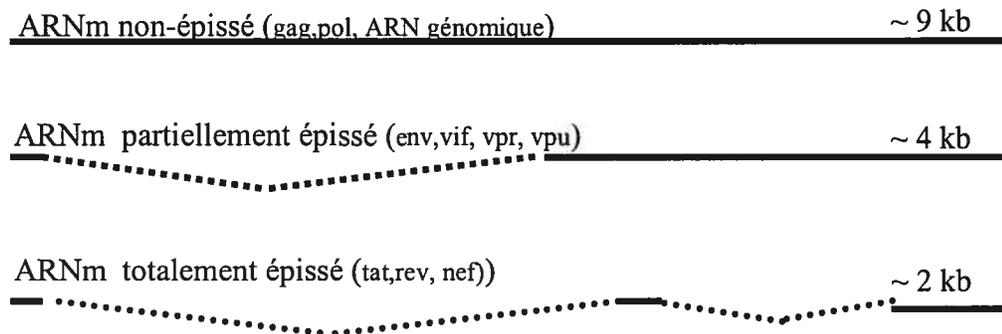


Figure 1-1: Représentation schématique de la forme provirale du VIH-1 et les différents épissages alternatifs des ARNm . Les gènes structuraux (gag, pol et env), de régulation (tat et rev) et auxiliaires (vif, vpu, vpr et nef) ainsi que leurs épissages sont représentés sur les trois cadres de lecture ouvert.

transcriptionnels sont contenus dans la partie U3 localisée en en amont du site d'initiation de la transcription débutant à la séquence redondante (R) de l'extrémité 5' du génome (Hang *et al*, 1999). Un provirus intégré, en général, ressemble à tout autre gène cellulaire possédant plusieurs exons et il utilise la machinerie cellulaire de l'hôte pour sa transcription, l'expression et la production de protéines virales. La transcription s'initie à la jonction U3/R du LTR de l'extrémité 5' du génome et se poursuit jusqu'au signal de polyadénylation situé dans la région R du LTR de l'extrémité 3' du génome. Les gènes viraux *gag*, *pro*, *pol* et *env* occupent la majeure partie de l'ADN proviral. *Gag* code pour des protéines de structure interne du virus. La protéine Gag est clivée protéolytiquement en protéines matures ; matrice (MA), capsid (CA) et nucléocapsid. (NC). *Pol* code pour les enzymes transcriptase inverse (RT) qui possèdent une activité de polymérisation de l'ADN et une activité RNase H associée et code pour l'intégrase (IN) qui permet l'intégration du génome. Le gène *pro* permet la production de la protéase virale (PR) qui agit tardivement dans l'assemblage de la particule virale en clivant protéolytiquement les protéines codées par *gag*, *pro* et *pol*. Le gène *env* code pour la glycoprotéine de surface (SU) et la protéine transmembranaire (TM) du virion qui forment un complexe interagissant spécifiquement avec le récepteur cellulaire (Coffin *et al*, 1998). Le génome du VIH contient également des gènes dits régulateurs et d'autres dits auxiliaires. Les gènes régulateurs *tat* et *rev* codent respectivement pour une protéine transactivatrice (Tat) et pour Rev, une protéine de régulation de l'épissage des ARNm. Les gènes auxiliaires présents sur le génome du VIH-1 sont Vpr, Vpu, Vif et Nef. En l'absence des gènes régulateurs et auxiliaires, la réplication virale est toujours possible mais elle est de beaucoup moins efficace (Coffin *et al*, 1997).

1.2.1.1 Gènes structuraux

La protéine Gag est le précurseur des protéines structurales internes du VIH-1 et de tous les rétrovirus. L'expression de la polyprotéine Gag seule peut mener à l'assemblage de virions immatures qui bourgeonnent de la membrane cytoplasmique. Ces particules ne possèdent pas les projections de surface qui sont les protéines de l'enveloppe (Env) mais sont similaires aux particules virales contenant tout le génome. Lors de l'assemblage viral, les protéines Gag doivent interagir les unes avec les autres, avec les composantes de la membrane cytoplasmique, avec l'ARN génomique et probablement avec les protéines de

l'enveloppe et celles de la cellule hôte. La polyprotéine Gag du VIH-1 est clivée en quatre peptides correspondant aux protéines de la matrice (MA), la capside (CA), la nucléocapside (NC) et à la protéine P6. Le domaine N-terminal de Gag mène à la formation de MA. Cette dernière est importante pour le ciblage des précurseurs Gag et Gag-Pol à la membrane cytoplasmique. Chez la particule virale mature, la protéine MA se situe à la surface interne de la membrane virale. Deux des caractéristiques de MA sont impliquées dans le ciblage membranaire. Premièrement, la protéine de la matrice est modifiée à son extrémité N-terminale par un groupement myristyl. Cette modification biochimique permet à la protéine d'être dirigée vers la membrane cytoplasmique. En plus de cibler Gag et Gag-Pro vers la membrane, MA peut également interagir avec la protéine Env durant le bourgeonnement cellulaire. Cette interaction permet l'incorporation de la glycoprotéine Env contenant une longue queue cytoplasmique dans la particule virale (Freed *et al*, 1995, Mammano *et al*, 1995). En plus d'être impliquée dans l'assemblage viral, la protéine MA facilite l'infection des cellules qui ne se divisent pas. Il a été démontré que MA accompagne l'ADN viral néo-synthétisé dans le noyau de la cellule hôte dans un complexe comprenant Vpr, RT et IN (Bukrinsky *et al*, 1993a). Un signal de localisation nucléaire à l'extrémité N-terminale de MA permettrait d'infecter des cellules ne se divisant pas comme les macrophages (Bukrinsky *et al*, 1993b). De plus, des modifications post-transcriptionnelles comme la phosphorylation de résidus tyrosine semblent être importantes pour l'interaction de MA avec l'intégrase afin de se diriger vers le noyau (Coffin *et al*, 1998).

La protéine de la capside (CA) est la seconde composante de la polyprotéine Gag et elle forme le corps de la particule virale avec environ deux mille molécules par virion. Le domaine C-terminal est impliqué dans l'assemblage et est important pour la dimérisation de CA (Gamble *et al*, 1997). Le domaine N-terminal est également important lors de la décapsidation en interagissant avec une chaperone cellulaire, la cyclophiline A (CypA) (Luban, 1996). La fonction structurale exacte de CA dans la particule virale n'est pas bien déterminée. Cependant, la protéine semble former une coquille entourant le complexe ribonucléoprotéique contenant l'ARN génomique. Cette coquille est habituellement appelée capsid. L'ensemble de la capsid et des composantes qu'elle entoure est nommé le "core" du virus. (Coffin *et al*, 1998).

La nucléocapside (NC) est la troisième composante de la polyprotéine Gag et entoure l'ARN génomique à l'intérieur du corps du virus. La fonction primaire de NC est de se lier spécifiquement au signal d'encapsidation ψ localisé en 5' de l'ARN génomique et d'amener l'ARN viral non épissé au virion lors de l'assemblage. La NC est une protéine basique qui est également capable de se lier aux acides nucléiques simple brin de façon non spécifique. Cette interaction avec le génome viral permettrait de le protéger contre les nucléases cellulaires et de le compacter à l'intérieur du corps viral. Cette liaison non spécifique procure également une fonction de chaperone qui accélère également d'autres étapes du cycle viral impliquant des acides nucléiques. Par exemple, elle permet l'appariement des amorces ARNt, la dissociation de la structure secondaire de l'ARN, la réaction d'échange des brins d'ADN lors de la transcription inverse (Guo *et al.*, 1997, Cameron *et al.* 1997) et elle active l'intégration génomique (Carteau *et al.*, 1997). La NC possède 55 résidus d'acides aminés et deux domaines de doigt de zinc flanqués de deux acides aminés basiques. L'interaction spécifique entre NC et ψ nécessite les deux domaines de doigt de zinc ainsi que les deux acides aminés basiques. Les régions impliquées dans la liaison non spécifique ne sont pas déterminées (Frankel et Young, 1998). La dernière protéine constituant la polyprotéine Gag est la protéine p6. Situé en C-terminal de Gag, p6, d'une longueur de 60 acides aminés, est importante pour l'incorporation de Vpr lors de l'assemblage viral. La protéine p6 joue également un rôle lors du bourgeonnement viral. (Huang *et al.*, 1995).

Le gène *pol* code pour trois protéines qui sont la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase. La protéase est localisée dans le corps de la particule virale mature. Suite à l'assemblage des polyprotéines, le virus relâché par les cellules n'est pas infectieux. Des modifications conformationnelles des protéines virales doivent survenir afin de conférer l'infectivité au virion. Lors du processus de maturation, les polyprotéines Gag et Gag-Pol sont clivées par la protéase pour produire les protéines matures. La protéase, faisant partie de la polyprotéine Gag-Pol doit s'autocliver pour être fonctionnelle. La transcriptase inverse copie le génome viral en ADN. Elle possède des fonctions de polymérisation de l'ADN dépendante de l'ARN et la polymérisation de l'ADN dépendante de l'ADN. De plus, elle contient une activité RNase H qui clive l'ARN de l'hybride ARN/ADN. Elle

nécessite une amorce d'ARNt lysine qui est encapsidé dans le virion. L'intégrase permet de cliver le génome de l'hôte afin d'intégrer le génome viral dans celui de la cellule hôte.

Le gène *env*, codant pour les protéines de surface, est traduit en polyprotéine (gp160) qui sera clivée par une protéase cellulaire au niveau de l'appareil de Golgi. La gp160 est clivée en deux protéines, gp120 la glycoprotéine de surface et gp41 le domaine trans-membranaire, reliées entre eux par des liens non covalents (Frankel et Young, 1998, Maerz *et al*, 2001).

1.2.1.2 Gènes régulateurs

La protéine Tat permet la transactivation et l'augmentation de la transcription génique d'environ 100 fois à partir des LTR viraux et conséquemment est essentielle pour la réplication virale. Le promoteur du VIH-1 est localisé dans le LTR situé en 5' du génome et contient plusieurs éléments de régulation importants lors de la transcription par l'ARN polymérase II. Des sites pour différents facteurs de transcription cellulaire sont localisés en amont du site d'initiation de la transcription incluant des sites pour les facteurs NF- κ B, Sp1 et TATA box binding protein (TBP) (Jones et Peterlin, 1994). Ces facteurs cellulaires facilitent l'initiation de la transcription du provirus intégré. L'abondance de ces facteurs peut différer selon le type cellulaire infecté. Cette variation du nombre de facteur cellulaire détermine certainement si le provirus reste quiescent ou en réplication active dans la cellule infectée. Malgré l'importance de ces facteurs, les complexes de transcription initiés aux promoteurs du VIH-1 sont inefficaces lors de l'élongation et requièrent la protéine virale Tat pour augmenter l'efficacité de la transcription de la polymérase. En absence de Tat, la polymérase ne peut efficacement transcrire que quelques nucléotides. En s'associant avec le facteur d'élongation positif du complexe de transcription b (P-TEF-b), lui-même constitué des protéines cellulaires hétérodimères cyclin T1 et cyclin-dependant kinase family (CDK9), Tat permet la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II et la transcription complète du génome viral (Wei *et al*. 1998). Contrairement aux activateurs transcriptionnels typiques, Tat ne se lie pas à de l'ADN mais bien à une structure en épingle à cheveux nommée TAR (trans-activating response element) situé sur l'ARN à l'extrémité 5' du transcrit viral. Une région de Tat riche en arginine permet la liaison avec une région de trois nucléotides situés sur TAR. Le complexe est par la suite stabilisé par des contacts additionnels sur les résidus de

phosphate lorsque Tat est associé à Cyclin T1 et CDK9 ce qui entraîne la formation de complexes stables entre Tat et TAR (Wei *et al.* 1998).

1.2.1.3 Gènes auxiliaires

La Viral protein U (Vpu) est une phosphoprotéine membranaire unique au VIH-1. Cette protéine joue deux rôles majeurs lors de la réplication du VIH. Premièrement, elle augmente le bourgeonnement des particules virales et deuxièmement, elle favorise la dégradation de la molécule CD4. Le VIH a développé différents mécanismes pour réguler négativement de la surface cellulaire le récepteur CD4. Parmi ceux-ci, la protéine Vpu permet la dégradation du CD4 via la voie de signalisation ubiquitine/protéasome. La protéine Vpu possède la capacité de se lier avec la protéine β -TRCP via un signal de dégradation spécifique contenu dans la queue cytoplasmique de Vpu. β -TRCP est elle-même reconnue par le complexe protéique ubiquitine ligase ce qui mènera à la dégradation du CD4 (Margottin *et al.*, 1998). L'une des conséquences de cette dégradation est la libération de la gp160 du complexe Env/CD4 dans le réticulum endoplasmique faisant du même coup augmenter le nombre de glycoprotéine Env disponible pour le transport à la surface cellulaire (Meusser et Sommer, 2004)

La Viral protein R (Vpr) est une protéine qui est incorporée dans la particule virale, suite à son interaction avec la protéine p6 du VIH-1. Vpr est une protéine permettant le transport du complexe nucléoprotéique vers le noyau de la cellule hôte. Possédant un signal de localisation nucléaire, elle permet le transport de l'information génétique virale vers le noyau même en absence de bris de la membrane nucléaire. Vpr devient donc important surtout chez les cellules qui ne se divisent pas (Frankel et Young, 1998). En plus de stimuler faiblement l'expression des gènes à partir des LTR, elle induit l'arrêt des cellules en phase G2 du cycle cellulaire et facilite le transport du complexe de pré intégration au noyau des cellules infectées. Cet arrêt en G2 semble provenir de l'inhibition du complexe CDK1. Il a été proposé que l'expression des gènes à partir des LTR soit augmentée lors de la phase G2 procurant ainsi une explication pour cet arrêt en phase G2 par les cellules infectées (Re *et al.*, 1995).

La protéine Vif (Viral infectivity factor) est hautement conservée parmi les lentivirus. Sa mutation peut causer une diminution de l'infectivité virale. Le fonctionnement de Vif est dépendant du type cellulaire qui l'exprime suggérant le rôle d'un facteur cellulaire de l'hôte pour son bon fonctionnement. Des études récentes ont démontré que Vif permet de surpasser les effets antiviraux de la protéine APOBEC3G. Cette protéine qui est incorporée dans les virions du VIH-1 est membre d'une famille de déaminase de résidu de cytidine et provoque la déamination des résidus de cytosine en uracile (C à U) lors du processus de la transcription inverse du génome viral. Par la suite, le génome d'ADN viral contenant des résidus uracile est dégradé par les enzymes cellulaires avant l'intégration génomique. Vif interagit avec APOBEC3G et induit sa dégradation par la voie du protéasome et bloque sa traduction prévenant ainsi son incorporation dans la particule virale et son activité anti virale lors des infections subséquentes (Stopak *et al*, 2003)

La dernière protéine accessoire du VIH-1 est Nef (Negative Factor). Son nom vient de sa description originale de suppression de l'expression des gènes à partir des LTR. Il est maintenant clair que Nef joue un rôle positif important dans la pathogénèse induite par les rétrovirus. Nef est une protéine myristyllée d'environ 27 kDa associée à la membrane plasmique. Tout comme les autres protéines accessoires du VIH-1, Nef possède diverses fonctions dont la régulation négative de la surface cellulaire des molécules CD4 et du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI), de l'augmentation de l'infectivité virale et l'altération des voies de signalisation intracellulaire. La structure, le rôle et la fonction biologique de cette protéine seront élaborés plus en détail lors de chapitres ultérieurs.

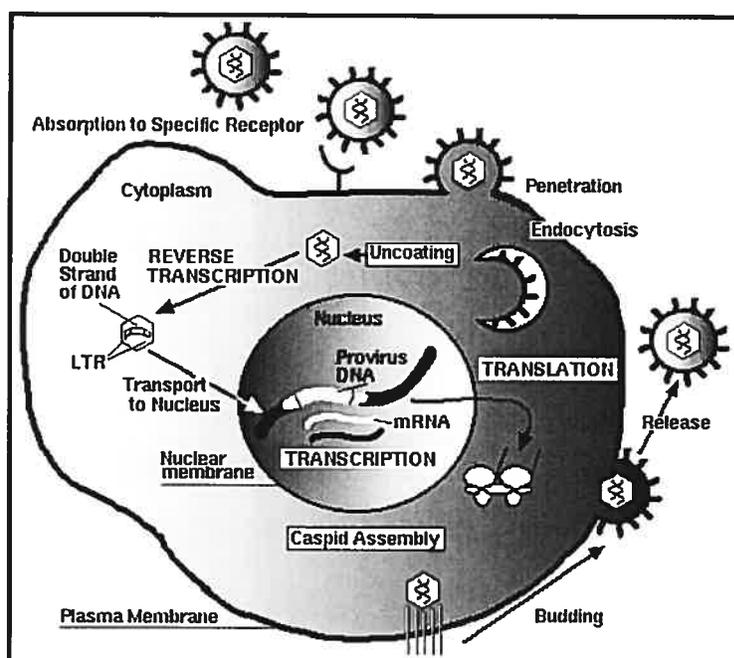
1.2.2 Cycle de réplication

De façon générale, le cycle de réplication des lentivirus, incluant celui du VIH-1, ressemble à celui des rétrovirus. Il existe cependant des aspects uniques au VIH dont l'utilisation d'un récepteur et d'un corécepteur différents de celui utilisé par les autres rétrovirus. De plus, les lentivirus possèdent dans leur génome des gènes codant pour

protéines régulatrices et accessoires que ne possèdent pas les rétrovirus simples. Le cycle de réplication du VIH-1 est représenté à la figure 1-2.

1.2.2.1 Entrée

Il fut observé que le VIH cible et élimine spécifiquement la sous population de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang périphérique des individus infectés tôt durant la progression du SIDA. La molécule CD4 est le premier récepteur de surface découvert pour le VIH et le VIS au milieu des années 80, (Dalglish *et al*, 1984). La liaison entre la molécule CD4 et gp120 du VIH n'est toutefois pas suffisante pour permettre la fusion membranaire et l'entrée virale. Des isolats viraux provenant d'individus infectés démontraient un tropisme variable pour les cellules CD4⁺. Certains isolats ayant un tropisme pour les macrophages (M-tropic) peuvent se répliquer efficacement dans des cultures primaires de macrophages tandis que d'autres isolats ayant un tropisme pour les lymphocytes T (T-tropic) ne peuvent infecter les macrophages mais se répliquent à de hauts niveaux dans les lignées cellulaires de lymphocytes T. Suite à plusieurs années de recherche, une protéine membre de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (G protein-coupled receptor) possédant sept domaines transmembranaires fut identifiée comme corécepteur pour l'entrée du VIH-1 (Berger *et al*, 1999). Cette molécule sert de récepteur pour les α et β -chémokines. Le récepteur des α -chemokines, CXCR4 (originellement appelé fusin), et celui des β -chemokines, CCR5, semblent prédominants pour l'entrée virale. L'identification des corécepteurs a permis d'expliquer la différence de tropisme observée : les lignées cellulaires de lymphocytes T expriment CXCR4 mais pas CCR5, les lymphocytes T primaires expriment les deux corécepteurs tandis que les macrophages expriment seulement CCR5. La liaison entre le CD4 et la gp120 induit un changement de conformation de cette dernière ce qui augmente son affinité pour le corécepteur. La première étape de l'entrée virale est donc la liaison entre la gp120 et la molécule CD4. Par la suite un complexe composé de la gp120, du CD4



Tiré du site: http://www.mef.hr/Patologija/ch_9a/c9a_hiv_replication.html

Figure 1-2: Cycle de réplication du VIH-1. Le VIH-1, suite à son adhésion avec le récepteur CD4 et co-récepteur CXCR4 ou CCR5, entre dans le cytoplasme cellulaire par fusion membranaire. Le virion est décapsidé, le génome transcrit en ADN double brin par l'enzyme virale transcriptase inverse et incorporé dans le génome de la cellule hôte. Le provirus agit comme un gène cellulaire et est transcrit et traduit par la machinerie cellulaire de l'hôte. Les protéines virales produites mûrissent et migrent vers la paroi interne de la membrane cytoplasmique où se produit l'assemblage du virion. Le virion sort de la cellule infectée par bourgeonnement et subit une maturation où les polyprotéines sont clivées par la protéase virale

et du corécepteur se forme. Finalement, un changement de conformation dans la gp41 permet la fusion membranaire. Elle survient entre la bicouche lipidique de l'enveloppe virale et celle de la membrane plasmique de la cellule hôte ce qui permet à la capsid virale d'accéder au cytoplasme (Berger *et al*, 1999).

1.2.2.2 Transcription inverse

Une des caractéristiques des rétrovirus est la capacité à convertir leur génome d'ARN en double brin d'ADN. Cette réaction est catalysée par l'enzyme virale RT. La transcription inverse se déroule par une série d'étapes et utilise divers éléments de régulation contenus dans le génome viral. Dans un premier temps, la transcription inverse est initiée en utilisant comme amorce une molécule de tRNA liée au site de liaison de l'amorce sur le génome viral. La synthèse du brin négatif (-) de l'ADN se déroule jusqu'à l'extrémité 5' du génome viral générant une molécule hybride ARN/ADN. La portion d'ARN de cet hybride est par la suite dégradée par l'activité Rnase H de la RT générant un petit fragment d'ADN homologue à la région 3' du génome d'ARN viral. Grâce à cette homologie, il y a appariement des régions communément appelé premier échange de gabarit. La région appariée peut alors servir d'amorce à la RT et ainsi poursuivre l'élongation du fragment (-) d'ADN. Lorsque l'élongation du brin (-) se poursuit au-delà de la région riche en purine (PPT : polypurine tract) située en région 3' du génome viral, la séquence complémentaire d'ARN échappe à la digestion par la Rnase H et sert d'amorce pour la synthèse du brin (+) d'ADN jusqu'à l'extrémité 5' du génome où est situé l'amorce tRNA en utilisant le brin (-) d'ADN comme gabarit. L'amorce est ensuite éliminée par l'activité RNase H générant une homologie avec la région 3' du brin (-) d'ADN et permettant le deuxième échange de gabarit. La synthèse d'ADN peut alors se poursuivre pour aboutir à un ADN double brin. Bien que le processus de transcription inverse s'effectue par échange de gabarit, il arrive fréquemment que la synthèse de nouveaux ADN recombinants dérivés de l'ARN parental se produise. Cette haute fréquence de recombinaison ainsi que le taux de mutation élevé de la RT (3×10^5 mutations par cycle de réplication) résultent en une population virale très hétérogène dans leur homologie de séquence formant ainsi des quasi-espèces (Flint *et al*, 2000).

1.2.2.3 Intégration génomique

Suite à la transcription inverse, l'ADN viral est éventuellement transporté dans le noyau dans un complexe de pré-intégration contenant l'intégrase et la reverse transcriptase, la protéine accessoire Vpr, la nucléocapside et la protéine de la matrice. Suite à l'importation du génome dans le noyau, l'intégrase catalyse l'insertion de l'ADN double brin viral linéaire dans les chromosomes de la cellule hôte. L'ADN intégré est alors nommé provirus et se comporte essentiellement comme un gène cellulaire. Tout comme la transcription inverse, l'intégration se déroule par une série d'étapes retrouvées chez tous les rétrovirus. Ce processus débute lorsque l'intégrase digère le génome viral en clivant la région 3' des deux brins d'ADN linéaire ce qui procure une molécule d'ADN double brin contenant des régions 3' cohésives. Elle fait de même avec le génome cellulaire. Les régions cohésives des deux génomes sont par la suite assemblées et le processus d'intégration est complété lorsque les enzymes cellulaires réparent les jonctions laissées entre les deux génomes (Bukrinsky *et al*, 1993a; Freed, 2001).

1.2.2.4 Transcription génique et exportation nucléaire

Suite à l'intégration, le provirus sert de matrice pour la synthèse des ARN viraux qui coderont pour toutes les protéines structurales, régulatrices et accessoires utilisées pour la réplication virale. Les LTR du VIH-1 servent de site d'initiation de la transcription et possèdent des éléments requis pour la synthèse d'ARN. La transcription s'initie à la jonction U3/R située en 5' du génome. La région U3 contient divers éléments qui se lient directement à la polymérase de l'ARN de type II. Une région TATA sur laquelle le facteur de transcription IID (TFIID) se lie est localisée environ à 25 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription. En amont de la région TATA, trois sites de liaison SP1 et deux sites de liaison NF- κ B s'y retrouvent. Le site de liaison utilisé variera selon le type cellulaire infecté par le VIH-1. Le niveau de transcription à partir des LTR est très faible. La synthèse d'ARN est fortement augmentée lorsque la protéine Tat est présente (Fisher *et al*, 1986). Chez les rongeurs, la fonction de Tat est altérée suggérant qu'un facteur cellulaire joue un rôle important pour son activité. Ce facteur en question est la cycline T1 qui forme un hétérodimère avec un membre de la famille des kinase dépendante de la cycline (CDK9) qui lui-même fait partie d'un large complexe protéique contenant des

facteurs d'élongation transcriptionnel (P-TEF-b). Tat recrute le complexe P-TEF-b à TAR ce qui résulte en une phosphorylation du domaine C-terminal de la RNA pol II et une stimulation dramatique de la transcription des gènes.

La transcription à partir des LTR du VIH-1 mène à la génération d'un grand nombre d'ARN viraux. Ces transcrits peuvent être classés en trois catégories majeures : 1) les ARN non épissés qui servent d'ARNm pour les polyprotéines précurseurs Gag et Gag-Pol, encapsidées dans les nouveaux virions. Ces ARN servent également d'ARN génomique, 2) les ARN partiellement épissés d'une taille d'environ 4 kb et qui codent pour les gènes Env, Vif, Vpu et Vpr, 3) les petits ARN multi épissés d'une taille d'environ 2 kb qui codent pour les gènes rev, tat et nef. La majorité des ARN sont totalement épissés avant d'être exportés vers le cytoplasme. La nécessité d'obtenir des ARN non épissés et partiellement épissés dans le cytoplasme pose alors un problème. Cependant, la protéine Rev permet à ces ARN d'être exportés hors du noyau. La protéine Rev possède la capacité de se lier à une région précise de l'ARN viral appelée RRE (Rev response element) ce qui permet à l'ARN d'être transporté, dans une forme non épissée ou partiellement épissée, vers le cytoplasme. Rev interagit avec la machinerie cellulaire responsable de l'exportation nucléaire et après l'exportation vers le cytoplasme, elle revient dans le noyau utilisant son signal de localisation nucléaire (Pollard et Malim 1998).

1.2.2.5 Assemblage viral

L'assemblage des lentivirus, incluant le VIH-1, s'effectue à la membrane plasmique des cellules infectées. Le groupement myristyl du domaine MA de la polyprotéine Gag est principalement responsable du ciblage et de l'attachement à la membrane plasmique. Également, l'interaction entre des résidus d'acides aminés fortement basiques chargés positivement de MA et les acides phospholipidiques de la membrane interne de la double paroi lipidique chargée négativement permettent la stabilisation de l'attachement de la MA à la membrane plasmique. La protéine Gag du VIH-1 est retrouvée associée à la membrane seulement quelques minutes suivant sa synthèse. Chaque particule virale renferme deux copies d'ARN génomique simple brin. Des séquences d'encapsidation en forme d'épingle à cheveux retrouvées dans la région 5' du génome permettent son encapsidation. La

structure secondaire semble plus importante que la séquence nucléotidique pour l'encapsidation. Les ARN viraux sont liés ensemble par une séquence située près de l'extrémité 5' du génome. L'encapsidation spécifique des ARN rétroviraux dans les particules virales est favorisée par l'interaction entre le signal d'encapsidation et le domaine (NC) de la polyprotéine Gag. Elle contient deux motifs de doigt de zinc flanqués de séquences basiques permettant la spécificité de l'interaction NC/ARN (Freed, 2001).

Une fois ciblée à la membrane cytoplasmique, la protéine Gag doit s'homodimériser afin que l'assemblage viral s'effectue. La glycoprotéine Env est synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux et génère une protéine précurseur: gp160. Le domaine gp120 est fortement glycosylé par des chaînes de mannose. La gp 160 est par la suite transportée à la surface cellulaire par les voies sécrétoires. Lors de son transport, elle est clivée par une protéase de l'hôte, la furin, ce qui génère une glycoprotéine mature SU (gp120) et la glycoprotéine TM (gp41). Suite au clivage, la gp41 ancre le complexe Env dans la membrane et s'associe de façon non covalente avec la gp120. Les complexes Env qui atteignent la surface cellulaire sont rapidement incorporés dans les particules virales. Le processus d'incorporation reste incompris mais il semble qu'une interaction entre la queue cytoplasmique de la gp41 et le domaine Ma de Gag recrute Env dans les virions (Freed, 1998).

1.2.2.6 Bourgeonnement et maturation

La dernière étape dans le processus de l'assemblage viral implique le bourgeonnement de la particule virale. Les rétrovirus contiennent dans leur génome des séquences spécifiques nommées domaines tardifs permettant leur bourgeonnement. Situées dans la protéine Gag, ces domaines sont présents dans la protéine p6 du VIH-1. La mutation d'un domaine conservé situé à l'extrémité N-terminal de p6 diminue le relâchement des particules virales (Gottlinger *et al*, 1991). Ce domaine de polyproline PTAP permet de recruter la protéine cellulaire TSG101, une molécule impliquée dans la formation de vésicules de transport. La protéine TSG101 fait partie d'une grande famille de protéines impliquées dans le transport vésiculaire nommée ESCRT, l'acronyme de Endosomal Sorting Complexes Required for Transport. Lorsque ces protéines sont ciblées aux vésicules de transport, elles sont par la suite relâchées après l'hydrolyse de l'ATP par

l'ATPase Vsp4p (Katzmann *et al*, 2002). Le VIH-1 utilise les protéines impliquées dans la formation et le transport de vésicules de sécrétion ESCRT-1/TSG101 et ESCRT-III/CHMP4 pour bourgeonner hors de la cellule (von Schwedler *et al*, 2003). Lors du relâchement des particules virales hors de la cellule, la protéase virale (PR) clive les polyprotéines précurseurs Gag et GagPol pour procurer les protéines matures Gag et Pol. Ces clivages sont effectués dans une cascade bien ordonnée. Ces clivages changent la morphologie des virions. Suite au clivage, la CA forme une coquille autour du complexe ARN/protéine dans le corps viral.

1.3 Syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA)

Suite à son entrée dans l'organisme, le VIH-1 causera à long terme une maladie dégénérative du système immunitaire caractérisée par la destruction des cellules T CD4⁺. Cette maladie comprend trois phases bien déterminées cliniquement: l'infection primaire, la phase de latence et l'infection tardive.

1.3.1 Infection primaire

L'infection par le VIH-1 s'effectue principalement via les voies mucoales, gastrointestinales ou reproductrices ce qui résulte en une réplication locale initiale dans les cellules cibles des tissus muqueux. Des études ont démontré chez l'humain que lors de l'infection, les premières cellules infectées sont les lymphocytes T CD4⁺ présentes dans la lamina propria des tissus muqueux de l'intestin plutôt que les cellules dendritiques. La réplication massive dans ces cellules mènera à leur destruction (Mehandru *et al*, 2004; Brenchley *et al*, 2004a). Les cellules dendritiques n'étant pas les premières cellules cibles pour la réplication virale peuvent cependant augmenter localement le niveau d'infection local. Elles possèdent une lectine de surface, nommée DC-SIGN, capable de lier la gp120 du VIH-1 avec une grande affinité (Geijtenbeek *et al*, 2000). Le mécanisme le plus plausible pour l'infection via les surfaces mucoales est que les virions infectieux libres se lient à DC-SIGN à la surface des cellules de Langerhans. Les virus liés entrent ensuite en contact avec les cellules T CD4⁺ qui migreront vers les ganglions lymphoïdes avoisinants. (Mascola *et al*, 2000). Parmi les lymphocytes T CD4⁺, ce sont les cellules mémoires qui sont majoritairement infectées tandis que les cellules naïves sont infectées à une fréquence

beaucoup plus faible (Brenchley et al, 2004b). Les cellules T infectées par le VIH-1 resteront séquestrées dans les ganglions lymphoïdes jusqu'à ce que la réplication virale atteigne un plateau. Cette période est d'une durée de deux à six semaines et est appelée infection primaire. Suite à cette période, le virus se dissémine pendant quelques jours dans tout le corps et se localise dans les sites réservoirs locaux et périphériques. L'infection primaire est associée à un niveau élevé de virions et d'ARN viral sanguin. Elle est également accompagnée par des symptômes comprenant des éruptions cutanées, une lymphadénopathie, une arthropathie et de la fièvre. Le fort niveau de réplication virale diminue rapidement de deux à quatre semaines suivant l'infection et est associé avec une réponse immunologique primaire dirigée contre le VIH-1. Cependant, même si aucune particule virale n'est retrouvée dans le sang suite à la réponse immune, le virus n'est jamais éliminé et son génome peut être retrouvé dans les cellules lors de tous les stades de la maladie. La forte réplication virale retrouvée lors de l'infection primaire est également associée avec une réduction transitoire des cellules T CD4+ dans le sang. Suite à la forte réponse immune, le nombre de cellules T CD4+ retourne à un niveau similaire mais plus faible que celui observé avant l'infection par le VIH-1. Ces observations suggèrent la capacité du virus à tuer directement les cellules CD4+ par la lyse cellulaire. Il est clair qu'un haut niveau de réplication virale dans les cellules mononucléaires périphériques (PBMC) *in vitro* mène à la formation de syncytiums (cellules géantes multi-nucléées) et conséquemment à la mort par lyse cellulaire (Flint *et al*, 2000).

En même temps que la forte virémie, on observe une réponse immunitaire vigoureuse spécifique au VIH-1 induite par les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques (CTL) et les lymphocytes T CD4+ auxiliaires spécifiques au VIH-1. De plus, on observe également une production d'anticorps reconnue pour jouer un rôle important dans l'élimination des virions lors de l'infection primaire. Les CTL sont cependant les cellules immunitaires les plus importantes pour éliminer le VIH suite à l'infection primaire. Selon Weber, une faible progression du VIH serait reliée à l'équilibre entre la réplication virale et la réponse immunitaire médiée par les CTL CD8⁺ (Weber, 2001). Cependant, Cheingsong-Popov et collaborateurs suggèrent que les anticorps non neutralisants produits se lient aux virions circulants dans le sang générant des complexes immuns qui seront par la suite éliminés par les cellules de la rate via le Fc récepteur (Cheingsong-Popov *et al*, 1991).

1.3.2 Phase de latence

Trois à quatre mois après l'infection, un faible niveau du nombre de virion peut être accompagné de petites réapparitions occasionnelles. Le degré de virémie à ce stage permet de prédire la vitesse de la progression de la maladie. Plus la virémie est élevée, plus rapide sera la progression. Durant cette phase, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ diminue toujours. La cause n'est toujours pas déterminée bien que la mort cellulaire directe provoquée par le virus et/ou l'apoptose due à une production de cytokines inappropriée puisse être responsable. Durant cette période, le taux de lymphocytes T CD8⁺ reste élevé mais la réplication virale progresse à un faible niveau majoritairement dans les ganglions lymphoïdes. La propagation virale est enrayée par l'action anti virale des CTL CD8⁺. Des mutations spécifiques engendrées par les pressions immunologiques provoquent probablement une augmentation de l'hétérogénéité des virions produits (Flint *et al*, 2000). Cependant, lors de cette phase, une petite fraction de lymphocytes T CD4⁺ naïfs et de macrophages continue de produire le virus à un faible niveau. Ces cellules sont nommées cellules réservoir (Schnittman *et al*, 1990; Williams *et al*, 2001)

1.3.3 Infection tardive

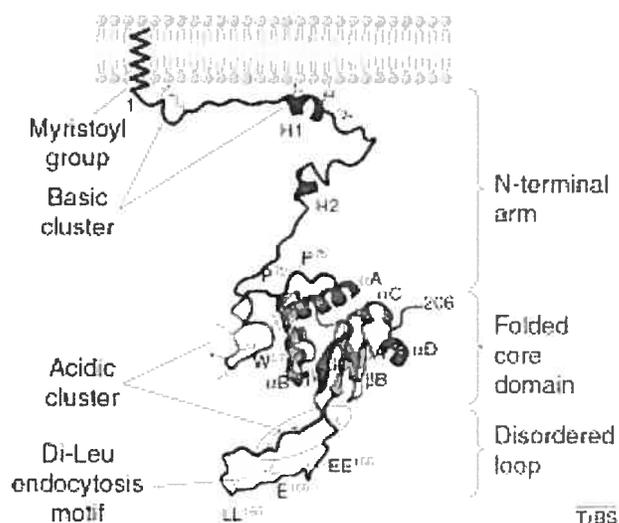
L'étape finale de la maladie, lorsque l'individu infecté développe les symptômes du SIDA, est caractérisée par un compte de lymphocytes T CD4⁺ très faible ainsi qu'une diminution du nombre de cellules T CD8⁺. Dans les ganglions lymphoïdes, la réplication virale augmente et concorde avec la destruction de l'architecture des tissus lymphoïdes. La population virale devient encore plus hétérogène tout en augmentant sa virulence ce qui provoque la capacité de former des syncytiums, une cinétique de réplication rapide et la destruction des cellules T CD4⁺. Ces nouveaux virions semblent moins sensibles aux anticorps neutralisants et le tropisme cellulaire vers d'autres organes augmente. Lorsque le taux de cellules T CD4⁺ diminue fortement, le système immunitaire s'affaiblit et devient susceptible aux maladies opportunistes reliées au SIDA. Parmi celles-ci on peut retrouver des maladies pulmonaires comme la pneumonie interstitielle lymphocytaire et éventuellement une infection à *Pneumocystis carinii*. Le système gastro-intestinal est également atteint ce qui provoque des diarrhées et une malabsorption chronique. Une neuropathogénèse se développe et entraîne une démence. Finalement les individus atteints

du SIDA peuvent développer certaines formes de cancer dont le sarcome de Kaposi et une perte de poids importante (Flint *et al*, 2000).

1.4 Structure et caractéristiques de la protéine Nef du VIH-1

Le gène *nef* du VIH-1 code pour une protéine de 27-29 kDa qui est exprimée de façon précoce à des niveaux relativement élevés tout au long de l'infection (Klotman *et al*, 1991). Cette protéine peut être divisée en trois principales composantes : un bras N-terminal, une partie centrale repliée et une queue en forme de boucle (figure 1-3). Le bras N-terminal comprend environ 70 résidus d'acides aminés. La partie centrale repliée est la seule partie de la protéine qui adopte une conformation tertiaire stable. Par résonance magnétique nucléaire (Grzesiek *et al*, 1996) et par cristallographie (Arold *et al*, 1997), des études ont caractérisé ce fragment d'environ 120 résidus d'acides aminés dans une conformation libre. Cette partie centrale est formée par un feuillet β antiparallèle de quatre brins flanqués, de deux longues hélices α antiparallèles en N-terminal et de deux courtes hélices en C-terminal. Une séquence riche en proline (P⁶⁹xxPxxPxxP⁷⁸), et un motif di-arginine (RR¹⁰⁶) sont également présents dans cette région. Dans la région terminale en forme de boucle, on retrouve quatre motifs d'interaction protéine-protéine connus : un motif d'internalisation di-leucine (E/D¹⁶⁰xxxLL¹⁶⁵), une séquence di-acidique EE¹⁵⁵, un groupement acide D¹⁷⁴xxxE¹⁷⁸ et un motif de liaison de type SH3 P¹⁴⁷xxP¹⁵⁰. Les constituants N et C-terminaux sont les régions flexibles de la protéine tandis que la partie centrale est repliée dans une conformation stable (Arold et Baur, 2001).

Après sa synthèse, la protéine Nef subit deux types de modifications post-traductionnelles. Tout d'abord, la première méthionine est remplacée par un groupement myristyl. Cette modification permet de changer la localisation de la protéine et est responsable du ciblage de Nef à la membrane cellulaire (Niederman *et al*, 1993). Cette myristylation est essentielle afin de conférer à la protéine Nef toutes ses activités biologiques *in vitro* sauf l'activation de la protéine Hck (Briggs *et al*, 2001,



Tiré de Arold et Baur, 2000

Figure 1-3: Structure de la protéine Nef du VIH-1. La protéine Nef est composée de trois principales parties: un bras N-terminal, une partie centrale repliée et une queue en forme de boucle. Différents motifs présents dans ces trois parties permettent à Nef d'interagir avec diverses protéines cellulaires. Le groupement myristil permet à la protéine d'être ciblée à la membrane plasmique. Deux motifs d'interaction de type SH3, un motif d'internalisation di-arginine et deux motifs acides sont également retrouvés.

Chowers *et al*, 1994). Nef peut être phosphorylée sur des résidus de sérine. Le niveau de phosphorylation peut augmenter de façon importante suite à l'activation de la protéine kinase C par différents stimuli comme le PMA. Cette phosphorylation est importante pour la régulation négative de la molécule CD4 (Luo *et al*, 1997). Malgré sa petite taille, Nef est une protéine qui, afin d'effectuer ses activités biologiques, agit de façon complexe. La capacité de Nef d'augmenter l'infectivité des virions et d'induire la pathogénicité peut être possible grâce à ces diverses fonctions biologiques. Parmi celles-ci on retrouve la régulation négative des molécules de surface CD4 et CMHI, l'augmentation de l'infectivité des virions et l'altération de la transduction des voies de signalisation via l'interaction de Nef avec PAK2 ainsi que d'autres protéines de signalisation intracellulaire (Renkema et Saksela, 1995; Arold et Baur, 2001). Les mécanismes moléculaires de la majorité de ces fonctions biologiques et leur contribution à la pathogénèse ne sont pas complètement élucidés. La protéine Nef ne possède aucune activité enzymatique et doit donc accomplir toutes ses fonctions en interagissant avec différentes composantes cellulaires. Plus de 30 partenaires cellulaires d'interaction avec Nef ont été répertoriés *in vitro*. La majorité de ces facteurs peuvent être divisés en deux catégories soit les protéines impliquées dans le ciblage de compartiments cellulaires ou les protéines agissant comme molécules de signalisation cellulaire et plus particulièrement la voie de signalisation du récepteur des cellules T (TcR) (Renkema et Saksela, 1995; Arold et Baur, 2001). Un tableau résumé des fonctions biologiques de Nef et ses partenaires cellulaires est présenté suite à la fin de la section 1.4.4.6.

1.4.1 Régulation négative de la molécule CD4

La régulation négative du CD4 est la fonction biologique de Nef la plus documentée *in vitro* (Garcia et Miller, 1991; Guy *et al*, 1987) et elle s'exerce aussi sur les cellules primaires des souris (Anderson et al, 1993). Elle implique l'internalisation de la molécule de surface CD4 suivie de sa dégradation via la voie de signalisation endosomale/lysosomale. Le processus de dégradation peut être bloqué par des inhibiteurs moléculaires et pharmacologiques de l'endocytose médiée par les molécules de clathrines (Le Gall *et al*, 2000; Luo *et al*, 2001). Certaines données suggèrent que Nef agisse comme une molécule adaptatrice en recrutant les éléments de la machinerie endocytique cellulaire

à la queue cytoplasmique de la molécule CD4 (Mangasarian *et al*, 1997; Greenberg *et al*, 1998a; Lu *et al*, 1998). Parmi les protéines de cette voie d'endocytose, Nef interagit avec des complexes adaptateurs (Bresnahan, *et al*, 1999; Craig *et al*, 1998, Greenberg *et al*, 1998, Greenberg *et al*, 1997), une sous unité du complexe vacuolaire membranaire ATPases impliquée dans la formation de vésicules de clathrine (Geyer *et al*, 2002; Lu *et al*, 1998) et β -Cop, une protéine coatomère (Benichou *et al*, 1994; Piguet *et al*, 1999). Toutes ces interactions semblent nécessiter différents résidus d'acides aminés de Nef situés aux deux extrémités de la protéine. Deux paires de résidus localisés à l'extrémité C-terminal participent à la régulation négative du CD4. Le motif di-leucine, L¹⁶⁴-L¹⁶⁵, est requis pour l'interaction entre Nef et les molécules adaptatrices associées à la clathrine comme AP-1 et AP-2. Le rôle de la deuxième paire de résidus, D¹⁷⁴-D¹⁷⁵, demeure toujours indéterminé. Ces acides aminés pourraient interagir avec des protéines impliquées dans l'acidification des endosomes (Mangasarian *et al*, 1999). Mangasarian *et al* ont également démontré l'importance des acides aminés R³⁵D³⁶ dans cette régulation négative du CD4. Toutefois, le phénotype était moins dramatique que celui observé chez le mutant DD¹⁷⁴AA (Mangasarian *et al*, 1999). La régulation négative du CD4 rend les lignées de cellules T humaines résistantes à l'infection du VIH. Cette observation suggère que Nef prévient la superinfection, un phénomène désavantageux pour la réplication cellulaire, et minimise les effets inhibiteurs d'une expression élevée de la molécule CD4 sur la production virale (Benson *et al*, 1993; Lama *et al*, 1999; Ross *et al*, 1999). De plus, cette régulation négative menait à la libération des protéines tyrosine kinase Lck associées au CD4. Ceci augmenterait la phosphorylation de divers substrats comme la chaîne zêta du TcR. De tels événements modifieraient le niveau d'activation des cellules T de façon à donner des conditions plus favorables à la réplication du VIH. Ces dernières observations sont cependant seulement documentées lorsque la souche SIVNef est utilisée (Cullen, 1998).

1.4.2 Régulation négative de la molécule CMHI

La régulation négative de la molécule de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité est une autre propriété conservée de Nef (Schwartz *et al*, 1996). Colins et collaborateurs ont démontré que l'expression de Nef, *in vitro*, dans des cellules primaires extraites du sang réduit la susceptibilité des cellules infectées par le VIH à la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) (Collins *et al*, 1998). La régulation négative de la molécule CD4 et du CMHI se produit par deux mécanismes différents (Greenberg *et al*, 1998a; Riggs *et al*, 1999). Le mécanisme exact par lequel Nef régule négativement le CMHI n'est toujours pas bien compris mais un mécanisme d'endocytose en est probablement la cause. La régulation négative de CMHI ne s'effectue pas par la voie classique endosomale dépendante des protéines de clathrine. La protéine Nef redirigerait le CMHI vers le trans-Golgi via une interaction avec la molécule PACS-1. Cette interaction nécessiterait le motif acide E⁶²EEE⁶⁵ de la protéine Nef (Greenberg *et al*, 1998b; Piguet *et al*, 2000) Deux autres motifs sont également importants pour la régulation négative du CMHI : le motif de liaison de type SH3 P⁷²xxP⁷⁵ et la méthionine en position 20 de l'hélice α amphipathique (Geyer *et al*, 2001). Une étude démontre que Nef empêche le CMHI de retourner à la surface membranaire. L'inhibition de l'activité de la molécule PI3K abolit la capacité de Nef à retenir intracellulairement la molécule CMHI mais n'a aucun effet sur la régulation négative de la molécule CD4 (Swann *et al*, 2001). Également, Blagoveschenskaya *et al* ont observé que ce phénomène est relié à la voie endocytaire relié à ARF6, une protéine membre de la grande famille des GTPases (Blagoveschenskaya *et al*, 2002). Cette fonction de régulation négative du CMHI représente un aspect important pour l'évasion immunitaire du VIH-1 en bloquant la présentation de l'antigène aux CTL (Tomiya *et al*, 2002). La capacité de Nef à réguler négativement les molécules de surface n'est toutefois pas limitée à la molécule CD4 et CMHI. Nef peut aussi induire une diminution d'expression de surface des molécules CD3 et CD28 (Bell *et al*, 1998; Bell *et al*, 2001; Swigut *et al*, 2001). Également, Nef induit une augmentation de l'expression de surface de la molécule DC-SIGN chez les cellules dendritiques ce qui pourrait contribuer à augmenter de la production virale (Sol-Foulon *et al*, 2002).

1.4.3 Augmentation de l'infectivité des particules virales

Bien que la protéine Nef soit exprimée tôt dans le cycle viral, diverses études tendent à démontrer son rôle lors des dernières étapes de réplication du cycle viral. Les particules virales contenant une délétion du gène *nef* démontrent une diminution de leur infectivité *in vitro* (Chowers *et al*, 1994; Miller *et al*, 1995; Schwartz *et al*, 1995). Également diverses études ont démontré une implication directe de la protéine Nef dans l'augmentation de l'infectivité des particules virales (Miller *et al*, 1994; Schwartz *et al*, 1995). Le mécanisme par lequel Nef augmente l'infectivité des particules virales n'est cependant pas unique. Bien qu'une certaine quantité de molécules Nef soient incorporées dans les virions et que ces protéines soient clivées par la protéase virale (Welker *et al*, 1996), il semble que ce phénomène ne soit pas important pour l'augmentation de l'infectivité des virions (Chen *et al*, 1998; Miller *et al*, 1997). Par contre, Nef pourrait n'avoir aucun rôle spécifique dans les particules virales mais son incorporation servirait à recruter des facteurs cellulaires spécifiques s'y liant. L'expression de Nef augmente l'incorporation d'une kinase cellulaire pouvant phosphoryler des résidus de sérine dans les virions. Cette observation pourrait expliquer l'augmentation de la phosphorylation des protéines de la matrice suite à la surexpression de Nef associée avec l'augmentation de l'infectivité de ces particules virales (Bukrinskaya *et al*, 1996, Swingler *et al*, 1997). La régulation négative de la molécule CD4 par Nef augmente également l'infectivité des particules virales *in vitro* dans des lignées de cellules immortelles (Ross *et al*, 1999; Lama *et al*, 1999) et dans des cellules T primaires (Lundquist *et al*, 2002). Ce dernier groupe a approfondi leur recherche chez les cellules T primaires en démontrant que la régulation négative du CD4 par Nef permet d'augmenter l'association de la gp120 avec la particule virale. Nef semble stabiliser l'interaction entre la gp41 et la gp120 à la surface de la membrane cellulaire ou de l'enveloppe virale (Lundquist *et al*, 2004). Cette observation fut également confirmée lors d'études chez des fibroblastes en culture (Schiavoni *et al*, 2004)

La molécule Nef augmenterait également l'infectivité des virions en interagissant avec la structure d'actine du cytosquelette tôt dans le cycle de réplication viral. Nef colocalise avec l'actine dans un complexe protéique de haut poids moléculaire (Fackler *et al*, 1997). Également, Nef interagit avec un certain nombre de protéines et de molécules associées à la réorganisation des microfilaments d'actine. Plus spécifiquement, Nef

s'associe et active le facteur d'échange de nucléotides guanine (GEF) Vav ce qui induit le réarrangement du cytosquelette (Fackler *et al*, 1999). De plus, Nef s'associe et active un des membres de la famille PAK connue pour jouer un rôle dans le réarrangement du cytosquelette (Linnemann *et al*, 2002; Manninen *et al*, 1998). Une des régions de la protéine Nef impliquée dans l'interaction avec VAV et PAK est le motif de polyproline P⁷²xxP⁷⁵ (Fackler *et al*, 1999; Wiskerchen et Cheng-Mayer, 1996; Manninen *et al*, 1998). Cette même région a été identifiée comme étant essentielle à l'augmentation de l'infectivité des virions par la protéine Nef (Goldsmith *et al*, 1995, Shaeffer *et al*, 2001). Finalement, Campbell et collaborateurs ont montré que Nef perturbe le réseau cytosquelettique lors de l'endocytose ce qui permet au génome viral de pénétrer le réseau d'actine qui constitue habituellement une barrière pour les parasites intracellulaires (Campbell *et al*, 2004).

1.4.4 Altération de la transduction des signaux intracellulaires

En plus d'agir tardivement dans le cycle de réplication virale, permettant d'augmenter l'infectivité des particules virales, l'expression de Nef contribue à optimiser la réplication virale et le développement de la pathogénèse associée au SIDA de diverses façons. L'interaction de Nef avec de multiples protéines de transduction cellulaires suggère que certaines de ses fonctions biologiques soient effectuées en altérant l'expression de gènes des cellules hôtes. Un nombre important de travaux de recherche démontrent le rôle de Nef dans la production de seconds messagers et dans l'activation de facteurs de transcription (Bandres et Ratner, 1994; Biggs *et al*, 1999 et Foti *et al*, 1999). Il n'est cependant pas facile d'établir une corrélation entre toutes ces études car selon le modèle expérimental utilisé, les informations recueillies par les chercheurs démontrent des effets parfois totalement opposés. Également, selon la souche du VIH-1 utilisé, de grandes variations peuvent survenir et compliquer l'interprétation des résultats obtenus.

Un des exemples les plus frappant de l'altération de la transduction des voies de signalisation cellulaire par Nef est sa capacité de provoquer des transformations malignes. Une forme mutée de la protéine Nef provenant du virus de l'immunodéficience simienne est capable d'induire une transformation morphologique de fibroblastes immortalisés (Du

et al, 1995). Également, la protéine Nef du VIH (HIV Nef), en coopérant avec un proto-oncogène cellulaire, la protéine tyrosine kinase Hck, est capable de transformer une lignée de cellulaire de fibroblastes Rat 2 (Briggs *et al*, 1997). Cette transformation induite par Nef est expliquée par la dérégulation de l'activité de la tyrosine kinase Hck normalement très bien contrôlée. N'étant plus contrôlée, Hck interagit avec ses effecteurs ce qui mènera à l'activation du facteur de transcription AP-1 (Briggs *et al*, 1999). D'un point de vue plus physiologique, des études démontrent que Nef accentue l'état d'activation des cellules T via la voie du TcR. Dans notre laboratoire, Hanna et collaborateurs ont démontré, dans un modèle de souris transgéniques (Tg) exprimant le génome complet du VIH sous le contrôle du promoteur CD4, que ces souris développent des symptômes similaires à ceux retrouvés chez les patients atteints du SIDA (Hanna *et al*, 1998a). Ils ont également démontré que seule l'expression de Nef sous ce même promoteur est suffisante pour induire la maladie retrouvée chez les souris Tg. On retrouve chez ces souris une suractivation des thymocytes suite à une stimulation de leur TcR ce qui augmente la phosphorylation des résidus de tyrosines de divers substrats dont LAT et MAPK (Hanna *et al*, 1998b).

D'autres indices démontrant que Nef induit l'activation des cellules T proviennent d'un variant particulier de la protéine Nef du VIS (SIV Nef) qui possède une séquence d'acides aminés similaire au motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based motif) YXXL (motif protéique possédant respectivement au premier et dernier acide aminé une tyrosine et une leucine). Les virus contenant cet allèle (VIS_{smm}PBj14) se répliquent à de haut niveau dans les cellules sanguines périphériques sans stimulations exogènes et peuvent induire la production de IL-2 par les cellules infectées (Du *et al*, 1995). De façon similaire, dans les lymphocytes T humains primaires, HIV Nef peut induire une sur stimulation de la voie de signalisation du TcR (Schrager et Marsh, 1999; Wang *et al*, 2000). Dans les cellules lymphoïdes T humaines Jurkat, l'expression de surface d'une molécule chimère CD8-Nef occasionne l'apparition de marqueurs d'activation cellulaire à la surface ces cellules, l'augmentation de la phosphorylation des résidus de tyrosines des protéines, une induction de l'activité de NF- κ B et ultimement mènera à la mort cellulaire par apoptose (Baur *et al*, 1994). Finalement, Swingler et collaborateurs ont démontré que Nef, suite à l'infection de macrophages par le VIH-1, provoque la production de MIP1 α et MIP1 β ainsi que d'autres médiateurs d'activation de cellules T non identifiés. Ces chemokines peuvent induire la

chémotaxie et l'activation des lymphocytes T présents dans leur environnement facilitant leur infection par le VIH-1 (Swingler *et al*, 1999). Le mécanisme exact pouvant expliquer l'augmentation de l'état d'activation des protéines impliquées dans la voie du TcR en présence de Nef n'est toujours pas bien déterminé. L'une des causes pouvant l'expliquer serait l'interaction directe de SIV Nef avec la chaîne ζ du complexe CD3 (Xu *et al*, 1999; Bell *et al*, 1998; Schafer *et al*, 2002; Munch *et al*, 2002). Ce complexe de signalisation incluant Nef et le TcR contournerait la voie de signalisation normale initiée par la liaison antigène-TcR.

Afin de bien comprendre comment Nef peut altérer le signal intracellulaire, l'identification des partenaires cellulaires immédiats est l'une des approches expérimentales qui est largement utilisée par différents groupes de chercheurs. Un grand nombre de partenaire de Nef ont été identifiés. Si l'on exclue les protéines impliquées dans la régulation négative du CD4 et de CMHI, décrites dans les sections précédentes, la majorité des protéines interagissant avec Nef sont des composantes des différentes voies de signalisations intracellulaires retrouvées chez une cellule.

1.4.4.1 Protéines reliées à Src

La forte homologie du motif de polyproline conservé parmi les protéines Nef des lentivirus de primates et les résultats obtenus suite à une mutation du motif de liaison de type SH3 suggèrent un rôle important de ce motif dans le développement de la pathogénèse médiée par Nef (Renkema et Saksela, 2000). Parmi les protéines contenant un domaine de type SH3, les protéines Hck et Lyn de la famille tyrosine kinase Src ont démontré de loin la plus haute affinité pour se lier avec Nef. L'affinité de cette interaction est évaluée approximativement à 0.2 μ M représentant la plus forte affinité pour une liaison de type SH3 (Lee *et al*, 1995). Cependant, les membres Lck et Fyn de la famille Src sont également reconnus pour interagir avec Nef (Greenway *et al*, 1999; Lee *et al*, 1995, 1996; Saksela *et al*, 1995; Bauer *et al*, 1997 et Cheng *et al*, 1999). L'association de Nef avec les kinases de la famille Src modifie leur activité enzymatique. Plusieurs publications démontrent une augmentation significative de l'activité de Hck ou de Lck suite à leur liaison avec Nef même si ce dernier ne semble pas un substrat de ces kinases (Briggs *et al*,

1997; Moarefi *et al*, 1997; Greenway *et al*, 1999). Moarefi et collaborateurs ont démontré que cette interaction provoque un changement conformationnel du domaine catalytique ce qui accentue le transfert de phosphate (Moarefi *et al*, 1997). Par opposition, certains groupes de recherches ont constaté que la liaison directe entre Nef et Lck ou Fyn résulte en une diminution de l'activité catalytique de ces enzymes (Greenway *et al*, 1996; Collette *et al*, 1996). Malgré cette inhibition, il fut démontré que Nef peut être phosphorylé sur des résidus de tyrosine par Lck (Colette *et al*, 1996; Baur *et al*, 1997).

Des différents motifs de la protéine HIV Nef, c'est la région centrale du motif de polyproline ($P^{72}xxP^{75}$) qui est cruciale pour son interaction avec les différents membres de la famille Src. Également, la région SH2 de la protéine Lck est également cruciale pour cette interaction (Colette *et al*, 1996; Cheng *et al*, 1999; Dutartre *et al*, 1998). Par opposition, Baur *et al*, ont observé que Nef peut également se lier à Lck via son domaine amino-terminal, soit les 22 premiers acides aminés, suggérant qu'une coopération additionnelle du motif polyproline soit nécessaire pour favoriser cette interaction (Baur *et al*, 1997). De plus, La protéine SIV Nef peut s'associer à Lck indépendamment de son motif de liaison de type SH3 mais nécessite le motif de liaison type SH2 de la protéine Lck et les 50 premiers acides aminés de la protéine SIV Nef (Greenway *et al*, 1999). Néanmoins, Lang et collaborateurs ont observé que SIV Nef pouvait se lier à la protéine Src mais cette liaison était dépendante d'une région uniquement retrouvée chez le VIS et absente chez HIV Nef (Lang *et al*, 1997). Comme il a été mentionné, pour favoriser l'interaction entre Nef et Lck, il est concevable qu'un contact de faible affinité entre le motif $P^{72}xxP^{75}$ de Nef et une protéine possédant un motif SH3 puisse survenir afin de coordonner et stabiliser le complexe entre Nef et son partenaire cellulaire. L'affinité de liaison la plus forte serait alors médiée par d'autres motifs de liaison. Si cette hypothèse s'avère exacte, un grand nombre de protéines contenant des motifs SH3 et étant impliquées dans une voie de signalisation altérée par la protéine Nef deviennent des partenaires possibles de Nef (Saksela, 1997). La liaison entre Nef et les membres de la famille Src mène inévitablement à une altération de la transduction des signaux intracellulaires. Une inhibition de la voie MAPK, une augmentation du calcium intracellulaire ainsi qu'une augmentation de l'infectivité des virions ont été observés suite à cette interaction (Greenway *et al*, 1996; Foti *et al*, 1999; Saksela *et al*, 1995).

1.4.4.2 Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

Bien qu'il soit clairement établi que Nef active les protéines MAPK, peu d'études ont démontré une interaction directe entre Nef et ces protéines. L'activation des MAPK est logiquement une conséquence de l'activation d'effecteurs en amont de ces protéines. Parmi celles-ci, Hodge et collègues ont démontré que la séquence acide conservée de la partie C-terminale de Nef est indispensable pour sa liaison avec c-Raf1. En utilisant des mutations dirigées, ce groupe a découvert que les acides aminés 174 à 179 de Nef sont requis pour cette liaison directe avec c-Raf1 (Hodge *et al*, 1998).

Greenway et collaborateurs ont démontré une interaction directe entre Nef et MAPK par la technique d'ELISA. Cette interaction est totalement dépendante du motif polyproline retrouvé chez Nef et elle mène à une diminution significative de l'activité MAPK *in vitro* (Greenway *et al*, 1996). Par opposition à cette observation, une augmentation de l'activité MAPK en présence de Nef est rapportée dans plusieurs cas (Schrager *et al*, 2002; Manninen *et al*, 2000; Biggs *et al*, 1999; He *et al*, 2004). Le traitement avec du PMA de cellules Jurkat exprimant Nef résulte en une activation de l'expression génique dirigée par le facteur de transcription NFAT (nuclear factor of activated T cells). Cet effet médié par l'activation de la calcineurine induit des changements dans le métabolisme du calcium et est indépendant de la signalisation intracellulaire reliée à la voie du TcR (Manninen *et al*, 2000). Biggs *et al* ont démontré que l'activation des MAPK de la famille ERK1 (extracellular signal-regulated kinase 1) et ERK2 par Nef s'effectuait suite à l'induction du facteur de transcription AP-1. Cette activation spécifique à certains types cellulaires nécessite également le domaine de polyproline de Nef. Ce même groupe a documenté une perte du phénotype observé dans des lignées de macrophages normaux en utilisant des mutants dominants négatifs de la protéine Hck. L'altération par Nef de la transduction des signaux dans la lignée cellulaire de macrophages RAW 264.7 requiert la participation de Hck et de AP-1 (Briggs *et al*, 1999). Plus récemment, une étude portant sur la transduction de lignée de podocytes rénaux murins avec la protéine Nef a démontré que ce dernier augmente l'activité de la kinase Src, de Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) ainsi que celle de la voie Ras-cRaf-MAPK1,2. La mutation des motifs de polyproline et du motif di-arginine de la

protéine Nef diminue les changements phénotypiques observés chez les podocytes (He *et al*, 2004).

1.4.4.3 p21-activated kinase (PAK)

Sawai et ses collègues ont observé pour la première fois l'interaction entre Nef et une kinase dans les lymphocytes T Jurkat en culture. Ils ont démontré à l'aide d'une technique d'une haute sensibilité soit l'essai kinase *in vitro* (IVKA: *in vitro* kinase assay) que Nef interagissait avec une sérine kinase ayant un poids moléculaire d'environ 62 kilodaltons (kDa) qu'il a nommé NAK (Nef-associated kinase). De plus, une forme tronquée de Nef ne possédant que les 99 premiers acides aminés ne permet plus l'interaction avec NAK (Sawai *et al*, 1996). Par la suite différents groupes ont démontré que Nef pouvait interagir avec une sérine/thréonine kinase dans divers types de cellules en culture (Manninen *et al*, 1998; Fackler *et al*, 2000; Renkema *et al*, 1999; Wolf *et al*, 2001) ou chez les macrophages dérivés de la moelle osseuse (Brown *et al*, 1995). L'identité de NAK fut déterminée suite à l'observation que qu'elle pouvait être immunoprécipitée avec l'aide d'anticorps produits contre le membre PAK1 de la famille PAK (Sawai *et al*, 1996; Nunn et Marsh, 1996). L'autophosphorylation d'une kinase présente dans le complexe immun avec Nef peut être augmentée significativement en cotransfectant une forme constitutivement activée de Rac ou Cdc42 ou inhibée par un mutant dominant négatif de ces GTPases (Manninen *et al*, 1998; Lu *et al*, 1996). Par contre, l'expression de Nef dans les cellules, sans la présence d'une forme activée de Rac, est capable d'activer NAK (Sawai *et al*, 1996; Brown *et al*, 1999; Arora *et al*, 2000). De plus, le niveau d'activation de NAK semble varier selon l'isolat du VIH-1 duquel provient la protéine Nef (Luo et Garcia, 1996; Pulkkinen *et al*, 2004). Luo et Garcia ont démontré que les protéines Nef du VIH-1 provenant des isolats SF2 et VISmac239 est un puissant activateur de NAK tandis que l'isolat HIV NL4-3 ne pouvait activer NAK (Luo et Garcia, 1996). L'identité de cette kinase est toujours controversée aujourd'hui. Certains groupes ont démontré que le membre PAK2 de la famille PAK est celui qui se lie à Nef (Renkema *et al*, 1999; Renkema *et al*, 2001; Arora *et al*, 2000) tandis que Fackler et ses collaborateurs prétendent que le membre PAK1 est NAK (Fackler *et al*, 2000). Renkema et collaborateurs ont observé dans les cellules 293T en culture que Nef se lie spécifiquement à une sous population activée de PAK2. Cette liaison peut survenir indépendamment des protéines Nck et β -PIX. Seulement

une petite fraction de PAK2 semble capable de se lier à Nef (Renkema *et al*, 2001). De plus, ce même groupe a démontré que la faible abondance de ce complexe entre Nef et NAK était due à un mécanisme d'autorégulation de PAK2. Ils ont découvert que la cotransfection de Nef et d'une forme de PAK2 possédant un domaine kinase inactif résulte en une plus grande stabilité du complexe Nef/PAK2. Cette observation supporte l'hypothèse que l'activité catalytique de PAK2 est impliquée dans la déstabilisation du complexe. Ils ont également démontré, tout comme Krautkramer et collaborateurs, que la formation du complexe Nef/NAK s'effectue qu'exclusivement dans les lipides de type rafts (Renkema *et al*, 2001, Krautkramer *et al*, 2004). L'interaction entre Nef et NAK est l'une des fonctions biologiques de Nef la plus conservée. Elle joue donc un rôle important dans le cycle de réplication viral. Des études *in vitro* ont démontré que cette interaction mène à l'augmentation de la production virale (Linneman *et al*, 2002) et à la survie cellulaire (Wolf *et al*, 2001). Linneman et ses collègues ont établi que l'activation de NAK par Nef est directement dépendante de l'activité kinase de la kinase phosphatidyl inositol 3 (PI3K). Wolf et ses collègues ont découvert qu'également, la PI3K est requise pour l'activation de NAK par Nef et que cette activation mène à la phosphorylation des protéines pro-apoptotique Bad. Ces dernières deviennent alors inactivées ce qui mène à la survie des cellules.

En utilisant des méthodes de mutations ponctuelles ou de délétions, différentes régions de la protéine Nef ont été identifiées comme étant essentielles pour procurer l'interaction entre Nef et NAK. Dans un premier temps, il a été établi que le motif de myristylation qui cible Nef à la membrane plasmique est indispensable pour cette interaction (Sawai *et al*, 1995; Wiskerchen et Cheng-Mayer, 1996; Geyer *et al*, 2001). Lors d'études *in vitro*, la mutation ponctuelle de la proline en position 69 (Manninen *et al*, 1999) ou les mutations des proline 72 et 75 détruisant le motif de liaison de type SH3 abolissent l'association entre HIV Nef et NAK (Luo *et al*, 1997; Wiskerchen et Cheng-Mayer, 1996; Manninen *et al*, 1996) ou SIV Nef et NAK (Khan *et al*, 1998; Lang *et al*, 1997). Finalement, la conservation du motif diarginine de la partie centrale de la protéine est également essentielle pour l'interaction entre NAK et HIV Nef (Manninen *et al*, 1998; Wiskerchen et Cheng-Mayer, 1996) ou SIV Nef (Sawai *et al*, 1996; Sawai *et al*, 1995; Khan *et al*, 1998).

1.4.4.4 Autres kinases

En plus d'être retrouvé associé à PAK, Nef interagit également avec d'autres protéines kinases cellulaires. Récemment, Li *et al* ont démontré une nouvelle interaction entre Nef et PKA (cAMP-dépendant kinase). Les résidus de sérine 6 et 9 de Nef sont phosphorylés par PKA dans un système *in vitro*. La mutation de la sérine 9 en alanine diminue la réplication du VIH-1 dans les cellules PBMC comparativement au virus sauvage. Cette phosphorylation de Nef par PKA jouerait un rôle important dans le cycle de réplication viral (Li *et al*, 2005). Par opposition, Coates *et al* ont conclu, en utilisant des inhibiteurs de la kinase PKA, que cette dernière n'était pas impliquée dans la phosphorylation de la protéine Nef. Par contre, ils ont démontré que la kinase PKC était celle qui phosphoryle Nef sur des résidus de sérine et de thréonine. Le ciblage à la membrane plasmique par le groupement myristyl de Nef est requis pour observer une phosphorylation des résidus d'acides aminés (Coates *et al*, 1997). Nef interagirait avec RACK1 (receptor for activated C kinase 1) pour favoriser l'interaction entre Nef et PKC. RACK1 est une protéine adaptatrice responsable de la localisation cellulaire de PKC. La présence de RACK1 dans le complexe servirait de site d'ancrage intracellulaire à Nef permettant le rapprochement entre Nef et PKC (Gallina *et al*, 2001).

Une autre kinase reconnue pour interagir avec Nef est la PI3K. La liaison entre la sous unité régulatrice (p85) de PI3K et HIV Nef permet l'activation de la kinase PAK. L'inhibition de PI3K bloque l'activation de PAK et diminue la production de particule virale. L'activation du complexe Nef-PAK-PI3K optimiserait la réplication du VIH-1 (Linneman *et al*, 2002). Finalement, Geleziunas *et al* (2001) ont montré l'implication de Nef dans un processus anti-apoptotique via son association avec la kinase ASK-1. Cette association sera décrite dans un prochain paragraphe.

1.4.4.5 Réarrangement du cytosquelette et chémotaxie

Comme il a été mentionné, une des fonctions de Nef dans les cellules infectées est d'augmenter l'infectivité des particules virales. Pour parvenir à cette fin, Nef déstabilise la structure d'actine ce qui modifie la morphologie des cellules. Campbell *et al* ont démontré que la capacité de Nef à déstabiliser le réseau d'actine complémente l'augmentation de

l'infectivité suite à une infection par des particules du VIH-1. Cette déstabilisation de l'actine faciliterait la libération des nouvelles particules virales produites (Campbell *et al*, 2004). Pour arriver à modifier le cytosquelette cellulaire, Fackler *et al* ont observé une interaction directe entre Nef et VAV, un facteur d'échange nucléotidique. Cette interaction mène à des changements du cytosquelette et à l'activation de JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Fackler *et al*, 1999). Pour appuyer ces résultats, deux autres études ont démontré une implication du proto-oncogène VAV dans la redistribution des fibres d'actine induite par Nef. Premièrement, l'expression de Nef dans des cellules microgliales a mené à une augmentation significative de la production et du relâchement de superoxydes. Des mutations de la protéine Nef impliquée dans l'interaction avec VAV et PAK ainsi que l'inactivation de Rac avec la toxine botulinique abolissent les effets observés avec la protéine sauvage suggérant un rôle de la voie de signalisation VAV/Rac/PAK (Vilhardt *et al*, 2002). Deuxièmement, Quaranta *et al* ont étudié la capacité des cellules dendritiques à phagocyter des molécules Nef solubles ainsi que les effets subséquents à cette internalisation de la molécule. Ils ont établi qu'un réarrangement des microfilaments d'actine se produit suite à l'internalisation des molécules solubles Nef. De plus, le niveau de phosphorylation de VAV est accru, ce qui provoque sa redistribution du noyau au cytoplasme (Quaranta *et al*, 2003).

Afin de pouvoir migrer à travers les tissus de l'organisme, les cellules doivent modifier le contenu de leur cytosquelette afin de changer leur morphologie (Horwitz et Webb, 2003). L'implication Nef dans la redistribution de l'actine est également documentée dans un contexte de motilité cellulaire. En utilisant la molécule SDF-1 α (stromal-derived factor 1) comme stimulus, Nef diminue le niveau de chémotaxie. La voie de signalisation de la molécule CXCR4 est altérée par Nef ce qui entraîne une diminution de l'activité de PI3K et une augmentation de la phosphorylation de ERK1,2 et une augmentation de l'activité de FAK (focal adhesion kinase) (Choe *et al*, 2002). Dans une autre étude, Nef forme un complexe avec les protéines DOCK2, ELMO1 et Rac2 dans les cellules T Jurkat. La formation de ce complexe favorise l'activation de Rac et inhibe la chémotaxie des cellules T médiée par les molécules SDF-1 ou MIP-1 β . De plus, la formation de ce complexe favorise l'activation des cellules T suite à une stimulation par IL-2 (Janardhan *et al*, 2004).

Contrairement à l'inhibition de la motilité cellulaire, d'autres travaux de recherches ont montré une augmentation de la chémotaxie en présence de Nef. Dans un premier temps, l'infection de macrophages primaires avec un vecteur adénoviral contenant le gène *nef* induit la production de deux beta-chémokines : MIP-1 α et MIP-1 β . Le surnageant de ces cellules favorise fortement la chémotaxie et l'activation de cellules T. Cette étude démontre un rôle de la protéine Nef dans le recrutement lymphocytaire (Swingler *et al*, 1999). De même, la protéine recombinante Nef provoque un recrutement lymphocytaire dans le système nerveux central du rat (Koedel *et al*, 1999).

1.4.4.6 Survie cellulaire et apoptose

Le VIH-1 a développé des mécanismes d'évasion du système immunitaire lui permettant d'induire ou d'inhiber l'apoptose cellulaire. Parmi ses protéines virales, Nef possède deux effets opposés sur la régulation du destin d'une cellule. Il est capable d'induire ou de protéger les cellules de l'apoptose (Fackler et Baur, 2002). Ces phénomènes opposés ont l'avantage de protéger les cellules infectées et de tuer les cellules avoisinantes responsables de les éliminer. Geleziunas *et al* ont démontré que Nef protège les cellules infectées contre la mort cellulaire médiée par les récepteurs CD95 (Fas) et TNF- α . Cette protection s'effectue suite à l'association de Nef avec ASK-1 (apoptosis signal regulating kinase-1) ce qui inhibe la kinase, une sérine/thréonine kinase qui agit comme intermédiaire de la voie de signalisation Fas et TNF- α (Geleziunas *et al*, 2001). Ces études sont également supportées par Yoon et collègues qui ont démontré que Nef interagit avec la voie de signalisation de Fas en inhibant l'activation des caspase-3 et caspase-8 (Yoon *et al*, 2001). La protéine Nef est également capable d'abolir la mort cellulaire dépendante de Bad, un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2. Ce mécanisme d'inhibition implique l'activation de PI3K et de PAK2 par Nef ce qui provoque la phosphorylation et ultérieurement l'inactivation de Bad (Wolf *et al*, 2001). Greenway *et al* ont également observé un effet anti-apoptotique de Nef qui implique sa liaison avec le gène suppresseur de tumeur p53. Cette liaison inhibe la fonction pro-apoptotique de p53 probablement en diminuant la demi-vie, la capacité à se lier à l'ADN et l'activation de la transcription génique provoquée par p53 (Greenway *et al*, 2002). En plus d'inhiber des molécules pro-apoptotiques, la protéine Nef est également capable d'induire l'expression

de facteurs anti-apoptotiques dans les cellules transfectées. Nef supprime la mort cellulaire dans la lignée de précurseur de macrophage humain en augmentant la traduction du facteur anti-apoptotique Bcl-XL. Dans ces cellules, Nef provoque l'augmentation de la signalisation de la voie ERK ce qui induit la régulation positive de Bcl-XL (Choi et Smithgall, 2004).

À l'opposé de la survie cellulaire, quelques publications ont démontré que la présence de Nef induit la mort cellulaire par différents mécanismes. Contrairement aux observations de Choi et Smithgall, Rasola *et al* ont démontré que l'expression de la protéine Nef réduit l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL et augmente les phénotypes reliés à l'apoptose dont la dépolarisation mitochondriale, l'exposition à la surface cellulaire des phosphatidyl serine et l'activation de la caspase-3. Ces chercheurs concluent que Nef active le programme de mort cellulaire dans différents types cellulaires en affectant plusieurs composantes critiques de la machinerie apoptotique indépendante de celle de Fas (Rasola *et al*, 2001). Une autre étude conclue à l'induction de l'apoptose par Nef dans les cellules T infectées par le VIH-1. Li et collaborateurs ont démontré que Nef et Tat, de façon indépendante, induisent l'expression de la protéine Grb3-3, un isoforme de la protéine Grb2 impliquée dans les voies apoptotiques (Li *et al*, 2000).

Tableau I: Protéines cellulaires connues pour interagir avec Nef lors de ses différentes fonctions biologiques.

Régulation négative de la molécule CD4	
	Molécule CD4 (Mangasarian <i>et al</i> , 1997)
	β -COP (Benichou <i>et al</i> , 1994)
	V-ATPase (Lu <i>et al</i> , 1998)
	Adaptines (Greenberg <i>et al</i> , 1997)
Régulation négative de la molécule du CMHI	
	PACS-1 (Greenberg <i>et al</i> , 1998b)
	Sous-unité μ du complexe AP-2 (LeGall <i>et al</i> , 1998)
Augmentation de l'infectivité	
	VAV (Fackler <i>et al</i> , 1999)
	PAK (Linnemann <i>et al</i> , 2002)
Altération de la signalisation intracellulaire	
	Src kinase (Colette <i>et al</i> , 1996, Greenway <i>et al</i> , 1996, Briggs <i>et al</i> , 1997)
	c-Raf1 (Hodge <i>et al</i> , 1998)
	ERK1 (Greenway <i>et al</i> , 1996)
	PAK1, 2 (Fackler <i>et al</i> , 2000, Renkema <i>et al</i> , 1999)
	Chaîne ζ du TcR
	PKA (Li <i>et al</i> , 2005)
	PKC (Gallina <i>et al</i> , 2001)
	RACK1 (Gallina <i>et al</i> , 2001)
	Sous-unité p85 de PI3K (Linneman <i>et al</i> , 2002)
Réarrangement du cytosquelette et chémotaxie	
	VAV (Fackler <i>et al</i> , 1999)
Survie cellulaire et apoptose	
	ASK-1 (Geleziunas <i>et al</i> , 2001)
	p53 (Greenway <i>et al</i> , 2002)

1.5 Fonctions *in vivo* de la protéine Nef

Le rôle *in vivo* de Nef dans la pathogénèse provient initialement du groupe de Desrosiers qui a observé qu'une large délétion dans le gène *nef* réduit beaucoup la pathogénicité du VIS dans les macaques rhésus. De plus, suite à l'infection de macaques avec le VIS contenant un codon de terminaison prématuré dans le gène *nef*, le cadre de lecture fut rapidement rétabli, ce qui démontre une pression sélective importante pour l'expression de la protéine Nef (Kestler *et al*, 1991). Chez les patients infectés avec le VIH-1, il existe une corrélation directe entre une infection avec un virus contenant le gène *nef* défectif et une diminution du taux de progression de la maladie (Deacon *et al*, 1995; Kirchhoff *et al*, 1995). Cependant, l'importance de Nef dans la réplication virale observée chez les humains et les macaques n'est pas toujours reproduite lors d'expériences *in vitro* et cela rend difficile une corrélation des activités *in vitro* avec les phénotypes observés *in vivo*. Malgré ces problèmes, des progrès significatifs vers une compréhension plus claire des fonctions biologiques de Nef ont été effectués en utilisant des modèles d'études *in vivo*. Lors des prochains chapitres, nous allons présenter les principaux modèles d'études *in vivo* qui permettent d'étudier les fonctions biologiques de Nef.

1.5.1 Nef chez les macaques

Kestler et collaborateur ont étudié la pathogénicité d'un clone du virus VISmac239 contenant un codon de terminaison prématuré dans le gène *nef* (Kestler *et al*, 1991). Ce virus était capable de se répliquer dans les cellules en culture et était très pathogénique lorsque injecté dans les macaques adultes. Le gène muté se rétablissait rapidement en un cadre de lecture ouvert suggérant une forte pression sélective pour une forme fonctionnelle de Nef *in vivo*. Par opposition au virus contenant une mutation ponctuelle, les virus contenant une large délétion du gène *nef* (SIVmac239deltaNef) n'étaient pas pathogéniques ce qui a permis d'évaluer le rôle de Nef *in vivo*. L'infection avec SIVmac239deltaNef a provoqué une charge virale réduite, des niveaux de cellules T CD4⁺ plus élevés et une absence de symptômes de la maladie (Daniel *et al*, 1992; Kestler *et al*, 1991; Lang *et al*, 1997; Sawai *et al*, 1996). La pathogénicité réduite de ce virus chez les macaques infectés se manifeste également par une architecture normale des ganglions lymphatiques et une absence d'altération immunitaire normalement retrouvée chez les macaques infectés par SIV mac239. D'autres études ont analysé les résidus d'acides

aminés conférant le phénotype pathogénique provoqué par Nef. Un clone viral contenant une délétion de 12 paires de bases dans la région chevauchant le gène *nef* et le LTR en position 3' provoquait un phénotype non pathogénique mais sa réversion résultait en un phénotype pathogénique. Ces observations démontrent clairement la capacité de réparation d'une petite délétion chez les lentivirus primates et confirment également qu'un gène *nef* fonctionnel est requis pour un potentiel pathogénique complet chez les singes rhésus (Whatmore *et al*, 1995).

Le rôle de la régulation négative de la molécule CD4 dans la pathogénèse induite par SIV Nef a été montré par Iafrate et collaborateurs. Un mutant de SIVmac239 codant pour des substitutions d'acides aminés (P⁷³E, A⁷⁴D et D²⁰⁴R) abolit la capacité de Nef à réguler négativement la molécule CD4 de la surface cellulaire. Les singes rhésus infectés avec ce variant ont démontré une faible charge virale sanguine tôt lors de l'infection. De façon consistante, il y a eu une forte pression sélective pour la réversion à la protéine Nef sauvage. L'apparition de ces mutants a coïncidé avec l'augmentation de la charge virale (Iafrate *et al*, 2000).

La présentation des peptides du VIS dans le contexte des molécules CMHI est l'un des mécanismes employés par le système immunitaire afin d'identifier et d'éliminer les cellules infectées par le VIS. La capacité de Nef à réguler négativement la molécule CMHI permettra donc aux cellules infectées d'échapper à la surveillance immune. Différentes études ont suggéré que la régulation négative de ces molécules joue un rôle important dans la réplication virale et la progression de la maladie *in vivo* (Cohen *et al*, 1999; Collins *et al*, 1998 et Legall *et al*, 1998). Munch et ses collaborateurs ont démontré qu'un variant du SIVmac239 contenant une mutation ponctuelle Y²²³F abolissait la régulation négative de la molécule CMHI sans affecter d'autres fonctions biologiques de Nef (Munch *et al*, 2001). De façon surprenante, cette mutation ainsi que la régulation négative du CMHI étaient rétablies dans les quatre semaines suivant l'infection des macaques rhésus suggérant une pression sélective pour la maintenance de la régulation négative du CMHI. Cependant, la corrélation avec la fonction biologique de HIV Nef est problématique car la tyrosine se retrouvant en position 223 n'est pas retrouvée chez HIV Nef où une histidine hautement conservée y est présente (Wei *et al*, 2003).

Des études additionnelles ont analysé des variants SIVmac239 possédant des mutations ponctuelles dans le motif central diarginine (RR-LL) et le motif de polyproline (PxxP) de Nef et ne pouvant s'associer avec PAK2. L'infection de macaques avec le virus SIVmac239 contenant la mutation RR-LL provoque une diminution du niveau de la virémie lors des événements précoces de l'infection. La réversion du mutant à la souche sauvage corrèle avec l'augmentation de la charge virale et mène à une virulence totale (Sawai *et al*, 1996). Cependant, différents chercheurs ont montré que cette protéine Nef mutante est instable (Foster *et al*, 2001; Iafrate *et al*, 1997 et Kawano *et al*, 1997) ce qui rend difficile l'interprétation des résultats.

Un autre motif d'interaction protéine-protéine est également l'objet d'études similaires chez les macaques. Il s'agit du motif de liaison de type SH3 (PxxP). La mutation du domaine central PxxP à AxxA de SIVmac239 abolit son interaction avec PAK2 (Carl *et al*, 2000; Khan *et al*, 1998 et Lang *et al*, 1997). À partir de ces études, deux conclusions contradictoires ont été établies. Carl et collaborateurs ont conclu que le motif de liaison de type SH3 était dispensable pour provoquer les effets biologiques majeurs de Nef dont la régulation négative des molécules CD4 et CMHI et l'augmentation de l'infectivité. De plus Lang et collaborateurs ont observé peu de révertants à la forme sauvage et la capacité de Nef à co-immunoprécipiter avec PAK2 n'était pas précédée par une augmentation de la charge virale suggérant le peu d'importance de la protéine PAK2 dans l'établissement de la maladie. Par contre, Khan et collaborateurs ont observé un rôle important du motif PxxP pour la progression de la maladie. De plus, ils ont démontré que la capacité de Nef à s'associer avec PAK2 est rétablie progressivement au cours du développement de la maladie. Mis ensemble, ces résultats indiquent une pression sélective pour la capacité de Nef à s'associer avec PAK2 pour l'induction de la maladie. Cependant, la signification biologique de cette association entre Nef et PAK2 chez les macaques n'est toujours pas élucidée. Il faut malgré tout noter que mutation du motif PxxP de Nef, en plus d'abolir son interaction avec PAK2, abolit également son interaction avec d'autres molécules dont Hck (Saksela *et al*, 1995; Colette *et al*, 1996) et Lyn (Saksela *et al*, 1995). Ces divers effets biologiques ont pour effet d'accentuer la difficulté à interpréter les résultats obtenus.

La construction de clones viraux à partir du génome du VIS contenant des gènes du VIH-1 a permis d'autres études. Ces chimères nommées SHIV (Simian/Human

immunodeficiency viruses) ont procuré un modèle afin d'étudier la fonction de différents gènes du VIH-1 chez les singes *in vivo*. Dans un premier temps, deux études *in vitro* ont démontré l'interchangeabilité des gènes *nef* du VIH-1 et du VIS. La chimère résultante pouvait se répliquer efficacement dans les cellules de macaques (Alexander *et al*, 1999 ; Sinclair *et al*, 1997). Lors d'étude *in vivo* chez les macaques, des singes inoculés avec des clones SHIV contenant les gènes *nef*, *tat*, *rev* et *env* du VIH-1 présentent une faible charge virale avec une absence de signes cliniques avant le sacrifice des animaux 4 à 6 mois suivant l'infection (Igarashi *et al*, 1994; Alexander *et al*, 1999; Shibata *et al*, 1997). Mandell et ses collègues ont également étudié chez les macaques l'effet des clones SHIV contenant les gènes *nef* des souches du HIV-1 SF2 et HIV-1 SF33. Un des macaques inoculé avec SHIVSF33 a développé le SIDA simien. Chez ce singe, les virions produits ont acquis quatre mutations d'acides aminés lors de leur passage *in vivo*. L'une de ces mutations a généré un motif YXXL dans le gène *nef* du VIH-1SF33. Ce motif est caractéristique de certaines séquences de ciblage endocytaire et est similaire également au motif de liaison de type SH2 retrouvé chez plusieurs protéines impliquées dans le signalisation de la transduction des signaux. Ces études ont permis de démontrer la capacité d'utiliser les chimères SHIV pour étudier la fonction du gène *nef* du VIH-1 *in vivo*. Il faut cependant noter que ce modèle d'étude n'induit pas une haute virémie chez tous les animaux inoculés. Toutefois, ce genre d'étude doit prendre en considération que le modèle SHIV ne présente pas tous les critères retrouvés lors d'une infection d'un humain par le VIH-1 ou l'infection d'un singe par le VIS (Mandell *et al*, 1999)

1.5.2 Nef chez les rongeurs

L'étude *in vivo* de la fonction biologique de Nef chez les singes est une procédure coûteuse. Les chercheurs ont donc favorisé une approche moins dispendieuse et plus facile d'accès qui est l'utilisation des rongeurs pour étudier les fonctions biologiques de Nef. Cependant, le VIH ne se réplique pas dans les cellules de rongeurs ce qui limite le nombre d'études *in vivo* chez les rongeurs.

1.5.2.1 Souris SCID

L'approche la plus simple pour étudier l'effet *in vivo* de Nef chez les rongeurs est d'utiliser les souris SCID (severe combined immune deficient) injectées avec des

lymphocytes de sang périphérique humain (PBL : peripheral blood lymphocyte) dans un modèle hu-PBL-SCID. Des travaux de recherches chez les souris hu-PBL-SCID ont montré que les virions provenant du VIH-1 ne contenant pas le gène *nef* éliminent peu les lymphocytes T CD4⁺ (Gulizia *et al*, 1997). Des différences significatives sont observées entre les différents isolats viraux. Plus particulièrement, les souches HIV-1 SF2 et HIV-1 JR-CSF ont besoin d'une protéine Nef fonctionnelle pour assurer leur réplication et leur capacité à éliminer les cellules T *in vivo* (Gulizia *et al*, 1997, Kawano *et al*, 1997). De plus, Kawano et collaborateurs ont analysé le rôle des différents motifs importants pour la fonction biologique de Nef dans la production des virions ainsi que leur capacité à éliminer les cellules T CD4⁺. La mutation des motifs P⁸²xxP⁸⁵ et du domaine acide K¹¹⁵R¹¹⁶ a révélé que seulement le domaine acide était crucial pour procurer *in vivo* les fonctions biologiques à Nef (Kawan *et al*, 1997).

Un autre modèle permettant d'étudier les effets du VIH-1 et de Nef chez les souris sont les souris SCID-hu (McCune 1996). Chez ces souris, des morceaux de foie fœtal et des tissus de thymus fœtal sont greffés sous la cavité rénale des souris. Ces tissus forment un organe capable de s'autosuffire, pouvant être maintenu pour une longue période et qui peut être infecté par une injection directe de virus. Utilisant ce modèle d'étude, Aldrovandi *et al* ont comparé les activités biologiques des différents gènes accessoires du VIH-1 de l'isolat NL4-3 dans les souris SCID-hu. Les résultats ont confirmé que les souches ne possédant pas le gène *nef* montrent un niveau d'infectivité et de pathogénicité moins élevé car la déplétion des thymocytes dans le thymus greffé est plus faible. Ils ont conclu que Nef est requis pour une réplication virale efficace et que la pathogénicité observée dans ce modèle d'étude est relié à la capacité du virus à se répliquer (Aldrovandi et Zack, 1996). De plus, ils ont démontré que la mutation du site de myristylation reconnu pour abolir presque toutes les fonctions de Nef *in vitro* empêche la pathogénicité des provirus contenant la protéine Nef mutante (Aldrovandi *et al*, 1998). La mutation du site de phosphorylation par la PKC (T⁸⁰A) ou les mutations individuelles des deux prolines des deux motifs PxxP retrouvées chez presque tous les isolats du VIH-1 n'affecte pas la pathogénicité chez les souris SCID-hu. De plus, la mutation des deux motifs PxxP diminue la pathogénicité de la protéine Nef mutante. Cependant, cette observation est probablement reliée à l'instabilité de la protéine (Aldrovandi *et al*, 1998). Ces auteurs ont conclu que les deux motifs PxxP ne sont pas requis pour conférer à Nef son activité biologique. De plus,

ils suggèrent que certaines des activités biologiques de Nef observées *in vitro* ne soient pas pertinentes pour l'étude de sa pathogénicité *in vivo* dans le modèle d'étude SCID-hu. La corrélation entre le rôle de Nef dans la réplication virale et la pathogénicité qu'il induit n'est analysée que depuis un certain temps. L'utilisation d'un virus ne contenant pas le gène *nef* a permis d'étudier sa réplication chez les souris SCID-hu. Ce virus est capable de se répliquer sans induire de dommages au thymus greffé. Lorsque le gène *nef* est réintroduit, on n'observe aucune augmentation de la réplication mais des signes de pathologie étaient présents dans le thymus (Duus *et al*, 2001)..

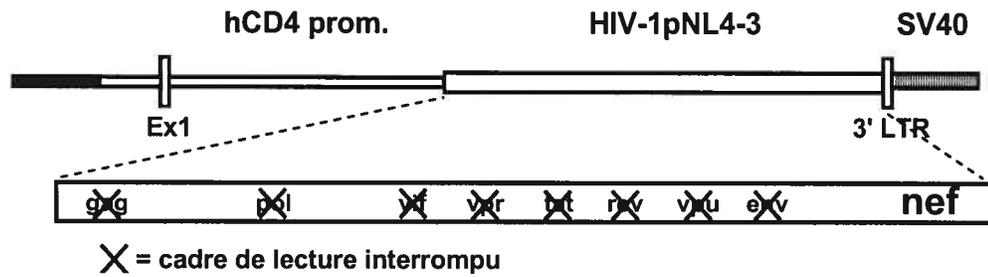
1.5.2.2 Souris transgéniques exprimant la protéine Nef

L'utilisation de souris transgéniques est une approche utilisée par différents laboratoires pour étudier les effets *in vivo* de la protéine Nef dans les cellules hématopoïétiques (Brady *et al*, 1993; Skowronski *et al*, 1993; Lindemann *et al*, 1994; Hanna *et al*, 1998b; Simard *et al*, 2002). Brady et collaborateur ont ciblé l'expression du gène *nef* dans les cellules lymphoïdes sous le contrôle du promoteur CD2. Ils ont observé une régulation négative de la molécule CD4 à la surface des thymocytes doubles positifs et une diminution du nombre de lymphocytes T CD4⁺ dans le thymus. Des analyses fonctionnelles ont révélé une diminution de l'état d'activation des thymocytes suite à une stimulation via le TcR. Avec l'aide de marquages intracellulaires, ils ont démontré une colocalisation du récepteur CD4 avec certains marqueurs présents sur l'appareil de Golgi dans les cellules T. Ces auteurs suggèrent que l'effet biologique de Nef dans les souris Tg résulte de son interférence avec la voie de signalisation de ciblage intracellulaire ou de modification post-traductionnelle.

Skowronski et collaborateurs ont démontré que des souris Tg exprimant Nef provenant de la souche NL43 du VIH-1 ont une perturbation au niveau du développement des cellules T CD4⁺ dans le thymus et une déplétion transitoire des lymphocytes T CD4⁺ retrouvés dans le système lymphoïde périphérique. Ils ont également observé que l'expression de Nef provenant de l'allèle HxB3 du VIH-1 n'a aucune influence sur le développement des cellules T CD4⁺. Ces effets contradictoires provoqués par deux souches différentes du VIH-1 peuvent être corrélés avec la capacité de Nef à réguler négativement la molécule CD4 à la surface des thymocytes (Skowronski *et al*, 1993). Par ailleurs,

Lindemann et ses collègues ont découvert que la présence de Nef dans les cellules T est associée avec une immunodéficience sévère chez leur souris Tg. Les animaux plus âgés développent une lymphadénopathie et une splénomégalie. Le thymus de ces souris possède un nombre réduit de cellules $CD4^+CD8^+$ et $CD4^+CD8^-$ lors des stades précoces de l'ontogénie et les lymphocytes T périphériques sont également en nombre réduit tout en présentant des marqueurs de surface caractéristiques des cellules T activées et mémoires. La réponse immunitaire de ces souris face à diverses infections virales est également déficiente (Lindemann et al, 1994).

Finalement, Hanna *et al* ainsi que Simard *et al* du même laboratoire de recherche ont généré deux autres modèles de souris Tg exprimant seulement la protéine Nef du VIH (Hanna *et al*, 1998b) et du VIS (Simard *et al*, 2002). Ils ont utilisé le promoteur humain et quelques éléments du "enhancer" du gène CD4 pour diriger l'expression de la protéine Nef du VIH NL43 dans les thymocytes doubles positif, les cellules T $CD4^+$ ainsi que les cellules de la lignées monocyte/macrophage incluant les cellules dendritiques (figure 1-4). Hanna *et al* ont observé chez les souris Tg $CD4C/HIV^{mut G}$ une maladie similaire au SIDA humain (AIDS-like disease). Les symptômes comportent une perte de poids, une perte de masse musculaire, la mort prématurée, une atrophie thymique, la perte des cellules $CD4^+$, une pneumonie interstitielle, une néphrite tubulo-interstitielle et une maladie cardiaque. Cette dernière est caractérisée par une myocytolyse focale, parfois par une myocardite et par la déposition d'immunoglobulines endogènes sur les cardiomyocytes. Un niveau d'apoptose plus élevé est également observé chez les cardiomyocytes des souris Tg versus leurs témoins (Kay *et al*, 2002). La vitesse et la sévérité de la maladie observée chez ces souris sont en corrélation directe avec le niveau d'expression du transgène. Des analyses biochimiques ont montré que suite à une stimulation du TcR, les thymocytes sont dans un état de surstimulation. Le niveau de phosphorylation des résidus de tyrosines des protéines LAT et MAPK ERK est plus élevé chez les souris Tg que chez leur témoin. L'étude des cellules T $CD4^+$ de ces souris démontre qu'elles possèdent une faible expression de la molécule CD40 ligand. Ce phénotype correspond avec une architecture désorganisée des centres germinatifs et du réseau de cellules dendritiques folliculaires dans la rate. De plus, ces animaux possèdent une diminution de la capacité des cellules B à produire des immunoglobulines de différents isotypes (Poudrier *et al*, 2001). Le nombre de cellules dendritiques (DC) exprimant Nef diminue dans les ganglions périphériques des souris Tg.



Tiré de Vincent *et al*, 2006

Figure 1-4: Structure transgène CD4C/HIV^{mut G}. Seule la protéine Nef du VIH-1, sous le contrôle du promoteur du gène CD4 humain, sera exprimée. Une introduction d'un codon de terminaison dans le cadre de lecture des autres gènes inhibera leur expression

En plus d'être en plus grand nombre dans la zone marginale des centres germinatifs de la rate, les DC des souris Tg possèdent une capacité réduite à présenter les peptides antigéniques *in vitro* corrélant avec une diminution de la molécule d'histocompatibilité de classe II à leur surface ainsi qu'un plus faible niveau de maturation (Poudrier *et al*, 2003)

Simard et collègues ont observé chez les souris Tg exprimant SIVNefmac239 des symptômes similaires à ceux retrouvés chez la souris CD4C/VIH^{Nef} mais avec une pénétrance plus élevée. De plus, lors de "challenge" *in vivo* avec le peptide OVA (peptide dérivé de l'ovalbumine), ces souris ne peuvent établir une réponse humorale adéquate contre l'antigène injecté en plus de développer des anticorps dirigés contre l'ADN cellulaire.

Des études subséquentes chez la souris CD4C/VIH^{Nef} ont analysé la fonction du motif PxxP conservé chez HIV Nef et la région N-terminal de la protéine. La mutation du domaine polyproline abolit complètement le potentiel pathogénique de Nef et la maladie qu'elle induit (Hanna *et al*, 2001). Également, ils ont démontré que l'absence de pathogénicité n'était pas due à une absence d'interaction avec la protéine Hck car l'expression de Nef dans des souris knock-out (K.O.) pour le gène Hck est capable d'induire la maladie mais avec une latence plus élevée. Ces résultats suggèrent que d'autres facteurs cellulaires doivent se lier à Nef pour induire une pathogénicité chez ces souris Tg. Une étude mutationnelle de Nef *in vivo* a démontré l'importance du site de myristylation (G²A) et des régions N-terminale (aa 25-35 et aa 57-66) pour induire la maladie. De plus, les résultats obtenus indiquent que les phénotypes observés chez les cellules T CD4⁺ sont indépendants de la présence de maladies dans les organes. Cette ségrégation des différents phénotypes provoqués par Nef suggère des mécanismes d'action distincts selon le type de populations cellulaires exprimant le transgène (Hanna *et al*, 2004). L'étude des cellules T CD4⁺ a montré qu'elles possèdent un phénotype semblable à celui retrouvé chez les cellules T activées et mémoires et qu'il est indépendant de la stimulation antigénique. De plus, une large proportion de cellules T CD4⁺ se situe dans la phase S du cycle cellulaire comparativement à leurs témoins. Cependant, ces cellules Tg possèdent une plus faible capacité à se diviser suite à une stimulation exogène ou lors d'une réaction lymphocytaire mixte. Cette activation chronique causée par Nef pourrait

diminuer le répertoire de cellules T CD4⁺ et ainsi contribuer à l'atrophie thymique et à la réduction du nombre de cellules CD4⁺ observé chez les souris Tg (Weng *et al*, 2004).

1.5.3 Rôle de la protéine Nef chez les individus infectés par le VIH-1

Le temps moyen de la progression du SIDA sans traitement contre le VIH varie de 7 à 11 ans (Learmont *et al*, 1999). Moins de cinq pourcent des patients demeurent asymptomatiques pour une période supérieure à 10 ans avec un niveau stable de lymphocyte T CD4⁺ (Buchbinder *et al*, 1994). Une infection par un virus contenant une délétion dans la portion du gène *nef* qui chevauche le LTR en position 3' est associée avec une atténuation de la progression de la maladie. La "Sydney blood bank cohort" est le groupe de patients infectés par ce virus qui est le mieux caractérisé. Il consiste en un donneur et 8 receveurs de transfusion, tous infectés avant 1985 (Birch *et al*, 2001; Deacon *et al*, 1995; Learmont *et al*, 1999). Un des membres de la cohorte est décédé d'une maladie n'étant pas relié au VIH-1 cinq années suivant son infection. Le reste des membres de la cohorte furent reconnus pour être asymptomatiques de 10 à 14 années suivant l'infection avec une charge virale très faible et ne possédant aucun signe immunologique de la progression de la maladie jusqu'en 1995 (Deacon *et al*, 1995). Depuis ce temps, deux autres patients sont décédés et dans aucun des cas, la cause de la mort était reliée au SIDA. Cependant, des six autres patients, trois d'entre eux ont démontré un déclin dans le compte des lymphocytes T CD4⁺ dont deux autres ont débuté une thérapie antirétrovirale (Birch *et al*, 2001 et Learmont *et al*, 1999). Les trois membres restants n'ont subi aucune chute de leur compte de lymphocytes CD4⁺.

D'autres patients infectés par le VIH-1, différents de ceux appartenant à la cohorte de Sydney et ne développant pas la maladie ont également été répertoriés. Ces patients ont été infectés avec un virus contenant une délétion dans le gène *nef* (Kirchoff *et al*, 1995 et Rhodes *et al*, 2000). Cette délétion est présente également dans le LTR en position 3' mais différentes de celle retrouvée chez la cohorte de Sydney démontrant que la perte de Nef est responsable du phénotype atténué retrouvé chez ces patients. Bien que les virus ne possédant pas le gène *nef* soient capables de provoquer une maladie à long terme, il est possible d'établir une corrélation entre l'infection avec des virions défectifs pour le gène

nef et une diminution importante du taux de progression de la maladie. Ces individus infectés développant la maladie sur une plus longue période sont appelés «Long term non-progressor». D'autres raisons peuvent également provoquer la latence dans le développement de la maladie. Parmi celles-ci on retrouve une délétion de 32 paires de base dans le co-récepteur du VIH-1; la molécule CCR-5. Cette délétion retrouvée chez certaines personnes infectées par le VIH-1 empêche le développement du SIDA (Stewart et al, 1997). Également, selon l'haplotype de son complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, une restriction de la réplication virale est observée chez un groupe de patients «Long term non-progressor» (Migueles et al, 2000).

2 PAK

Les protéines GTPases reliées à Rho, Rac et Cdc42, jouent un rôle important dans une grande panoplie d'activités cellulaires lors de processus normaux et pathologiques. Les GTPases sont capables de réguler ces processus par leur capacité à interagir avec différentes protéines cibles. Suite à cette interaction, chacun de ces effecteurs, à leur tour, jouent un rôle important dans la signalisation intracellulaire. Une classe importante de médiateurs de la famille des GTPases reliées à Rho est celle de la famille PAK (p21-activated kinase). De plus, cette famille de protéines se caractérise comme pour son implication dans plusieurs voies de signalisation importantes pour la survie ou la mort cellulaire (Ridley, 1996, Bishop et Hall, 2000, Schmidt et Hall, 2002)

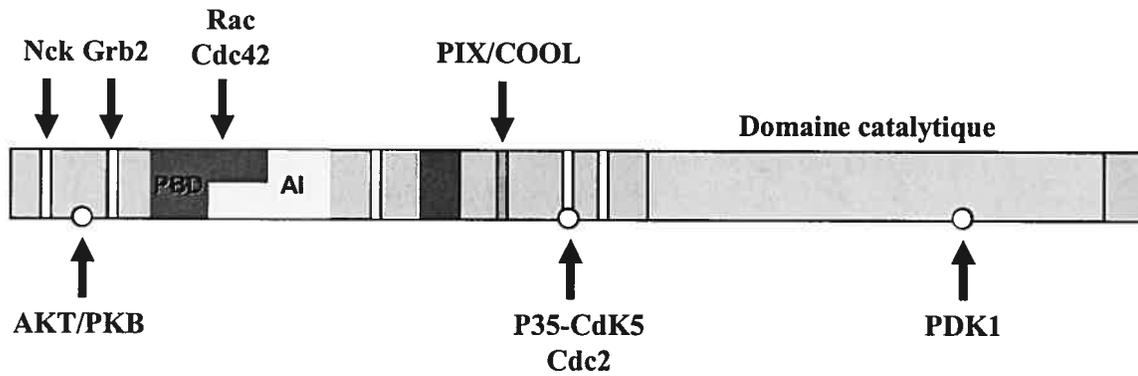
2.1 Description

Les kinases de la famille de PAK ont été identifiées lors d'un criblage pour déterminer les partenaires se liant spécifiquement aux GTPases de la famille Rho dans des extraits cytosoliques de cerveau de rat (Manser *et al*, 1994). Les protéines Rac ou Cdc42 et non RhoA, marquées radioactivement avec du [γ - 32 P] GTP, étaient capable d'interagir avec des protéines d'environ 68, 65 et 62 kDa. Ces trois protéines n'étaient toutefois pas capables d'interagir avec la forme non active de Rac ou Cdc42 lié au GDP. Ces trois cibles de Rac et CDC42 sont des membres de la famille PAK : PAK1 (α -PAK), PAK3 (β -PAK) et PAK2 (γ -PAK). L'activité phosphotransférase des PAK est très largement augmentée *in vitro* lorsque les protéines Rac1 et CDC42 sont liées au GTP (forme activée) et non au GDP (forme inactive). Cette observation suggère que les membres de la famille PAK soient des partenaires aux protéines GTPases Rac et Cdc42 (Manser *et al*, 1994). Les membres PAK 1 à 3 sont des kinases phosphorylant des résidus de sérine ou de thréonine et possédant une forte homologie de séquence dans leur domaine catalytique. Tous les organismes eucaryotes possèdent dans leur génome une protéine similaire à PAK (Dan *et al*, 2001). Plus récemment, trois autres membres de la famille PAK ont été identifiés: PAK4, PAK5 et PAK6. Également très similaires dans leurs domaines catalytiques, ces trois nouveaux membres jouent cependant un rôle très différent dans le fonctionnement cellulaire. Leur régulation et leur organisation structurale sont également différentes de

celles des membres PAK1-3. On a donc établi une nouvelle classification; les membres PAK1-3 sont regroupés dans la classe PAKI et les membres PAK4-6 regroupés dans la classe PAKII (Bockoch, 2001). Au cours des prochains chapitres, seulement les membres de la classe PAKI seront introduits car les mécanismes d'activation et de régulation des membres de l'autre classe sont, jusqu'à maintenant, peu connus.

2.1.1 Structure et régulation de l'activité enzymatique

Les membres de la classe PAKI possèdent à leur extrémité N-terminal un domaine de régulation et en C-terminal, un domaine catalytique très conservé. Les particularités du domaine de régulation des PAK 1 à 3 sont la présence de motifs de liaison de type SH3 (PxxP) retrouvés chez chaque membre. Ces motifs sont au nombre de cinq pour PAK1, deux pour PAK2 et quatre pour PAK3. Également, on retrouve chez ces protéines un domaine de liaison de type SH3 non classique (PxP). Ils permettent à PAK d'interagir avec des protéines adaptatrices contenant des domaines SH3. Parmi celles-ci on peut notamment retrouver Nck (Grb4) et Grb2 qui s'associent aux motifs classiques (Puto *et al*, 2003, Bokoch *et al*, 1996 et Galisteo *et al*, 1996) et des membres de la famille de PIX qui s'associent au motif non classique (Manser *et al*, 1998). Les protéines GTPases de la famille RHO se lient à PAK via le motif de liaison nommé CRIB (Cdc42 and Rac interactive binding). Une région incluse dans ce motif et appelée PBD (p21-binding domain) contribue à augmenter l'affinité de liaison entre les protéines. On retrouve également chez PAK un motif d'auto inhibition (représenté par le domaine AI de la figure 1-5) chevauchant la région PBD. Ce motif agit comme un commutateur permettant à l'enzyme de s'activer suite à sa liaison avec la forme active des GTPases. Parmi les membres de PAK, PAK1 est le plus étudié et le mieux caractérisé. La structure cristallographique de PAK1 a permis de mieux cibler les régions et les domaines importants pour son activité cellulaire. PAK1 existe dans la cellule sous la forme d'homodimère. La région N-terminale contenant le domaine de régulation se lie et inhibe le domaine catalytique en C-terminal d'une autre molécule. Cette interface de dimérisation chevauche les régions CRIB et PBD. L'interaction entre deux molécules PAK prévient l'activation du domaine kinase (Lei *et al*, 2000). Toujours selon la structure



Tiré de Bokoch, 2003

Figure 1-5: Structure des protéines membres de la classe PAKI. Un domaine de régulation et un domaine enzymatique présents aux extrémités N- et C-terminales respectivement sont retrouvés chez les protéines de la classe PAKI. De deux à cinq motifs de liaison de type SH3 ainsi qu'un motif PBD chevauchant le domaine d'auto-inhibition permettent la régulation de l'activité enzymatique des protéines PAK. Les cercles blancs représentent des sites de phosphorylation de divers effecteurs.

cristallographique, la liaison de PAK avec une GTPase détruit la dimérisation et mène à une série de changements conformationnels qui déstabilise la structure repliée du domaine d'inhibition. Cette déstabilisation induit sa dissociation du domaine catalytique et permet au site actif du domaine kinase de retrouver sa capacité fonctionnelle complète (Lei *et al*, 2000).

2.1.1.1 Activation de PAK dépendante des GTPases et sphingolipides

L'activation des membres de la famille PAK peut s'effectuer selon différents mécanismes. Un premier mécanisme est celui dépendant des GTPases et les sphingolipides. Différents groupes de recherches ont établi que PAK1 se lie à Rac1, Rac2, Rac3 et est activé par ces derniers (Knaus *et al*, 1998; Mira *et al*, 2000) ainsi que par Cdc42 (Manser *et al*, 1994). Selon des études de liaison *in vitro*, il a été suggéré que PAK2 puisse être sélectif pour Cdc42 (versus Rac1) (Jakobi *et al*, 1996). Par contre des études plus récentes ont démontré que l'inhibition de Rac1 bloque l'activation de PAK2 suggérant un rôle important de Rac1 dans la régulation positive de PAK2 (Weiss-Haljiti *et al*, 2004). De plus, Rac et Cdc42 sont des protéines localisées à la membrane plasmique via leur domaine C-terminal qui possède un groupement prényl. L'association de PAK avec les GTPases l'amène à la membrane où l'on retrouve les sphingolipides et une protéine kinase dépendante des phosphoinositide 3 (PKD1). Cette dernière jouant probablement un rôle positif sur la stimulation de l'activité enzymatique (Bokoch, 2003). Suite à l'activation *in vitro* des PAK, la liaison avec les GTPases n'est plus nécessaire pour conserver l'activité kinase (Manser *et al*, 1994).

2.1.1.2. Activation de PAK indépendante des GTPases

L'activation des membres de la famille PAK peut également s'effectuer de façon indépendante des GTPases. Les PAK sont généralement considérés comme étant des effecteurs des GTPases Rac et Cdc42. Cependant, un nombre de mécanismes d'activation indépendants de ces dernières, ont été identifiés. La découverte de PAK2 comme substrat pour les caspases lors d'une réponse apoptotique a permis de démontrer une corrélation directe entre l'activation de PAK2 et son niveau de phosphorylation (Rudel et Bokoch,

1997; Lee *et al* 1997). PAK2 est clivé par la caspase 3 à la position 212 ce qui procure la formation d'un fragment N-terminal de 28 kDa et d'un fragment C-terminal de 34 kDa. La protéine PAK2 clivée devient catalytiquement active probablement à cause de la perte de son domaine d'autoinhibition.

Les PAK peuvent interagir avec les protéines adaptatrices contenant des domaines SH3 comme Nck et Grb2 via leurs motifs PxxP situé en N-terminal. Ces protéines peuvent recruter PAK à la membrane plasmique où se situent les récepteurs tyrosine kinase (Yablonski *et al*, 1998; Wardenburg *et al* 1998). Le mécanisme d'activation des PAK, indépendant des GTPases, n'est toujours pas bien déterminé. Il a été suggéré que le recrutement membranaire via les protéines adaptatrices procure une localisation des PAK en proximité de PDK1 et dans un environnement qui facilite la phosphorylation des résidus d'acides aminés critiques pour l'activation de PAK (Bokoch, 2003). Différents récepteurs de facteur de croissance stimulent la formation et le métabolisme des sphingolipides. PAK pourrait être également activé directement par les sphingosines et leurs lipides dérivés (Bokoch *et al*, 1998). Cette activation s'effectue à des niveaux similaires à celle induite par les GTPases et serait causée par un phénomène semblable à celui induit par les GTPases c'est-à-dire la déstabilisation de la dimérisation des molécules PAK menant à leur activation.

2.1.1.3 Activation de PAK par phosphorylation et liaison protéique

Une troisième voie d'activation des membres de la famille PAK est celle obtenue suite à sa phosphorylation ou sa liaison avec d'autres partenaires cellulaires. Plusieurs protéines kinases ayant comme substrat PAK et pouvant réguler son activité enzymatique ont été identifiées. Cette régulation peut s'effectuer par un effet direct sur l'activité kinase de PAK ou par la régulation de sa liaison avec ses différents partenaires cellulaires. La phosphorylation des résidus de tyrosine de PAK est décrite par plusieurs groupes de recherche. La tyrosine kinase Abl peut phosphoryler PAK2 ce qui diminue son activité kinase (Roig *et al*, 2000). La tyrosine kinase Etk/Bmx, un membre de la famille Tec, peut également se lier et phosphoryler directement PAK1 (Bagheri-Yarmand *et al*, 2001). Le groupe de Saksela a démontré que PAK2 pouvait être phosphorylé sur un résidu de

tyrosine dans son domaine de régulation en N-terminal. Cette phosphorylation par différentes tyrosines kinases de la famille Src permettrait la superactivation de PAK2 en provoquant un changement de conformation (Renkema *et al*, 2002).

L'importance de la phosphorylation pour l'activation de PAK suggère que les réactions de déphosphorylation soient également importantes afin de diminuer ou même inhiber l'activité kinase de PAK. Westphal *et al* ont observé une interaction entre PAK et la phosphatase PP2A. Cependant, la signification physiologique de cette liaison n'est toujours pas bien comprise (Westphal *et al*, 1999). Koh et ses collaborateurs ont également démontré l'association de PAK avec deux isoformes d'une famille de phosphatase. Ces deux phosphatases POPX1 et POPX2 (signifiant partner of Pix-1 and Pix-2), membre de la famille des phosphatases PP2A, sont capables de se lier à diverses formes de PIX et ainsi former un complexe cellulaire multimérique contenant PAK. La surexpression de ces deux protéines antagonise les effets cellulaires de la protéine PAK1. Cependant, le rôle physiologique des phosphatases POPX dans le contexte de la signalisation de PAK n'est également pas clairement définie (Koh *et al*, 2002).

Les membres de la famille PAK peuvent également se lier à des facteurs d'échange de nucléotide guanine (GEF : guanine nucleotide exchange factor) nommés PIX (PAK-interacting exchanger) (Manser *et al*, 1998) ou COOL (cloned out of a library) (Bagrodia *et al*, 1998). L'interaction entre PAK1 et α PIX permet d'induire l'activité de PAK1 d'une façon distincte que celle induite par RAC ou Cdc42 (Daniels *et al*, 1999; Feng *et al*, 2002). Les mécanismes moléculaires menant à la stimulation de PAK1 suite à son interaction avec PIX demeurent inconnus. Cet effet est indépendant de l'activité d'échange de nucléotide guanine de α PIX. Cette régulation de l'activité de PAK par PIX pourrait contribuer à augmenter la signalisation cellulaire des voies MAPK menant à la croissance de la cellule (Lee *et al*, 2001; Shin *et al*, 2002) ou à favoriser le réarrangement du cytosquelette cellulaire (Turner *et al*, 1999; Zhao *et al*, 2000). Les membres de la famille PIX peuvent également jouer un rôle négatif dans l'activation de PAK. C'est le cas d'une forme tronquée de la protéine β -PIX (également nommée p50^{Cool-1}) un isoforme de la famille PIX. La protéine p50^{Cool-1} inhibe l'effet stimulant de RAC/Cdc42 sur l'activité de PAK

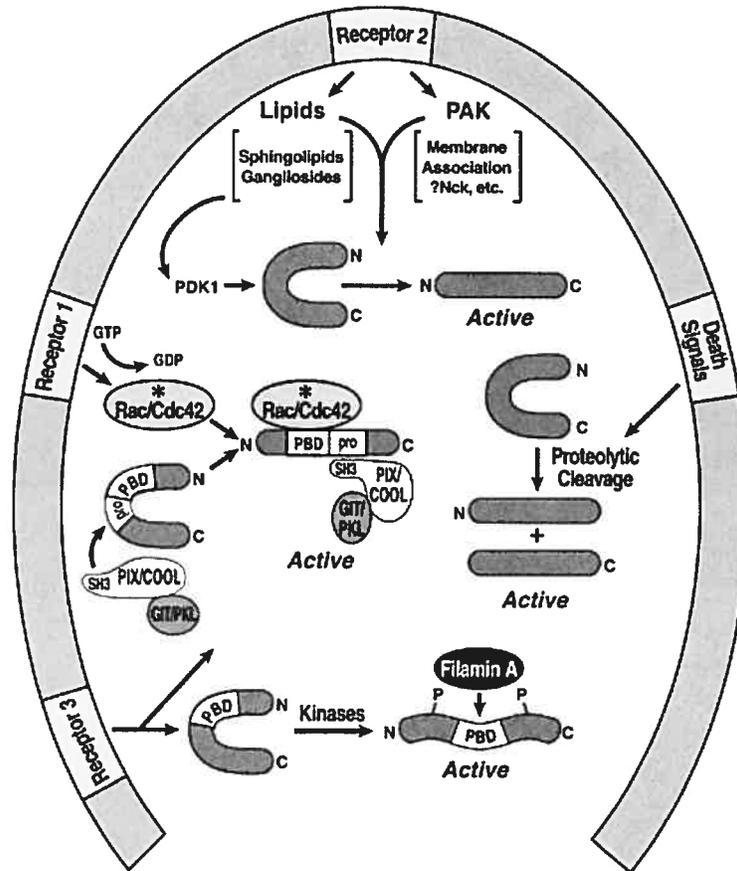
(Bagrodia *et al*, 1998; Feng *et al*, 2002). Le mécanisme et la signification physiologique de cette régulation négative de PAK ne sont pas élucidés.

2.2 Fonctions cellulaires des PAK 1-3

Il est devenu rapidement évident que les membres de la famille PAK jouent un rôle significatif dans la modulation de plusieurs activités biologiques cellulaires. Ces effets pléiotropiques sont reflétés par la multitude de protéines capables d'interagir avec les membres de la famille PAK et la diversité des substrats de ces derniers. De plus, dans les prochaines sections nous démontrerons que la famille PAK est impliquée dans plusieurs aspects de la régulation du réarrangement du cytosquelette, de la signalisation intracellulaire des MAPK et de l'apoptose (figure 1-6). Un tableau résumant les partenaires cellulaires de PAK et ses substrats sera présenté à la fin de la section 2.2.3.

2.2.1 Réarrangements du cytosquelette

Une des premières indications qu'un membre de la famille PAK, ici en l'occurrence PAK1, soit impliqué dans le réarrangement du cytosquelette sous l'influence des petites GTPases de la famille Rho provient d'étude de localisation cellulaire. Des analyses d'immunofluorescence utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques à PAK1 ont montré que PAK1 est redistribué du cytosol au réseau d'actine suite à une stimulation par le facteur de croissance PGDF, l'insuline, un endommagement de la paroi cellulaire ou la transformation par l'oncogène v-Src (Dharmawardhane *et al*, 1997, Dharmawardhane *et al*, 2000). Des études supplémentaires ont également démontré que PAK1 peut se relocaliser au site d'adhésion focal suite à l'un des stimuli énumérés précédemment (Manser *et al*, 1997, Frost *et al*, 1998, Sells *et al*, 2000). De plus, Sells et collaborateurs ont observé qu'une forme mutante de PAK1 constitutivement activée entraîne la formation de filipodes, une accumulation de larges projections membranaires (membrane ruffling) ainsi qu'une rétraction de la partie terminale des cellules en culture (Sells *et al*, 1997). Ces changements sont accompagnés de la formation de complexes focaux contenant la protéine vinculine. Ces études montrant la capacité des membres de la famille PAK à



Tiré de Bokoch, 2003

Figure 1-6: Mécanismes d'activation des membres de la classe PAKI. Divers mécanismes d'activation de PAK sont indiqués. Ces protéines peuvent être activées directement par leur liaison avec les sphingolipides ou avec les GTPases. La phosphorylation de PAK par divers effecteurs permet également son activation. Finalement, PAK2 peut être activé spécifiquement suite à son clivage par la caspase-3 lors de signaux pro-apoptotiques.

réarranger le réseau d'actine chez des cellules de mammifères ont également été corroborées par des études génétiques chez d'autres organismes. Les homologues de PAK chez *Caenorhabditis elegans* (Ste20) et chez les mammifères (Rac et Cdc42) possèdent la même fonction de réorganisation du cytosquelette lors de l'élongation du corps embryonnaire (Chen *et al*, 1996). Chez *Drosophila melanogaster*, le gène *mbt* (mushroom bodies tiny) code pour un homologue de PAK. Il est impliqué dans la transduction du signal du récepteur du guidage des axones vers le cytosquelette dans les cellules photoréceptrices lors du développement du système nerveux chez l'adulte (Hing *et al*, 1999). Divers homologues de PAK ont été découverts chez l'amibe *Dictyostelium discoideum* et PAKa colocalise avec la myosine de type II dans les cellules en division (chung et Firtel, 1999).

Comme il a été mentionné précédemment, la famille PAK joue un rôle dans plusieurs aspects de la régulation du réarrangement du cytosquelette. Parmi ceux-ci on retrouve la motilité cellulaire. Différentes études ont montré que l'expression d'une forme activée de PAK1 facilite le taux de contraction cellulaire associée à une augmentation de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine de type II (Sells *et al*, 1999; Kiosses *et al* 1999). Également, Ding et collaborateurs ont montré que PAK1 et PAK2 sont fortement activés par le chémoattractant fMLP chez les neutrophiles humains (Ding *et al*, 1996). Un deuxième aspect de la régulation du cytosquelette joué par la famille PAK est la neurogénèse. Comme indiqué auparavant, des études génétiques dans des organismes métazoaires ont démontré un rôle de PAK dans des fonctions de guidage des axones lors du développement du système nerveux. Le rôle de guidage des axones peut être mis en évidence chez l'humain dans une maladie : "nonsyndromic X-linked mental retardation". Cette maladie est causée par une mutation ponctuelle chez PAK3, retrouvé exclusivement dans le cerveau (Allen *et al*, 1998). Une de ces mutations retrouvée chez des patients affectés par cette maladie est située dans une région critique pour l'activation de PAK suite à la liaison des GTPases (Bienvenu *et al*, 2000). Un troisième aspect de la régulation du cytosquelette par PAK est l'angiogénèse. La formation des vaisseaux sanguins est reliée à la formation et au rattachement des neurones au cerveau. Les cellules endothéliales répondent à des signaux externes permettant la prolifération et le réarrangement du cytosquelette. Ces changements mènent à une augmentation de la motilité des cellules

endothéliales, l'altération de la morphologie cellulaire et une formation tubulaire qui évoluera en vaisseaux sanguins. Sans surprise, les membres de la famille PAK jouent un rôle dans ces processus. Une fonction normale de PAK est nécessaire pour la motilité des cellules endothéliales (Kiosses *et al*, 1999; Connolly *et al*, 2002, Kiosses *et al*, 2002). Un dernier aspect de la régulation du cytosquelette par PAK se situe au niveau de la métastase des cancers. Diverses études tendent à démontrer que les membres de la famille PAK peuvent jouer un rôle important dans le mouvement des cellules cancéreuses lors des métastases (Adam *et al*, 1998, Vadlamudi *et al*, 2000). Certaines lignées cellulaires de cancer du sein possèdent une activité élevée des kinases PAK1 et PAK2 (Mira *et al*, 2000).

2.2.1.1 Effecteurs de PAK lors du réarrangement du cytosquelette

Les aspects énumérés ci-dessus démontrent une implication importante de PAK lors du réarrangement du cytosquelette. Maintenant, nous élaborerons sur les différentes voies de signalisation empruntées par les molécules PAK. Un nombre élevé de substrats ou de protéines interagissant avec PAK lui permettent de changer la morphologie cellulaire, de réarranger le contenu cytosquelettique et d'augmenter la motilité cellulaire. Parmi ceux-ci on retrouve premièrement les protéines PIX/COOL et GIT/CAT/PKL, celles-ci étant des effecteurs et des cibles directes de PAK. Une fraction des membres de la famille PAK sont constitutivement associés avec les facteurs d'échange de nucléotide guanine (GEF) PIX/COOL. Comme mentionné précédemment, la famille de protéines PIX/COOL se lie à un site riche en proline non conventionnel de PAK. Des complexes protéiques incluant PAK et PIX sont également associés avec une famille de protéines d'environ 90 à 95 kilodaltons (kDa) phosphorylée sur des résidus de sérine et de tyrosine nommée PKL pour Paxillin kinase linker (Turner *et al*, 1999) ou CAT1 pour COOL-associated tyrosine-phosphorylated ou CAT2 (Premont, *et al*, 1998, Premont *et al*, 2000). Ces protéines avaient préalablement été identifiées comme étant GIT1 (G protein-coupled receptor kinase-interactor 1), une protéine contenant un domaine Arf6 GAP. Les protéines GIT/CAT/PKL se retrouvent phosphorylées lorsque les complexes PAK et PIX sont immunoprécipités et soumis à une incubation *in vitro* en présence de molécules d'ATP radioactives. Cette phosphorylation des protéines GIT/CAT/PKL est directement provoquée par la kinase PAK (Chong *et al*, 2001). De plus, la phosphorylation des résidus

de tyrosine de GIT/CAT/PKL peut-être stimulée par la coexpression de la protéine FAK et par des membres de la famille Src (Bagrodia *et al*, 1999). On retrouve sur les protéines de la famille GIT/CAT/PKL deux domaines de liaison à la Paxilline et un domaine de liaison aux protéines FAK et PIX (Zhao *et al*, 2000). Ces derniers domaines semblent être importants pour favoriser la localisation de GIT/CAT/PKL au site d'adhésion focale via leur interaction avec Paxilline et FAK. Les protéines GIT/CAT/PKL peuvent également induire le désassemblage des sites d'adhésion focale (Mazaki *et al*, 2001, Manabe *et al*, 2002, Brown *et al*, 2002). Le recrutement de PAK aux sites d'adhésion focale s'effectue possiblement via l'interaction de PIX/COOL et de GIT/CAT/PKL; la protéine Nck pouvant contribuer dans certains cas. Les activités de PAK engendrées par le complexe PIX/COOL-GIT/CAT/PKL semble être l'une des composantes importantes d'un processus dynamique qui contribue à localiser spécifiquement les sites de réarrangement du cytosquelette lors du changement de forme des cellules et de leur motilité.

Un deuxième mécanisme qu'utilisent les membres de la famille PAK afin de changer la structure du cytosquelette est d'interagir avec la kinase LIM. Les protéines LIM kinase-1 et-2 phosphorylent des résidus de sérine et sont impliquées dans la régulation de l'actine cytosquelettique via leur capacité à phosphoryler spécifiquement les membres de la famille des facteurs de dépolymérisation de l'actine/cofiline (ADF : "actin/cofilin depolymerization factor"). Suite à leur phosphorylation, les facteurs de dépolymérisation ne peuvent plus se lier efficacement à l'actine et leur capacité de dépolymériser l'actine est inhibée. Cette fonction est critique pour une dynamique normale de l'actine (Bamburg, 1999). De plus, PAK1 PAK2 et PAK4 peuvent interagir avec LIM kinase-1 et moduler son activité (Bokoch, 2003).

Un troisième mécanisme utilisé par les membres de la famille PAK afin de réguler la structure du cytosquelette est leur interaction avec la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLCK: myosin light chain kinase) et la chaîne régulatrice légère de la myosine (R-MLC : regulatory myosin light chain). Certaines études ont démontré que PAK1 et/ou PAK2 sont capable de phosphoryler directement la chaîne légère régulatrice de la myosine résultant en une augmentation de la contraction (Zeng *et al*, 2000). Par contre, la protéine PAK1 peut également phosphoryler MLCK *in vitro* ce qui contribue à augmenter son

activité et par le fait même inhiber la contraction de la myosine. La protéine PAK2 joue un rôle similaire dans les cellules endothéliales *in vitro* (Goeckeler *et al*, 2000).

Finalement, il a été démontré que PAK1 peut s'associer avec la filamine A ce qui favorise la contraction des fibres d'actine. Les cellules ne possédant pas la filamine A démontrent une viscoélasticité cytoplasmique réduite et possèdent une faible capacité de locomotion. PAK1 est capable de se lier à la filamine A via une région qui chevauche le domaine de liaison CRIB/PBD ce qui est suffisant pour lever l'auto inhibition et augmenter l'activité enzymatique (Vaklamudi *et al*, 2002).

2.2.2 Transduction du signal intracellulaire

Plusieurs études ont révélé l'implication des membres de la famille PAK dans la transduction des signaux intracellulaires reliés à la croissance et la transformation cellulaire. Il a été observé dans un premier temps que l'expression d'une protéine PAK1 mutante ne possédant plus d'activité kinase empêche la transformation de fibroblastes RAT-1 par l'oncogène Ras (Tang *et al*, 1997; Tang *et al*, 2000). Cependant, l'expression d'une version constitutivement active de PAK1 n'était pas suffisante par elle-même pour induire la transformation cellulaire. Ces données suggéraient une synergie entre PAK1 et Ras afin de favoriser la transformation. La capacité de PAK1 à induire la transformation peut être attribuable à ces effets de la signalisation intracellulaire via la voie ERK MAP kinase. Les protéines PAK1, 2 et 3 peuvent susciter l'activation de JNK et p38 MAP kinase (Bagrodia *et al*, 1995a). Les modes d'activation de JNK et p38 MAP kinase par PAK ne sont pas encore bien définis et cette activation semble se produire seulement dans certains types cellulaires (Rudel *et al*, 1998).

2.2.3 Apoptose et survie cellulaire

Les différents membres de la famille PAK sont également impliqués dans le processus apoptotique en stimulant des événements anti et pro-apoptotiques. Le membre PAK1 est impliqué dans la survie cellulaire en stimulant la voie de signalisation pro-survie suite à leur activation par les facteurs de croissance (Dharmawardhane *et al*, 1997). Une des conséquences de l'activation de PAK1 est la phosphorylation de Bad, l'un des

membres de la famille Bcl-2 pro-apoptotique (Schurmann *et al*, 2000). Le membre PAK2 quant à lui est activé suite à différents stimuli associés au stress cellulaire comme l'hyperosmolarité (Roig *et al*, 2000b), le choc thermique (Chan *et al*, 1998), les radiations ionisantes (Roig et Traugh, 1999) et les traitements photo dynamiques (Chan *et al*, 2000) Dans tous ces cas, l'activation de PAK2 provoque la mort cellulaire. Par opposition, Jakobi et collaborateurs ont observé qu'une forme constitutivement active de PAK2 permet la survie des cellules en phosphorylant la protéine pro-apoptotique Bad la rendant ainsi inactive. La forme active de PAK2 réduit également l'activité d'ERK, JNK et p38 MAP kinase (Jakobi *et al*, 2001).

Des études *in vitro* utilisant des cellules humaines ont démontré que l'activation des caspases mène au clivage de PAK2 en deux fragments. Un fragment N-terminal de 28 kDa et un fragment C-terminal de 34 kDa (Rudel et Bokoch, 1997; Lee *et al*, 1997; Chan *et al*, 1998; Walter *et al*, 1998; Chan *et al*, 2000; Jakobi *et al*, 2001; Jakobi *et al*, 2003). Il est à noter que chez la souris, ce site de clivage n'est pas présent. Le clivage de PAK2 survient suite à une réponse cellulaire face à divers stimuli induisant l'apoptose. La caspase 3 clive PAK2 à l'acide aminé suivant l'asparagine à la position 212 absente chez PAK3 et inaccessible chez PAK1. Le produit de clivage de 34 kDa contient le domaine catalytique kinase complet possédant probablement une forme constitutivement active suite à l'élimination du domaine de régulation lors du clivage enzymatique. L'activation protéolytique de PAK2 procure un mécanisme d'activation indépendant des GTPases qui pourrait contribuer à causer les altérations morphologiques et biochimiques observées lors de l'apoptose. Cependant, la liaison avec Rac ou Cdc42 pourrait être essentielle pour favoriser la dissociation du fragment catalytique du domaine de régulation (Buchwald *et al*, 2001). La micro-injection ou la transfection de lignées cellulaires avec le domaine catalytique constitutivement actif de PAK2 induit des modifications majeures dans la morphologie cellulaire et nucléaire démontrant la présence d'apoptose (Lee *et al*, 1997). Par contre, l'expression d'une forme dominant négative de PAK2 (mutation dans le domaine catalytique) retarde l'apoptose et diminue la formation de corps apoptotiques (Rudel et Bokoch, 1997). Rudel et ses collaborateurs ont constaté que l'activité de PAK2 est requise pour l'activation de la voie de signalisation JNK suite à la liaison de Fas à son récepteur dans les cellules Jurkat (Rudel *et al*, 1998). Le clivage de PAK2 et son activation

sont des événements relativement tardifs dans le processus d'apoptose. Il prend place lorsque les cellules sont déjà entrées dans le programme apoptotique en réponse aux signaux pro-apoptotiques reçus.

2.3. Fonctions biologiques *in vivo* des membres de la famille PAK

L'étude *in vivo* des différents membres de la famille PAK s'est effectuée surtout chez des modèles de levure en fission ou chez la drosophile. Très peu d'études chez les mammifères furent entreprises. Des résultats provenant du groupe de Chernoff ont démontré que ses souris K.O. pour les gènes PAK1 possèdent des déficiences immunitaires tandis que celles ne possédant pas PAK2 décèdent au niveau embryonnaire (Hofmann *et al*, 2004). Chez l'humain, comme mentionné auparavant, des mutations dans le gène PAK3 provoquent une maladie neurologique : X-linked, non syndromic mental retardation (MRX) syndromes (Allen *et al*, 1998). Pour les membres de la classe PAKII, Qu *et al* ont démontré que le gène PAK4 est essentiel pour la viabilité embryonnaire et le développement neuronal (Qu *et al*, 2003). Les neurones moteurs provenant des souris K.O. pour le gène PAK4 ne peuvent se différencier et migrer vers leurs positions attendues. Cet effet est probablement relié au rôle de PAK4 dans la régulation du réarrangement du cytosquelette et l'adhésion des cellules à la matrice. Par opposition, le phénotype observé chez les souris K.O. pour le gène PAK5, également membre de la classe PAKII, est complètement différent de celui obtenu avec les souris déficientes pour le gène PAK4. Ces souris se développent normalement et sont fertiles. Le système nerveux semble normal tout comme les autres tissus où PAK5 est exprimé. Il semble donc exister une redondance fonctionnelle entre PAK5 et les autres membres de la famille PAK (Le et Minden, 2003).

Tableau II: Partenaires cellulaires et substrats connus des différents isoformes de PAK.

	Partenaire cellulaire	Isoforme
Réarrangement du Cytosquelette	Paxilline	3
Protéine kinase	Akt	1
	PDK1	1
	PI3K/p85	1
	Cdk5	1
	Cdc2	1
	Src kinases	2
	PKA	2
Protéine phosphatase	PP2A	1, 3
	POPX1, 2	1, via PIX
Protéine adaptatrice	Nck(Grb4)	1
	Grb2	1
Autre	Rac/Cdc42	1, 2, 3
	Sphingolipides	1
	POX/COOL	1, 2, 3
	GIT/PKL	1, 2, 3 via PIX/COOL

	Substrat	Isoforme
Réarrangement du cytosquelette	Myosin light chain kinase (MLCK)	1
	Regulatory Myosin light chain (R-MLC)	2
	Myosin heavy chain	1
	Myosin II heavy chain	1
	Filamine A	1
	Merlin	1, 2
Protéine kinase	LIM kinase	1
	Raf-1	1
Apoptose	Bad	2

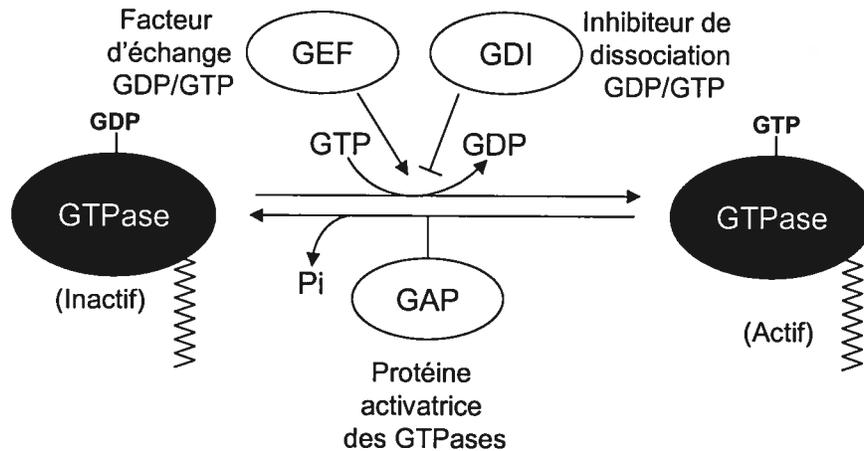
Selon Bokoch, 2003

2.4 GTPase de la famille Rho

Les protéines de la famille Rho pouvant se lier au GTP sont regroupées dans les sous-familles Rho, Rac et Cdc42. Ils furent originellement découverts lors de la recherche de protéines homologues au proto-oncogène Ras. Les GTPases de la famille Rho appartiennent à une superfamille composée de plus de 50 membres et divisées en six familles : Ras, Rho, Arf, Sar, Ran et Rab. Ces protéines existent sous deux formes inter convertibles : la forme inactive liée au GDP et la forme active liée au GTP. Les GTPases activées jouent leur rôle physiologique en interagissant avec leurs effecteurs spécifiques situés en aval et suite à l'hydrolyse du GTP en GDP les GTPases deviennent inactives. Les réactions d'échange GTP-GDP sont régulées par les facteurs d'échanges de nucléotide guanine (GEF), les inhibiteurs de dissociations de nucléotide guanine (GDI) et les protéines activatrices de GTPase (GAP) (figure 1-7). Les GTPases de la famille Rho sont impliquées dans la croissance cellulaire, la morphogenèse, la motilité cellulaire, les voies d'endocytoses-exocytoses et la réorganisation de contenu cytosquelettique mais elles sont également impliquées dans la transformation cellulaire et la formation de métastase (Takai *et al*, 2001)

2.4.1. Fonctions cellulaires des GTPases dans les fibroblastes

Les GTPases de la famille Rho sont d'importants régulateurs du cytosquelette d'actine et en conséquence influencent la morphologie et le mouvement des cellules. Plusieurs travaux de recherches ont démontré que ces protéines sont des médiateurs importants dans les voies de signalisation reliant les facteurs de croissance extracellulaire ou de leurs récepteurs et l'assemblage des sites d'adhésion focale et leur structures associées (Ridley et Hall, 1992; Ridley *et al*, 1992; Takai *et al*, 2001). La molécule Cdc42 permet la formation de filipodes tandis que Rac1 est responsable pour la formation de lamellipode et de projections membranaires. Dans les fibroblastes, ces GTPases s'activent mutuellement dans une cascade où Cdc42 active Rac qui à son tour active Rho (Ridley *et al*, 1992). Plusieurs protéines sont capables de se lier à la forme activée des GTPases ce qui leur permet d'agir sur le contenu du cytosquelette. Les kinases ROK α (RhoA-binding kinase α) phosphorylant les résidus de sérine et de thréonine et une protéine similaire p160ROCK (ROK β) ont retenu l'attention. Suite à leur liaison avec les GTPases, les



Tiré de Bokoch, 2003

Figure 1-7: Mécanismes de régulation des GTPases de la famille Rho. Les GTPases inactives lorsque liées au GDP sont activées par les facteurs d'échange nucléotidiques qui substituent le GDP pour une molécule GTP. Par opposition, la régulation négative des GTPases actives s'effectue par l'échange du GTP par un GDP. Cette réaction est effectuée par deux types de protéines: les inhibiteurs de dissociation du GTP et les protéines activatrices des GTPases.

kinases ROK possèdent une activité accrue ce qui leur permet la phosphorylation d'une sous-unité de la protéine myosine. Cette phosphorylation augmente alors la liaison de la myosine avec les filaments d'actine et conséquemment la formation des fibres d'actine. (Ridley, 2001).

Deuxièmement, les GTPases de la famille Rho sont capables de réguler l'adhésion entre deux cellules dépendante des cadhérines. Des études, utilisant les cellules MDCK ont démontré que Rac renforce l'adhésion cellulaire dépendante des cadhérines en augmentant la quantité de filament d'actine, de cadhérine et de caténine aux sites d'adhésion cellule-cellule (Takaishi *et al*, 1997). Par opposition à ces observations, Braga et collaborateurs ont démontré que Rac abolit l'adhésion cellule-cellule dans des lignées de kératinocytes (Braga *et al*, 2000). Les mécanismes moléculaires régissant cette adhésion cellulaire sont toujours inconnus. Finalement, des rôles dans les processus d'inflammation et d'induction du cancer sont décrits pour ces GTPases (Takai *et al*, 2001).

2.4.2. Fonctions biologiques des GTPases Rac *in vivo*

L'étude *in vivo* des GTPases de la famille Rho n'est pas une chose facile car l'inhibition de Rho chez les souris est létale au niveau embryonnaire (Chen *et al*, 2000) et les autres membres de cette famille à l'exception de la sous-famille Rac sont très peu étudiés. Seuls les membres Rac sont largement documentés *in vivo* chez les souris et ces études seront introduites lors des prochains chapitres. Afin de comprendre le rôle du gène Rho chez les souris, un laboratoire de recherche a contourné le problème de létalité en inactivant ce gène seulement dans le thymus. Henning et collègues ont produit des souris transgéniques qui expriment la toxine botulinique dont l'expression est sous le contrôle du promoteur du gène Lck. Ce transgène permet l'inactivation de tous les membres de la famille Rho (Henning *et al*, 1997). Ces souris démontrent une atrophie thymique importante ainsi qu'une diminution des lymphocytes T périphériques. Bien que la sélection négative et positive dans le thymus semble normale, les thymocytes possèdent des défaillances au niveau de la prolifération et du développement. Lorsque ces mêmes souris atteignent un âge plus avancé, soit de quatre à huit mois, elles développent des lymphomes

thymiques sévères (Cleverley *et al*, 2000). Il n'existe aucun autre modèle murin pour étudier la fonction des protéines Rho.

Chez les mammifères, il existe trois isoformes de la GTPase Rac. Ils possèdent une très forte homologie de séquence avec des différences situées principalement dans le domaine C-terminal (Haataja *et al*, 1997). L'isoforme Rac1 est le plus étudié et il est exprimé de façon ubiquitaire. Contrairement à Rac1, Rac2 semble être exprimé seulement dans les cellules d'origine hématopoïétiques (Didsbury *et al*, 1989). Rac3 est exprimé dans divers tissus mais plus fortement dans le cerveau (Haataja *et al*, 1997). L'étude des différents isoformes de Rac utilise des protéines possédant une forme constitutivement active ou utilise des mutants dominants négatifs de Rac. La micro-injection des formes activées de Rac1 et Rac2 dans des fibroblastes induit la formation de projections membranaires (Ridley *et al*, 1992). À l'inverse, le dominant négatif de Rac1 (N17Rac1) inhibe la formation de lamellipode, les projections membranaires et la migration cellulaire de différents types de cellules incluant les macrophages (Cox *et al*, 1997) mais non dans les cellules dendritiques (West *et al*, 2000).

La majorité des études visant à déterminer le rôle des GTPase Rac *in vivo* sont effectuées à l'aide de souris K.O. pour les différents isoformes de la famille Rac. L'utilisation des souris K.O. pour l'isoforme Rac1 a démontré que cet isoforme joue un rôle important dans l'adhésion cellulaire et l'étalement des macrophages sur une matrice (Wells *et al*, 2004). Les macrophages provenant des souris Rac1 K.O. possèdent une morphologie altérée dont une forme plus allongée et une surface d'adhésion réduite. Par contre, ils ont également démontré une migration et une chémotaxie normale. Gu et collaborateurs ont démontré que les cellules progénitrices hématopoïétiques ne possédant pas Rac1 possèdent un défaut de prolifération caractérisé par une diminution de cellules dans la phase G2/M du cycle cellulaire et une diminution de l'activité des protéines ERK1/2 et Akt (Gu *et al*, 2003).

L'importance de Rac2 dans la production de superoxide et la migration chez les neutrophiles (Gu *et al*, 2003; Williams *et al*, 2000) ainsi que chez les macrophages (Yamauchi *et al*, 2004) fut clairement démontrée chez les souris K.O. pour le gène Rac2 ou chez les souris transgéniques exprimant un mutant dominant négatif du gène Rac2. De

plus, l'absence de Rac2 chez ces macrophages a provoqué une diminution de la phagocytose comparativement à leur témoin. Yu *et al*, utilisant le même modèle animal, ont observé que l'absence de Rac2 affecte l'activation des cellules T. Plus précisément, les splénocytes des souris K.O. présentent une diminution de la prolifération et de la production d'interleukine-2 suite à une stimulation via le TcR. Ces phénotypes semblent être causés par une diminution de l'activité des MAPK ERK1/2, une diminution du relâchement du calcium intracellulaire et une déficience de l'actine à polymériser (Yu *et al*, 2001). Par ailleurs, des cellules dendritiques provenant de souris double K.O. pour les isoformes Rac1 et Rac2 ne peuvent stimuler adéquatement les cellules T naïves. Ces cellules présentent une incapacité à présenter efficacement les antigènes aux cellules T naïves et à interagir avec celles-ci (Benvenuti *et al*, 2004).

À l'aide d'une approche différente, des souris Tg exprimant une forme constitutivement activée de Rac1, Gomez *et al* ont démontré le rôle de Rac1 dans la prolifération et la différenciation des cellules pré-T dans le thymus (Gomez *et al*, 2000). De plus, ils ont démontré chez ces mêmes souris que Rac1 est impliqué dans la sélection thymique. Cette molécule peut favoriser la sélection positive des thymocytes au détriment de la sélection négative ce qui démontre son rôle critique dans le développement thymique et le maintien de l'homéostasie immunitaire (Gomez *et al*, 2001). Lorès et collègues, utilisant des souris transgéniques exprimant une forme constitutivement activée de la GTPase Rac2 humain, a démontré que Rac2 augmente l'apoptose dans les thymus de ces souris Tg (Lorès *et al*, 1997). Une atrophie thymique provoquée par la diminution des thymocytes double positifs, et des thymocytes CD4⁺ et CD8⁺ est notamment observée chez les souris Tg.

OBJECTIFS

Avec l'autorisation M. Jacques Bélair, vice-doyen de la Faculté des Études Supérieures de l'Université de Montréal, cette thèse de doctorat a été rédigée sous la forme d'articles.

La protéine Nef du VIH-1 fut décrite pour interagir avec différentes composantes cellulaires de la cellule hôte. Parmi celles-ci, on retrouve la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I, la molécule CD4, différentes kinases phosphorylant des résidus de tyrosine, sérine et thréonine. Les membres de la famille PAK, font partie de la famille sérine/thréonine kinase pouvant interagir avec Nef. Cependant, l'identité exacte du membre de la famille interagissant avec Nef est encore sujette à discussion. Un groupe suggère qu'il s'agisse de PAK1 tandis que d'autres ont démontré qu'il s'agissait de PAK2. La majorité des études concernant l'interaction Nef/PAK ont été effectuées majoritairement *in vitro*. Les études *in vivo* effectuées le furent sur des macaques infectés avec un virus contenant dans leur génome le gène nef intact, avec des mutations ponctuelles ou complètement supprimé. Également, parmi ces études, des résultats contradictoires furent obtenus. Certains groupes soutiennent que l'interaction entre Nef et PAK est indispensable pour permettre une bonne infectivité et une bonne réplication virale. Par contre, des études ont démontré que cette interaction n'est pas essentielle pour le développement du SIDA simien chez les macaques infectés.

L'objectif principal de ce projet de recherche était de déterminer le rôle de Nef dans l'altération des signaux intracellulaire dans les souris Tg CD4C/HIV-Nef. Ces souris n'expriment que le gène nef du VIH-1 qui est sous le contrôle du promoteur CD4 humain et de quelques éléments du "enhancer" CD4 murin. L'expression du transgène est limitée aux thymocytes doubles positifs, aux lymphocytes T CD4⁺ ainsi qu'aux cellules de la lignée monocyte/macrophages incluant les cellules dendritiques. Ces souris Tg développent une atrophie thymique, une lymphadénopathie, des maladies pulmonaires, rénales et cardiaques, une perte de masse musculaire ainsi qu'une mort prématurée. Un premier objectif spécifique de ce projet de recherche était de déterminer si Nef était capable d'interagir avec une kinase cellulaire, plus spécifiquement la kinase PAK, dans diverses lignées de cellules primaires de ces souris Tg. Advenant une interaction entre Nef et PAK, nous voulions ensuite trouver quels étaient les partenaires cellulaires de Nef

retrouvés dans ce complexe. Un deuxième objectif spécifique était de déterminer quels étaient les motifs de la protéine Nef nécessaires à l'interaction entre Nef et PAK. Nous voulions également vérifier si cette interaction jouait un rôle dans le développement d'une maladie similaire au SIDA chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef. Pour vérifier cet objectif spécifique, nous avons utilisé différentes lignées de souris Tg exprimant des mutants de la protéine Nef. Parmi ces mutants, certains étaient connus pour abolir l'interaction entre Nef et PAK, tandis que d'autres abolissait la régulation négative de la molécule de surface CD4

Le deuxième chapitre de cette thèse sera constitué d'un article soulignant le rôle de l'interaction entre Nef et PAK2 dans le développement de maladie chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef. Cet article intitulé: "Activation of PAK2 and its association with Nef are conserved in murine cells, but are not sufficient to induce an AIDS-like disease in CD4C/HIV transgenic mice" a été accepté par la revue *Journal of Biochemical Chemistry* et permet de répondre aux objectifs spécifiques décrits ci-dessus. Suite à ce manuscrit, un premier appendice décrira l'interaction entre Nef et PAK2 chez diverses souris Tg exprimant une forme mutée de la protéine ou exprimant le transgène chez diverses sous-populations cellulaires.

Toujours dans le but de déterminer la façon dont Nef altérerait la signalisation intracellulaire chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef, nous nous sommes fixé comme objectif spécifique de vérifier diverses fonctions biologiques des macrophages provenant des souris Tg. Nous avons choisi les macrophages plutôt qu'une autre sous-population cellulaire car Hanna *et al* ont montré clairement que les thymocytes des souris Tg sont suractivés comparativement à leurs témoins (Hanna *et al*, 1998). Aucune étude n'avait été entreprise dans les macrophages qui expriment également le transgène. L'endocytose, la phagocytose, la sécrétion de cytokines et l'adhérence à une matrice sont parmi les fonctions biologiques étudiées dans les macrophages provenant des souris Tg.

Le troisième chapitre de cette thèse décrit l'implication de Nef dans l'altération de divers phénotypes observés chez les macrophages péritonéaux provenant de ces mêmes souris Tg. Cet article intitulé: "Functional characteristics of Nef-expressing peritoneal macrophages of CD4C/HIV^{MutG} transgenic mice following different stimuli" sera soumis à la revue *Journal of Immunology*. Un deuxième appendice suivra ce manuscrit et décrira d'autres phénotypes observés chez les macrophages péritonéaux des souris Tg.

CHAPITRE II

AVANT-PROPOS

La protéine Nef du VIH-1 interagit avec différentes composantes cellulaires de la cellule hôte. Parmi celles-ci, on retrouve la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI), la molécule CD4, différentes kinases phosphorylant des résidus de tyrosine ou de sérine/thréonine. Les membres de la famille PAK font parti des sérine/thréonine kinase pouvant interagir avec Nef. Cependant, l'identité exacte du membre de la famille interagissant avec Nef est encore sujet à controverse. Un groupe suggère qu'il s'agisse de PAK1 tandis que d'autres suggèrent qu'il s'agirait de PAK2. La majorité des études dont l'interaction Nef/PAK faisait l'objet ont été effectuées majoritairement *in vitro*. Les études *in vivo* utilisent des macaques infectés avec un virus contenant dans leur génome le gène Nef intact, comportant des mutations ponctuelles ou complètement supprimé. Également, parmi ces études, on obtient des résultats contradictoires. Certains groupes soutiennent que l'interaction entre Nef et PAK est indispensable pour permettre une bonne infectivité et une bonne réplication virale tandis que d'autres indiquent le contraire. Par contre, il est clair que cette interaction n'est pas essentielle pour le développement du SIDA simien chez les macaques infectés.

Afin de déterminer le rôle de l'interaction entre Nef et PAK *in vivo*, nous avons utilisé comme modèle d'étude les souris Tg CD4C/HIV-Nef. Ces souris n'expriment que le gène nef du VIH-1 sous le contrôle du promoteur CD4 humain et de quelques éléments du "enhancer" CD4 murin. L'expression du transgène est limitée aux thymocytes doubles positifs, aux lymphocytes T CD4⁺ ainsi qu'aux cellules de la lignée monocyte/macrophages incluant les cellules dendritiques. Ces souris Tg développent une atrophie thymique, une lymphadénopathie, des maladies pulmonaires, rénales et cardiaques, une perte de masse musculaire ainsi qu'une mort prématurée.

Les travaux présentés dans ce chapitre ont été publiés dans la revue Journal of Biochemical Chemistry en 2006

**ACTIVATION OF PAK2 AND ITS ASSOCIATION
WITH NEF ARE CONSERVED IN MURINE CELLS, BUT ARE NOT
SUFFICIENT TO INDUCE AN AIDS-LIKE DISEASE IN CD4C/HIV
TRANSGENIC MICE**

Patrick Vincent¹, Elena Priceputu¹, Denis Kay¹, Kalle Saksela², Paul Jolicoeur^{1,4,5} and
Zaher Hanna^{1,3,5*}

Laboratory of Molecular Biology, Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Avenue West, Montreal, Quebec, H2W 1R7, Canada¹; Department of Virology, Haartman Institute, University of Helsinki and Helsinki University Central Hospital, FIN-0014, Helsinki, Finland, and Institute of Medical Technology, University of Tampere and Tampere University Hospital, FIN-33014, Tampere, Finland²; Departments of Medicine³ or Microbiology and Immunology⁴, Université de Montréal, Montreal, Quebec, H3C 3J7, Canada; Experimental Medicine⁵, McGill University, Montreal, Quebec, H3G 1A4, Canada

Running Title: Nef-NAK association in HIV Tg mice.

Address correspondence to: Dr Zaher HANNA, Ph.D., Department of Molecular Biology, Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Avenue West, Montreal, Quebec, H2W 1R7, Canada, Tel. 514 987-5571; Fax. 514 987-5794; E-Mail: hannaz@ircm.umontreal.ca

A well-conserved feature of HIV-1 and SIV Nef is the interaction with and activation of the human p21-activated kinase2 (PAK2). The conservation of this interaction in other species and its significance for Nef pathogenesis *in vivo* are poorly documented. In the present study, we measured these parameters in Nef-expressing thymocytes, macrophages and dendritic cells of a transgenic (Tg) mouse model of AIDS (CD4C/HIV). We found that Nef binds to and activates PAK2, but not PAK1 and 3, in these three cell subsets. Nef associates with only a small fraction of PAK2. The Nef-PAK2 complex also comprises β -PIX/COOL. The impact of the Nef-PAK2 association on disease development was also analyzed in Tg mice expressing 10 different Nef mutant alleles. CD4C/HIV Tg mice-expressing Nef alleles defective in Nef-PAK2 association [P69A, P72A/P75A, RR105/106AA, Δ 56-66 or G2A (myristoylation site)] failed to develop disease of the non-lymphoid organs (kidneys and lungs). Among these, only Tg mice expressing Nef^{P69A} and Nef^{G2A} showed some depletion of CD4⁺ T cells, although a downregulation of the CD4 surface protein was documented in all these Tg lines, except those expressing Nef ^{Δ 56-66}. Among other Tg mice expressing Nef mutants having conserved the Nef-PAK2 association (RD35AA, D174K, P147A/P150A, Δ 8-17, Δ 25-65), only Tg mice expressing Nef ^{Δ 8-17} develop kidney and lung diseases, but all showed partial CD4⁺ T cell depletion despite some being defective for CD4 downregulation (RD35AA, D174K). Therefore, Nef can activate murine PAK2 and associate with a small fraction of it, as in human cells. Such activation and binding of PAK2 is clearly not sufficient, but may be required to induce a multi-organ AIDS-like disease in Tg mice.

INTRODUCTION

Nef is an accessory protein of HIV and SIV, which has been found to be essential for high levels of viral replication and disease progression. The importance of Nef as a key factor for viral pathogenesis emerges from clinical and experimental observations. Isolated viruses from long-term non-progressor HIV-infected individuals were found to harbour mutated *nef* genes (1-5). Rhesus macaques infected with Nef-deleted SIV failed to develop disease (6-8). Finally, more recent studies showed that both HIV-1 and SIV Nef were necessary and sufficient to cause an AIDS-like disease in Tg mice (9,10).

Although the role of Nef for the viral life cycle and pathogenesis is not debatable, its functions at the molecular level are less understood. Several functions of Nef, discovered mainly from *in vitro* studies, have been reported [for reviews see refs (11-16)]. Nef was shown to enhance viral infectivity, a function involving its incorporation into the virus particle, where Nef is cleaved by the viral protease (17,18). Nef has also been shown to mediate downregulation of the cell surface expression of CD4 molecules (19,20), a function apparently independent of its role in enhancing viral infectivity (21). This downregulation of CD4 expression by Nef prevents superinfection and accelerates viral infectivity by enhancing HIV-1 replication (22-24). In addition, CD4 downmodulation facilitates increased release and spread of HIV *in vivo* with the consequent establishment of high virus loads (25-28). Additionally, it has been reported that Nef downregulates the expression of major histocompatibility complex class I, CD3 and CD28 surface molecules, upregulates Fas-ligand expression and alters the production of several cytokines, thus affecting the host immune responses (29-33). Finally, Nef has been shown to modulate cellular activation of T cell signaling pathways (9,34-37). However, the importance and the physiological relevance of each of these individual functions are poorly documented in lymphocytes, macrophages and dendritic cells (DCs), the natural targets of HIV-1 infection. Thus, Nef pathogenesis *in vivo* still remains unclear and requires further investigation.

Nef has been found to interact with a number of cellular protein kinases including members of the Src family of tyrosine kinases (38-42) as well as, yet unidentified serine/threonine kinase (43,44) and another serine/threonine kinase (45,46) known as Nef associated kinase (NAK) identified as a member of the p21-activated protein kinases (PAKs) family (47-49). Activation of PAK has been implicated in several cellular processes,

including reorganization of the cell cytoskeleton, MAP-kinase signaling cascades (50-52) and pro- as well as anti-apoptotic effects (53-55). The Nef-NAK association has also been implicated in increased virion infectivity (56). This interaction of PAK with Nef is a highly conserved feature of primary HIV-1 and SIV Nef alleles (57,58), suggesting that this association is important for Nef functions. Moreover, targeting Nef to the plasma membrane is critical to allow NAK association and its autophosphorylation (59-61). Among the PAK family members, PAK2 appears to preferentially associate with Nef (47,48), although PAK1 has also been described as the preferred binding partner (49). In addition, several studies, mostly using the SIV Nef allele, have linked this association to efficient pathogenesis and enhancement of viral infectivity (62,63). However, these observations were challenged by other studies showing that interaction of SIV Nef with PAK was not a prerequisite for SIV to achieve a high viral load and pathogenesis (59,64-66) (see below).

In the present, study we studied the binding of Nef to PAK in different subpopulations of primary immune cells of a small transgenic (Tg) animal model (CD4C/HIV) of HIV-1 pathogenesis developed in our laboratory (9). In these CD4C/HIV Tg mice, Nef expression in cells normally targeted for HIV-1 infection [immature and mature CD4⁺ T cells, macrophages and dendritic cells (DC)] leads to the development of a severe disease showing most of the characteristics of human AIDS, including immunodeficiency, preferential loss of CD4⁺ T cells, thymic atrophy, activation of T and B cells, loss of germinal center formation, as well as lung (lymphocytic interstitial pneumonitis), heart and kidney (tubulointerstitial nephritis, segmental glomerulosclerosis, microcystic dilatation) diseases. The notion that Nef has an effect on altering the signaling machineries, through a PAK-dependent pathway, in different subpopulations of the immune cells and thus favours the development of an AIDS-like disease in Tg mice presents an attractive possibility.

We demonstrate here that Nef binds and activates PAK2 in the three major immune cells expressing the transgene (thymocytes, macrophages and DC). In addition, since several motifs of Nef have been reported to be important for this association, we carried out *in vivo* evaluation of some of the domains disrupting this interaction, using a mutational analysis of Nef. We evaluated Nef/NAK interaction or PAK activation in tissues of Tg mice expressing 10 different Nef mutants, 5 of which abrogating Nef/NAK interactions.

MATERIALS AND METHODS

Transgene construction and generation of Tg mice. The Nef^{P69A}, Nef^{RR105/106AA} and Nef^{P147A/P150A} - mutants were constructed by replacing the amino acids at positions P69, RR105/106 and P147/P150 of the Nef protein to alanine residues. These mutations were produced by using a two-step PCR site-directed mutagenesis, on a SacI-BamHI HIV-1 (strain NL4-3) Nef fragment subcloned in pBS-KS vector, using primer 647 (5-GTGTGACTGCAAAACCCAC-3) containing G to C mutation at nt 8991, to produce P69A, primer 1024 (5-GGATATCTTGTGCTGCTTGGGAGTGAA-3) containing CT to CG mutations at nt 9099 and 9102, to produce RR105/106AA mutations, primer 624 (CCTTATCTGCCTCAACTGCTACTAG) containing C to G mutations at nt 9225 and 9234, to produce P147A/P150A mutations, respectively. The mutations were confirmed by sequencing and the SacI-BamHI fragment was incorporated into the transgene CD4C/HIV^{MutG} (now designated CD4C/HIV-Nef^{WT}) DNA backbone used in our previous study (9), to replace the wild-type (wt) *nef* sequences and thus generate the CD4C/HIV-Nef^{P69A}, CD4C/HIV-Nef^{RR105/106AA} and CD4C/HIV-Nef^{P147A/P150A} DNAs. The DNA transgenes were purified and inoculated into 1-day old (C57BL/6 X C3H)F₂ embryos to generate Tg mice as described (9). The CD4C/HIV-Nef^{RD35AA} and CD4C/HIV-Nef^{D174K} were constructed in a similar fashion (67). The CD4C/HIV-Nef^{G2A}, CD4C/HIV-Nef^{Δ8-17}, CD4C/HIV-Nef^{Δ25-35}, CD4C/HIV-NefNef^{Δ57-66} and CD4C/HIV-Nef^{P72AxxP75A} transgenes were described previously (68,69). Tg lines with mice expressing Nef at an equal or higher level than that of CD4C/HIV-Nef^{WT} were kept and bred for further analysis, while these founder lines that expressed Nef at lower levels were discarded. A minimum of two expresser Tg founders was produced and lines were established from each one by breeding as heterozygotes on the C3H background for 3 to 7 generations.

Northern blot analysis - Northern blot analysis was carried out on 10 μg of total RNA from different tissues, using ³²P-labeled HIV-1 probe, as previously described (9).

Antibodies - Rabbit anti-HIV Nef antisera were raised against purified GST-HIV Nef fusion protein, as described (9). Anti-β-PIX/COOL and p95PKL were produced in rabbits immunized with purified GST/β-PIX⁴⁵⁰⁻¹⁵⁴³ and GST/p95PKL⁴⁷⁻⁹⁴⁰, respectively. Anti-actin and rabbit anti-αPAK (C-19) or goat anti-γPAK antibodies (V-19) were from Sigma and

Santa Cruz Biotechnology, respectively. The latter were used to immunoprecipitate PAK2. Specific antibodies against PAK1, PAK2 and PAK3 have previously been described (47).

Western blot analysis - Protein expression was assessed by Western blot analysis of lymphoid organs from different founders using rabbit anti-Nef antisera as described previously (9). Briefly, cells were extracted in RIPA buffer (0.5% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100, 0.1% SDS in PBS) containing protease inhibitors aprotinin (2 $\mu\text{g/ml}$), pepstatin (1 $\mu\text{g/ml}$), N-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (50 $\mu\text{g/ml}$) and leupeptin (2 $\mu\text{g/ml}$). Cell extracts (~100 μg) were loaded on SDS-10% polyacrylamide gel and blotted on PVDF immobilon-P membrane (Millipore). Membranes were blocked overnight in 5% skim milk-0.1% Tween 20 (Sigma) in TBS at 4°C. Blocked membranes were incubated with the anti-Nef antisera (1:1000), anti-actin (1:2000) or anti-PAK2 (V-19) antibodies, for 2 hours at room temperature and washed with 5% skim milk-0.1% Tween 20. Proteins were visualized by incubating the membranes with secondary antibodies coupled to Alexa 680 fluorochrome followed by scanning with Odyssey[®] infrared imaging system (Licor) for all experiments except the one shown in Fig. 2B. In this latter experiment, the membrane was incubated for 1hr with the secondary reagent rabbit IgG TrueBlot[™] (1:1000) (eBioscience) and the Nef protein was subsequently revealed using enhanced chemoluminescent horse-radish peroxidase substrate ECL (Perkin Elmer), as described previously (9).

Preparation of peritoneal macrophages - Peritoneal macrophages were harvested by injecting 10 ml of fresh media (ISCOVE supplemented with 10% FBS) into the peritoneal cavity of the animals followed by plating on Petri dishes (Falcon) for 3 hrs. The attached macrophages were washed 3 times with PBS and lysed with ice-cold lysis buffer for subsequent assays.

In Vitro Kinase Assay (IVKA) - Cells were lysed in Kinase Extraction Buffer (KEB) (1% NP-40, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glycerol, 2 mM EDTA and 137 mM NaCl) containing protease [aprotinin (2 $\mu\text{g/ml}$) and leupeptin (2 $\mu\text{g/ml}$)] and phosphatase [sodium orthovanadate (0.37 $\mu\text{g/ml}$) and sodium fluoride (0.04 $\mu\text{g/ml}$) inhibitors. Equal amount of proteins were used for all the IVKA reactions and quantification of proteins was done using the colorimetric microBCA assay. For immunoprecipitation, anti-Nef or anti-PAK antibodies were added to 250 μg of thymocyte lysates or 100 μg of macrophage lysate and incubated overnight. Protein G-coupled agarose beads (Pharmacia) (50 μl) were then added and the pellets were washed 3 times with the KEB buffer and once with the kinase activation

buffer (KAB) (1% Triton, 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl₂ and 2 mM sodium orthovanadate). The IVKA reaction were performed in 50 μ l containing 10 μ Ci of [γ -³²P]ATP for 5 min at room temperature and the pellets were washed once with KEB and resuspended in 2X SDS-loading buffer. The samples were separated by SDS-PAGE and phosphorylated proteins visualized by autoradiography.

Immunodepletion experiments - Thymocyte or macrophage extracts (250 μ g or 100 μ g, respectively) from Tg and non-Tg animals were first immunoprecipitated with the anti-Nef polyclonal serum. Protein G beads were pelleted and the supernatant was reimmunoprecipitated for a second round with the anti-Nef serum. Protein G beads were pelleted again and a final immunoprecipitation with the anti-PAK2 (V-19) or anti- β -PIX/COOL Ab was carried out. All the immunoprecipitations were performed for 6 hours to overnight and kept at 4 °C until kinase assay was started.

Semiquantitation of bound/unbound PAK2 or β -PIX to Nef. Following immunoprecipitation and IVKA, the samples were submitted to SDS-PAGE, exposed on PhosphorImager screen and scanned with the Storm® Imaging unit (Amersham Biosciences). Semiquantitation of the fraction of PAK2 or β -PIX unbound to Nef was estimated with the Imagequant software (Amersham Biosciences). A ratio of the phosphorylated p85/p95 signal present in the anti-Nef immunoprecipitate over the total signal of the p85/p95 phosphorylated signal present in all the immunoprecipitates (immunodepletion with anti-PAK2 or anti- β -PIX in addition to the anti-Nef immunoprecipitation) was calculated.

³⁵S-labeling procedure - Thymocytes (5 X 10⁶ cells/ml) were incubated in methionine/cysteine-free RPM1 + FCS medium with ³⁵S-labeled methionine/cysteine-mix (Perkin Elmer) (100 μ Ci) for 4 hrs. Cells were then washed with PBS and lysed in RIPA buffer, essentially as previously described (70).

Phosphoamino acid analysis - Phosphorylated proteins were cut off from the PVDF membrane and then incubated for 1 h at 110 °C in 5.7 N HCl, for acid hydrolysis. Electrophoresis was performed on thin layer cellulose plate in pH 1.9 buffer (2.2% formic acid, 7.8% acetic acid) at 1.5 KV for 20 min., as described (71).

Limited in-gel digestion assay - Thymocyte extracts (250 μ g) were immunoprecipitated with either an anti-Nef or an anti- β -PIX/COOL polyclonal serum followed by an IVKA and SDS-PAGE. The p95, p85 and immunoglobulin phosphorylated substrates were cut off from the dried gel and reloaded in the wells of a 14% polyacrylamide gel. The gel pieces were

allowed to rehydrate in equilibration buffer (125mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 0.3% 2-mercaptoethanol) for 15 min and 2 μ g of V8 peptidase (Sigma) or 500 ng chymotrypsine (Sigma) diluted in equilibration buffer was added to the samples immediately before starting electrophoresis. The migration was done at room temperature and was stopped for 30 min (when the dye front reached the bottom of the stacking gel) to allow digestion to proceed. The migration was then continued as usual. Digested products were visualized by autoradiography.

Flow Cytometry and Cell sorting - Flow cytometry was performed on a Becton Dickinson FACScan using antibodies against various cell surface markers, as described previously (9,68,69,72): CD4, CD8, TcR $\alpha\beta$ and Thy1.2 for T cells and B220, Mac-1 for B cells and macrophages, respectively and CD44, CD25, CD69, CD45RB, CD62L for T cell naive/activation phenotype. Apoptosis was assessed by 7-amino-actinomycin D and annexin V (FITC-labeled)/propidium iodide (PI) staining as previously described (73).

Histological analysis - A group of 15-20 Tg animals and an equivalent number of non-Tg littermates were generated from each line and observed for signs of disease (hypoactivity, ruffled hair, respiratory problems). Mice were sacrificed and lymphoid and non-lymphoid organs were collected and embedded in paraffin blocks. Sections (5 μ m) were processed for microscopic and histological assessment, essentially as previously described (9,68,69). Semiquantitation assessment of the histological phenotypes was done as previously described (67).

RESULTS

NAK activity is present in thymocytes, macrophages and dendritic cells (DC) of CD4C/HIV^{Nef} Tg mice - We evaluated the association of Nef with NAK and its subsequent activation by an *in vitro* kinase assay (IVKA) performed on total lysates from thymocytes, macrophages and DC. These three populations of cells express Nef in CD4C/HIV^{Nef} Tg mice (Fig. 1A). Nef was immunoprecipitated with associated proteins using polyclonal anti-Nef serum followed by IVKA and phosphorylated substrates were visualized by SDS-PAGE and autoradiography. This analysis showed the presence of major phosphorylated proteins of ~62, 85 and 95 kDa in lysates from Tg cells, while these were not detectable in extracts from non-Tg cells (Fig. 1B). Some phosphorylated proteins were sometimes more apparent in specific cell types. For example, the p62 species, most likely a

PAK member (see below), was best detected in Tg DC and macrophages, although with variations among experiments (Fig. 1B), but was barely detectable in Tg thymocytes. The amount of phosphorylated p62 in Tg tissues was low in comparison to that previously observed in cell culture studies (48,74,75). Phosphoamino acids analysis demonstrated that the majority of the phosphorylation of the p62/p95/p85 species occurred on serine residues (Fig. 1C), indicating that murine NAK, like its human and simian homologues (47,48,56,59,64,65,74) is a serine-threonine kinase. These results indicated that Nef binds to a murine serine kinase in primary immune cells of Tg mice.

By analogy to the human protein kinase interacting with Nef, which was previously reported to be PAK, the murine NAK detected in Tg cells share several similarities with PAK. However, we have been unable to demonstrate an association of Nef with PAK, after immunoprecipitation with anti-Nef Ab followed by Western blot analysis with anti-PAK Ab (data not shown), suggesting that this association is transient or that only a small fraction of PAK may bind to Nef (see below). Such negative data are consistent with results of other groups, which have experienced similar findings, even in conditions of PAK overexpression (47,63,76).

PAK2 is selectively activated by Nef in target cells of CD4C/HIV Tg mice - Contradictory evidences have been reported as to whether human PAK1 or PAK2 interacts with Nef (47-49). The identity of the mouse PAK family member associated by Nef *in vivo* was examined. IVKA were performed on lysates from Nef expressing thymocytes, macrophages and DC after immunoprecipitation with antibodies interacting specifically with each PAKI family member, PAK1, PAK2 and PAK3 (47). Only PAK2 was found to be activated by Nef in the three Tg cell populations tested (thymocytes, macrophages and DC) (Fig 2A). The profiles of phosphorylated proteins immunoprecipitated with anti-PAK2 Ab were similar in each cell population. The majority of the phosphorylated protein was represented by the p95 and p85 species. In addition, these profiles were similar to those obtained when IVKA was carried out following anti-Nef Ab immunoprecipitation (Fig. 2A, lane 1). Notably, the expression of Nef in Tg thymocytes, macrophages and DC resulted in a significantly increased phosphorylation level of the kinase substrates following IVKA, compared to the levels observed in non-Tg cells (compare lanes 1, 6, 12, 19 vs 2, 5, 11, 20). These results show that Nef expression in primary mouse immune cells leads to PAK2 activation and suggest that the serine-threonine kinase interacting with Nef is mouse PAK2.

To determine the fraction of activated NAK bound to Nef in Tg thymocytes and macrophages, we performed IVKA on cell extracts preceded by two or three cycles of immuno-depletion with anti-Nef Ab. Controls for efficiency of immunodepletion by Western blotting showed that Nef was barely detectable after the first cycle of immunodepletion (Fig. 2B). Despite this pre-treatment, subsequent immunoprecipitation with anti-PAK2 Ab revealed readily detectable increase of activated PAK2 in Tg compared to non-Tg cells (Fig. 2C). Semiquantitation of radioactive signals from these IVKA experiments revealed that a substantial portion of the total activated PAK2 is not bound to Nef compared to the bound one (not bound: ~75% for thymocytes and ~60% for macrophages). The PAK activity was barely detectable in non-Tg cells, suggesting that this activation was specifically due to the expression of Nef. These results suggest that a high proportion of the activated PAK2 is not stably associated with Nef in Tg cells. In addition, a reverse experiment, involving immunodepletion with anti-PAK2 Ab followed by immunoprecipitation with anti-Nef Ab, showed that a substantial fraction (~90%) of Nef was associated with PAK2 in Tg macrophages (Fig. 2C).

Characterization of the Nef/NAK complex - Several investigators have identified the Nef-interacting p62 phosphoprotein as PAK2, a human PAK family member (46-48,74). PAK2 has been shown to associate with β -PIX/COOL (77,78), while the p85 phosphorylated NAK substrate was identified as PIX in Nef immunoprecipitates (74). However, the identity of the phosphorylated substrates of NAK in murine primary cells is not known. In order to determine the identity of the phosphoproteins present in the Nef/NAK complex which serve as substrates of NAK, we performed immunoprecipitations with antibodies raised against β -PIX/COOL proteins known to be present in PAK complexes (77-79), followed by IVKA on thymocyte or macrophage extracts from Tg and non-Tg mice. Similar phosphorylation profiles to those seen with the anti-Nef or anti-PAK-2 Abs were observed with anti- β -PIX/COOL Ab (Figs. 3A, B). In addition, as observed with the anti-PAK2 and anti-Nef Ab immunoprecipitations, the levels of phosphorylated proteins immunoprecipitated with the anti- β -PIX/COOL Ab were much higher in Tg than in non-Tg cells (Figs. 3A, B), suggesting that the kinase associated with β -PIX/COOL in Tg thymocytes and macrophages is activated. Furthermore, an immuno-depletion experiment carried out using anti-Nef Ab showed that a significant proportion of β -PIX/COOL not associated with Nef was present in the remaining supernatant of Tg thymocytes (82%) and macrophages (40%) (Fig. 3C). This

result strongly suggests that the majority of the β -PIX/COOL proteins are not stably associated with Nef in Tg cells. A reverse experiment involving immunodepletion with anti- β -PIX/COOL Ab followed by immunoprecipitation with anti-Nef Ab, showed that a major proportion (~86%) of Nef was associated with β -PIX/COOL in Tg macrophages (Fig. 3C).

To further characterize the p85 and p95 phosphorylated substrates, a limited digestion with the *Staphylococcus aureus* V8 peptidase or chymotrypsin was performed on these two ^{32}P -labeled purified substrates produced by IVKA from the anti-Nef or anti- β -PIX immunoprecipitates. Comparison of the digestion patterns of both p85 and p95 substrates from the anti-Nef or anti- β -PIX immunoprecipitation revealed similarities except for one major digestion product observed in the V8-digested p85 substrate (Fig. 3D). In addition, comparison of the digestion patterns from the immunoprecipitation with an anti-Nef and anti- β -PIX/COOL sera shows strong similarity of the digested fragments from each immunoprecipitate. Together, these results suggest that the p85 and p95 substrates represent the same protein species (β -PIX/COOL) being differently phosphorylated and present in both anti-Nef and anti- β -PIX/COOL complexes. Our finding that the same substrate is present in both anti-Nef and anti- β -PIX/COOL complexes supports the notion that β -PIX/COOL is a member of the Nef-NAK complex.

Mutations of Nef abolishing PAK2 binding and activation also impair their in vivo pathogenicity - Contradictory studies on the role of the Nef-associated PAK activation in AIDS pathogenesis have been published. In the SIV model, several studies showed that this association was dispensable (59,64-66), while others claimed that it was critical (62,63), for the development of SAIDS in rhesus macaques. Given this controversy and to get a better understanding of the impact of PAK2 activation in the development of the AIDS-like phenotypes in CD4C/HIV Tg mice, we studied Tg mice expressing two different Nef mutations (Nef^{P69A} and Nef^{RR105/106AA}), previously reported to disrupt Nef-PAK binding and to abolish PAK activation (46,60). The Nef^{P69A} mutation was previously shown to abolish PAK binding without affecting other Nef functions, notably its binding to Hck (60). However, the RR105/106 residues have been found to be involved in Nef dimerization/oligomerization (80), and in CD4 downregulation and in enhancement of viral infectivity (56,81). We also included an additional mutant, Nef^{P147A/P150A}, harboring a conserved proline-rich motif originally thought to contribute to SH3 binding (41).

The Nef^{P69A} and Nef^{RR105/106AA} and Nef^{P147A/P150A} mutants were expressed in Tg mice under the CD4C regulatory elements to generate CD4C/HIV-Nef^{P69A}, CD4C/HIV-Nef^{RR105/106AA} and CD4C/HIVNef^{P147A/P150A} Tg mice, respectively (Fig. 4A). Independent Tg lines from each Nef mutant (Nef^{P69A}: F62331, F62335, F62337; Nef^{RR105/106AA}: F93319, F95139; Nef^{P147A/P150A}: F59063, F61937) were established by breeding on the C3H background.

Transgene expression, evaluated by Northern (Fig. 4B) and Western (Fig. 4C) blot analysis, revealed specific expression of Nef RNA in the lymphoid tissues (with more expression in thymus than in LN and spleen), but not in non-lymphoid tissues (e.g. kidney, and data not shown). Levels of Nef protein expression in the thymus correlate with RNA expression levels: F62337 > F62335 > 62331 for Nef^{P69A} Tg mice, F95139 > F98769 for Nef^{RR105/106AA} and F59063 > F61937 for Nef^{P147A/P150A}. Mice from founders that expressed mutated Nef at comparable (F62331, F62335, F93319 and F61937) or higher (F62337, F95139 and F59063) protein levels than Nef^{WT} of CD4C/HIV^{Nef} Tg mice were selected for comparative studies, since both the incidence and progression of the AIDS-like disease in CD4C/HIV^{Nef} Tg mice was previously shown to correlate well with the level of Nef expression (9).

We first confirmed that the Nef-NAK association was disrupted and that PAK activation was abolished as expected in two different subpopulations (thymocytes and macrophages) of these Nef^{P69A} and Nef^{RR105/106AA} Tg mice but not in those of the Nef^{P147A/P150A} Tg mice (Fig. 5A). We then confirmed that PAK activation was abolished, by using IVKA on PAK2 immunoprecipitates of lysates from both Tg thymocytes and macrophages (Fig. 5B). To confirm that the anti-Nef polyclonal Ab could immunoprecipitate the mutant Nef proteins showing no binding to NAK, we performed anti-Nef immunoprecipitations on [³⁵S]-methionine-labeled thymocytes. This experiment showed that the Nef mutant proteins in Tg thymocytes had retained their ability to be recognized by the anti-Nef Ab used in these IVKA experiments (Fig. 5C).

The progeny of each Tg line were routinely monitored for the presence of signs of disease (wasting, edema, diarrhea, ruffled hair, hypoactivity, early death). None of these clinical features developed in these Nef^{P69A}, Nef^{RR105/106AA} and Nef^{P147A/P150A}-expressing Tg lines during the 12-month observation period.

Total cell numbers in lymphoid organs of CD4C/HIV-Nef^{P69A} Tg mice were decreased while those of CD4C/HIV-Nef^{RR105/106AA} Tg mice were in the range of control non-Tg mice (Table 1). In CD4C/HIV-Nef^{P147A/P150A}, total thymocytes were also depleted significantly but the peripheral lymphoid cells were not (Table 1). FACS analysis, performed on thymocytes and on cells from peripheral lymphoid organs (spleen and LN), using T-cells (CD4, CD8, Thyl.2, TcR), B-cell (B220) and macrophage (Mac-1) specific markers showed that cells from CD4C/HIV-Nef^{RR105/106AA} Tg mice appeared normal. However, this analysis revealed a lower number of CD4⁺ T cells in the thymus and peripheral organs of CD4C/HIV-Nef^{P69A} Tg mice, but only in the thymus of CD4C/HIV-Nef^{P147A/P150A} Tg mice compared to non-Tg mice (Figs. 6A, B, Tables 1-3). Depletion of CD4⁺ T cells correlated with the level of Nef protein expression. This analysis also demonstrated a partial downregulation of cell surface CD4, compared to non-Tg controls, both on thymocytes and on CD4⁺ T cells of peripheral organs. This effect was mainly seen in CD4C/Nef^{P69A} and CD4C/HIV-Nef^{P147A/P150A} Tg mice but was less obvious in CD4C/HIV-Nef^{RR105/106AA} Tg mice (Figs. 6A, B, Tables 1-3).

Because Tg CD4⁺ T cells expressing Nef^{WT} exhibit an activated phenotype (72) and because the interaction between Nef and NAK may be important for this Nef mediated cellular activation, we asked whether the abrogation of Nef/NAK activation would affect T cell activation. The activation status of the peripheral Tg CD4⁺ T cells was analyzed by FACS, by staining for CD69, CD44, CD45RB, CD62L and CD25 activation markers. Expression of these markers on CD4⁺ T cells expressing Nef^{RR105/106AA} was comparable to that expressed on non-Tg CD4⁺ T cells (Fig. 6C), suggesting that disruption of Nef/NAK association may affect their expression. However, a higher proportion of Tg Nef^{P69A}-expressing CD4⁺ T cells constitutively expressed CD69 and CD25, as compared to those of non-Tg littermate controls (Fig. 6C). A larger proportion of these Tg Nef^{P69A} CD4⁺ T cells also appeared to exhibit an activated/memory-like phenotype, being CD44^{hi}, CD45Rb^{low} and CD62L^{low}-positive, thus indicating that T cell activation is independent from Nef/NAK interaction. A similar analysis of the mice expressing Nef^{P147A/P150A} showed similar activation (Fig. 6C).

We have shown that CD4⁺ T cell depletion is associated with enhanced apoptosis in CD4C/HIV Tg mice (73). PAK2 phosphorylation of Bad has been reported to abrogate its proapoptotic effect and increase cell survival (54). To determine whether the loss of

Nef/PAK2 association would affect T cell death, we measured apoptosis of lymphoid T cells by FACS, staining with annexin V/PI or 7AAD. The proportion of 7AAD⁺ (apoptotic/dead cells) CD4⁺ T cells was enhanced in Nef^{P69A} and Nef^{P147A/P150A} Tg mice, but to a lesser extent than in Nef^{WT} Tg mice (Fig. 6D). However, CD4⁺ T cells from mice expressing Nef^{RR105/106AA} mutant did not show the enhanced apoptotic/death phenotype (Fig. 6D) usually associated with expression of Nef^{WT} (73).

We next examined organs of Tg mice for signs of pathological changes. Histological examination of non-lymphoid organs (kidney, intestine, liver, lungs) of CD4C/HIV-Nef^{P69A}, CD4C/HIV-Nef^{RR105/106AA} and CD4C/HIV^{P147A/P150A} Tg mice showed no significant differences between the Tg and non-Tg animals (data not shown). In CD4C/HIV-Nef^{P69A} Tg mice, a partial disruption of the cortico-medullary junction of the thymus (4/16 and 4/17 Tg mice, respectively), a disturbed architecture of spleen (3/16 and 1/17 Tg mice, respectively) and LN (3/16, 4/17 Tg mice, respectively) were observed (data not shown). Such changes in lymphoid organs were only rarely noted and were very mild in CD4C/HIV-Nef^{RR105/106AA} Tg mice. Therefore, these results suggest that the PAK2 association may be required for the development of the multi-organ disease of CD4C/HIV Tg mice, but not for CD4 downregulation. Regarding the CD4⁺ T cell loss, results from one mutant (P69A) indicated that the Nef/NAK interaction was not necessary for at least partial loss, while those from the other mutant (RR105/106AA) showed that it might be required.

PAK2 activation is not sufficient for the development of a multi-organ disease in CD4C/HIV Tg mice -Although the previous results from Tg mice expressing Nef^{P69A} or Nef^{RR105/106AA} suggested that PAK2 activation might be required for the development of lung and kidney diseases in Tg mice, they did not indicate whether such activation was sufficient. To further investigate this possibility, we measured Nef-associated PAK2 activity by IVKA in immune cells of additional Nef mutant Tg mice. These included 3 deletion mutants (Nef^{Δ8-17}, Nef^{Δ25-65}, Nef^{Δ56-66}) and other mutants which affected CD4 downregulation (Nef^{RD35AA}, Nef^{D174K}) or disrupted the myristoylation site (Nef^{G2A}) or the proline-rich regions (Nef^{P72AxxP75A}, Nef^{P147AxxP150A}) of Nef. A description of Tg mice expressing Nef^{P72AxxP75A}, Nef^{Δ8-17}, Nef^{Δ25-65} and Nef^{Δ56-66} has previously been published (68,69). A more complete description of the other Tg mutant lines was reported separately (67).

Three of these Nef mutant proteins (Nef^{G2A}, Nef^{P72AxxP75A} and Nef^{Δ57-66}) did not associate with NAK while the others (Nef^{Δ8-16}, Nef^{Δ25-65}, Nef^{RD35AA}, Nef^{D174K} and

Nef^{P147xxP150}) did (Figs. 7A,B). The results for the P72AxxP75A and G2A Nef mutants confirmed previous studies in human (60-62) and rodent (82) cell lines. Again, to confirm that the absence of Nef/NAK interaction did not result from the failure of the anti-Nef Ab to immunoprecipitate these mutant Nef proteins, we performed immunoprecipitation on extracts from [³⁵S]-methionine labeled thymocytes (Fig. 7C). This experiment confirmed that the immunoprecipitations of two of the Nef mutants, expressed in Tg thymocytes were comparable to that of Nef^{WT} in these conditions (Fig. 7C). For each Nef mutant, the activation of PAK2 was also examined after immunoprecipitation with an anti-PAK2 Ab and IVKA (Fig. 7D). The mutants capable to associate with NAK showed a comparable level of PAK2 activity as the one seen in Nef^{WT} Tg mice (Fig. 7D). Semi-quantification assessments of radioactive signals from these IVKA experiments showed that the levels of phosphorylated substrates in the Nef^{RD35AA}, Nef^{D174K} and Nef^{WT} Tg thymocytes were 6, 12 and 5 fold higher than those found in non-Tg controls, respectively (Fig. 7D). This indicates that the increased PAK2 activity is due to the expression of Nef in Tg thymocytes. In contrast, PAK2 activity was not enhanced in Tg cells expressing one of the mutant (Nef^{G2A}) which did not associate with NAK (Figs. 7A,D).

Interestingly, among the Nef mutants having conserved PAK2 activation capability, some Tg mice (CD4/HIV-Nef^{Δ8-16} and CD4C/HIV-Nef^{D174K}) develop lung and kidney diseases, while others (CD4C/HIV-Nef^{Δ25-65}, CD4C/HIV-Nef^{RD35AA} and CD4C/HIV-Nef^{P147xxP150}) did not (67,68), indicating that the presence of NAK in T cells and macrophages is not sufficient by itself to elicit organ disease in Tg mice.

Attempts to correlate the Nef/NAK interaction with CD4⁺ T cell depletion were also made. This analysis indicated that such interaction, absent in Nef^{P69A}-expressing, was not required for CD4⁺ T cell depletion observed in these Tg mice. However, in each mutant Tg line in which NAK activity was present (Nef^{Δ8-17}, Nef^{Δ25-65}, Nef^{RD35AA}, Nef^{D174K} and Nef^{P147xxP150}) CD4⁺ T cell depletion also occurred, suggesting that complex formation between Nef and NAK may have a negative impact on CD4⁺ T cell fate. A summary of the phenotypes observed in these mutants is shown in Table 4.

DISCUSSION

Nef/PAK2 association in murine cells - We used a mouse model of AIDS, the CD4C/HIV Tg mice, to study the binding of Nef to the PAK family members and their activation. Our data demonstrate that Nef expression in all murine primary Tg cells tested (thymocytes, macrophages and DC), specifically activates PAK2, but not PAK1 nor PAK3. In addition, we showed that Nef associates, in these Tg target cells, with a serine kinase which is likely to be PAK2. The association is non-stoichiometric as only a small fraction of PAK2 was found to bind to Nef, thus preventing its unambiguous identification by a co-immunoprecipitation approach. The difficulty in detecting a Nef/PAK association has also been a recurring problem in human cells, even in conditions of overexpression of tagged proteins (47,48,75). This suggests that the Nef-PAK interaction is transient or weak, or alternatively that only a small subpopulation of PAK2 molecules can bind to Nef. In fact, Renkema et al. have demonstrated in established cell line that NAK represents a distinct subpopulation of PAK2 with high kinase activity (75). This group recently showed that the Nef-PAK2 association was more stable with a kinase-dead PAK2 mutant, suggesting that the PAK2 kinase activity is involved in destabilizing the complex (76). Considering that Nef binds and activates PAK2 in mouse and human cells, the catalytic activity of PAK2 is also likely to promote dissociation of the Nef-PAK2 complex in murine cells, as it was reported in human cells (76).

However, several lines of evidence suggest that the detected Nef-associated kinase (NAK) in Tg murine cells is indeed PAK2. First, NAK primary phosphorylates serine residues, as PAK2 (83). Second, following anti-Nef or anti-PAK2 immunoprecipitations, the substrates of the IVKA not only show a similar pattern of phosphorylation, but also have a similar phospho-peptide fingerprint. Third, these phosphorylated substrates (obtained by IVKA following immunoprecipitation with anti-Nef or anti-PAK2) are also similar to those obtained after immunoprecipitation with anti- β -PIX/COOL, a known partner of PAK (77-79,84) and a known phosphorylated partner of the Nef-PAK complex in human cells (74). Fourth, the Nef mutants which have been shown to disrupt the association of Nef with human PAK2 were also found to disrupt the association with murine NAK. Therefore, Nef appears to activate PAK2 and to associate with a small fraction of it. It still remains to be determined whether Nef binding to PAK2 requires activation of PAK2, as recently shown in

human cells (76), or whether binding itself of Nef to PAK2 leads to PAK2 activation and how.

Our findings confirm previous studies with Nef expressed in primary and established human cell lines (47,48,74,76), and extend them to murine cells. It remains unclear why some investigators identified PAK1 as a partner of Nef in human cells (49). It is of interest to note that the association of Nef with only one of the several members of the PAK family is a conserved property in human and mouse cells. In fact, sequence comparison of the mouse and human PAK2, showed that both molecules are highly homologous with only a few distinct changes. Among these amino acid substitutions is the absence of the caspase-3 cleavage site in the murine sequence (53), indicating that cleavage of PAK2 at this site by caspase-3 is not essential for the induction of Nef-mediated phenotypes in murine cells.

After IVKA following immunoprecipitation with anti-Nef, the levels of autophosphorylated p62 PAK2 are low, compared to what has been reported by some investigators (48,74,75). The reason for this is not clear. One explanation could be that most of the PAK2 phosphoacceptor sites susceptible to autophosphorylation may already be phosphorylated in Tg mice. Second, the cell type studied may influence this phosphorylation pattern. Our study was performed on primary T cells, macrophages and DC, in contrast to previous work performed with established immortalized cell lines. We already noticed that the intensity of the p62 band was generally stronger in macrophages than in thymocytes. Finally, the Nef allele used here (NL4-3) is already known to give a weaker autophosphorylation signal relative to other Nef alleles in human cells. In these studies, Nef association with the serine/threonine kinase was found to be viral isolate-dependent. In particular, the p62 phosphorylated species (presumably resulting from autophosphorylation) in the anti-Nef immunoprecipitate from cells infected with the NL4-3 strain of HIV-1 was weaker than that from cells infected with other strains (SF2, 248, 8161, 13127) (48,65,76,85,86). Nevertheless, two major phosphorylation substrates could be recognized in these anti-Nef precipitates subjected to IVKA. These proteins are part of the Nef complex with PAK2. Our results suggest that they could represent β -PIX/COOL, a protein which has been reported to interact with PAK2 (77,78) and other PAK family members (79,84), and to be part of the Nef-PAK complex (74) in human cells. Thus, Nef appears to be part of a multi-protein complex containing at least PAK2 and β -PIX/COOL. This complex may also contain p95 paxillin kinase linker (PLK) which has been found in

the PAK2/ β -PIX complex (77,78). Using rabbit anti-PKL antibodies followed by IVKA, we indeed observed a similar pattern of phosphorylated substrates in Tg thymocytes, although of lesser intensity, as those generated with anti-Nef, anti-PAK2 or anti- β -PIX/COOL Ab (data not shown). The assembly of this complex appears to be dependent on Nef targeting to the plasma membrane and may require other N-terminal Nef domain(s) (aa 57-66) for interaction, since NAK activity was completely absent in thymocyte lysates from the CD4C/HIV-Nef^{Myr-} and CD4C/HIV-Nef ^{Δ 57-66} Tg mice. These results are consistent with published data on the requirement of targeting of Nef to the lipid rafts for its mediated activation of PAK and for other functions (46,61,76).

The consequences of PAK2 activation by Nef in Tg cells could be multiple. In other biological context, the activation of PAK has been shown to enhance virus production as a result of induction cytoskeleton rearrangement (34,87). Such effect could not be evaluated in the Tg model studied. Myc has recently been shown to specifically activate PAK2 (88), as Nef does. It is therefore possible that Nef may share some pathway of activation with c-myc. Finally, PAK2 (54) and Nef/NAK (89) -mediated phosphorylation of Bad has been shown to abrogate its proapoptotic activity. Although, this may represent one mechanism by which Nef could enhance survival of some cell populations, it does not appear to be the case for murine CD4C/HIV Tg CD4⁺ T cells which showed enhanced apoptosis (73), including those expressing Nef^{P69A} (Fig. 6D), a mutant which has lost the ability to bind to and to activate PAK2

Nef activation of PAK2 is not sufficient for the development of Nef-induced AIDS-like disease - Previous *in vitro* work on the effects of Nef/PAK association on Nef-induced infectivity enhancement has been controversial (56,65). Similarly, *in vivo* studies in rhesus macaques infected with SIV strain carrying a mutation in the PxxP motif led to discordant results regarding the role of NAK/Nef association in disease progression (59,62,63,66). Since the P72A/P75A mutation affects not only the binding of Nef to PAK2, but also is known to abrogate its association with the src-family members, in particular hck (41), conclusions about the involvement of PAK activity in HIV or SIV pathogenesis with this single mutant may be difficult.

To evaluate the contribution of enhanced Nef-induced PAK2 activity in the pathogenesis of the AIDS-like disease in CD4C/HIV Tg mice, we studied several mutants of Nef, some of them defective in PAK2 association. In addition, we correlated the ability of

these Nef mutants to activate and bind to PAK2 with their ability to induce different phenotypes *in vivo* in Tg mice. Regarding the T-cell phenotype, this mutational analysis clearly indicated that PAK2 activation was dispensable for the Nef-mediated downregulation of CD4 cell surface molecule, some mutants (Nef^{G2A}, Nef^{P72A/P75A}, Nef^{P69A}) with no PAK2-inducing capacity still remaining active at causing CD4 downregulation. This conclusion is in agreement with results in human cells showing that Nef association with p62 kinase does not correlate with its effect on CD4 downregulation (81).

This study also demonstrated that CD4⁺ T-cell loss occurred in each Tg line expressing a Nef mutant competent in binding PAK2 (Nef^{Δ8-17}, Nef^{Δ25-65}, Nef^{RD35AA}, Nef^{D174K}, Nef^{P147A/P50A}), but not in CD4C/HIV-Nef^{RR105/106AA} Tg mice defective in PAK2 activation, suggesting a positive contribution of PAK2 association in CD4⁺ T-cell loss. However, results from another mutant (Nef^{P69A}) indicated that CD4⁺ T-cell activation, depletion and apoptosis can occur in absence of Nef-induced PAK2 activation. Because of the nature of this latter mutation (P69A), it is possible that conformational changes favour binding to new effectors, thus bypassing the requirement for PAK2 activation in cells expressing this Nef^{P69A} mutant. In fact, different Nef alleles may induce CD4⁺ T-cell loss through distinct mechanisms, some of which may be dependent on PAK2 activation, while others may be independent. Further studies will be needed to test this hypothesis.

Second, regarding a possible correlation between the organ disease in Tg mice and the Nef-induced PAK2 activation, our data with 10 Nef mutants strongly suggest that PAK2 association by Nef is not sufficient to induce kidney and lung diseases, since three mutants able to bind PAK2 (Nef^{P147A/P150A}, Nef^{Δ25-65}, Nef^{RD35AA}) nevertheless failed to induce these organ diseases. However, results with other mutants suggest that PAK2 association may be required for lung and kidney diseases. Indeed, none of the 5 mutants having lost PAK2 binding capability among those studied (Nef^{G2A}, Nef^{P72A/P75A}, Nef^{P69A}, Nef^{PR105/106AA}, Nef^{Δ57-66}) induced kidney and lung diseases. But the problem with this interpretation is the evidence that some of these mutations are known to affect other functions of Nef, in addition to its binding to PAK: namely abrogating its binding to hck through indirect structural changes for the P72A/P75A mutation (41,90,91) and disrupting CD4 downregulation and CD3 signaling for the RR105/106AA mutation (56,81,92,93). It therefore appears that PAK2 binding to Nef may be required for induction of kidney and lung diseases in Tg mice, but is clearly not sufficient.

Finally, this mutational analysis established that the kidney/lung organ diseases and the T-cell phenotype segregated independently. Indeed, three mutants of Nef described here (Nef^{P69A}, Nef^{PR105/PR106AA}, Nef^{P147A/P150A}) and others previously reported [Nef^{G2A}, Nef^{A25-65} (68)], were inactive at inducing kidney and lung diseases, while remaining competent for causing CD4⁺ T-cell loss. This suggests that these organ diseases and CD4⁺ T-cell loss represent distinct phenotypes, most likely resulting from expression of Nef in distinct cell populations, respectively CD4⁺ T cells and possibly DC and macrophages.

In conclusion, our findings provide, for the first time, insights into the role of Nef-mediated PAK2 activation in the pathogenesis of various abnormalities associated with the development of an AIDS-like disease in a small animal model. Since Nef binds to and activates PAK2 in both human and primary murine cells and that human and mouse PAK2 are highly conserved, the finding on Nef-mediated PAK2 activation in this mouse model may be applicable and relevant to human AIDS.

REFERENCES

1. Deacon, N. J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D. J., McPhee, D. A., Greenway, A. L., Ellett, A., Chatfield, C., and et a (1995) *Science* **270**, 988-991
2. Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Brettler, D. B., Sullivan, J. L., and Desrosiers, R. C. (1995) *N.Engl.J.Med.* **332**, 228-232
3. Mariani, R., Kirchhoff, F., Greenough, T. C., Sullivan, J. L., Desrosiers, R. C., and Skowronski, J. (1996) *J.Virol.* **70**, 7752-7764
4. Salvi, R., Garbuglia, A. R., Di Caro, A., Pulciani, S., Montella, F., and Benedetto, A. (1998) *J.Virol.* **72**, 3646-3657
5. Alexander, L., Weiskopf, E., Greenough, T. C., Gaddis, N. C., Auerbach, M. R., Malim, M. H., O'Brien, S. J., Walker, B. D., Sullivan, J. L., and Desrosiers, R. C. (2000) *J.Virol.* **74**, 4361-4376
6. Kestler, H. W., Ringler, D. J., Mori, K., Panicali, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M. D., and Desrosiers, R. C. (1991) *Cell* **65**, 651-662
7. Wyand, M. S., Manson, K. H., Lackner, A. A., and Desrosiers, R. C. (1997) *Nat.Med.* **3**, 32-36
8. Baba, T. W., Liska, V., Khimani, A. H., Ray, N. B., Dailey, P. J., Penninck, D., Bronson, R., Greene, M. F., McClure, H. M., Martin, L. N., and Ruprecht, R. M. (1999) *Nat.Med.* **5**, 194-203
9. Hanna, Z., Kay, D. G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S., and Jolicoeur, P. (1998) *Cell* **95**, 163-175
10. Simard, M.-C., Chrobak, P., Kay, D. G., Hanna, Z., Jothy, S., and Jolicoeur, P. (2002) *J. Virol.* **76**, 3981-3995
11. Trono, D. (1995) *Cell* **82**, 189-192
12. Cullen, B. R. (1996) *Curr.Biol.* **6**, 1557-1559
13. Harris, M. (1996) *J.Gen.Virol.* **77**, 2379-2392
14. Peter, F. (1998) *Immunity.* **9**, 433-437
15. Renkema, G. H. and Saksela, K. (2000) *Front Biosci.* **5**, D268-D283
16. Marsh, J. W. (1999) *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 192-198

17. Welker, R., Kottler, H., Kalbitzer, H. R., and Krausslich, H. G. (1996) *Virology* **219**, 228-236
18. Pandori, M. W., Fitch, N. J., Craig, H. M., Richman, D. D., Spina, C. A., and Guatelli, J. C. (1996) *J. Virol.* **70**, 4283-4290
19. Piguet, V., Schwartz, O., Le Gall, S., and Trono, D. (1999) *Immunol.Reviews.* **168**, 51-63
20. Skowronski, J., Greenberg, M. E., Lock, M., Mariani, R., Salghetti, S., Swigut, T., and Iafrate, A. J. (1999) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **64**, 453-463
21. Goldsmith, M. A., Warmerdam, M. T., Atchison, R. E., Miller, M. D., and Greene, W. C. (1995) *J. Virol.* **69**, 4112-4121
22. Cullen, B. R. (1994) *Virology.* **205**, 1-6
23. Guatelli, J. C. (1997) *Res. Virol.* **148**, 34-37
24. Harris, M. (1999) *Curr. Biol.* **9**, R459-R461
25. Ross, T. M., Oran, A. E., and Cullen, B. R. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 613-621
26. Lama, J., Mangasarian, A., and Trono, D. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 622-631
27. Stoddart, C. A., Geleziunas, R., Ferrell, S., Linquist-Stepps, V., Moreno, M. E., Bare, C., Xu, W., Yonemoto, W., Bresnahan, P. A., McCune, J. M., and Greene, W. C. (2003) *J. Virol.* **77**, 2124-2133
28. Iafrate, A. J., Carl, S., Bronson, S., Stahl-Hennig, C., Swigut, T., Skowronski, J., and Kirchhoff, F. (2000) *J. Virol.* **74**, 9836-9844
29. Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., and Heard, J. M. (1996) *Nat. Med.* **2**, 338-342
30. Le Gall, S., Heard, J. M., and Schwartz, O. (1997) *Res. Virol.* **148**, 43-47
31. Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S. A., Walker, B. D., and Baltimore, D. (1998) *Nature* **391**, 397-401
32. Bell, I., Ashman, C., Maughan, J., Hooker, E., Cook, F., and Reinhart, T. A. (1998) *J. Gen. Virol.* **79**, 2717-2727
33. Swigut, T., Shohdy, N., and Skowronski, J. (2001) *EMBO J* **20**, 1593-1604
34. Baur, A. S., Sawai, E. T., Dazin, P., Fantl, W. J., Cheng-Mayer, C., and Peterlin, B. M. (1994) *Immunity.* **1**, 373-384
35. Niederman, T. M., Garcia, J. V., Hastings, W. R., Luria, S., and Ratner, L. (1992) *J. Virol.* **66**, 6213-6219
36. Luria, S., Chambers, I., and Berg, P. (1991) *Pro. Natl Acad. Sci. U.S.A* **88**, 5326-5330
37. Skowronski, J., Parks, D., and Mariani, R. (1993) *EMBO J.* **12**, 703-713
38. Greenway, A., Azad, A., Mills, J., and McPhee, D. (1996) *J. Virol.* **70**, 6701-6708
39. Cheng, H., Hoxie, J. P., and Parks, W. P. (1999) *Virology* **264**, 5-15
40. Briggs, S. D., Sharkey, M., Stevenson, M., and Smithgall, T. E. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 17899-17902
41. Saksela, K., Cheng, G., and Baltimore, D. (1995) *EMBO J.* **14**, 484-491
42. Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C. H., Kuriyan, J., and Miller, W. T. (1997) *Nature* **385**, 650-653
43. Baur, A. S., Sass, G., Laffert, B., Willbold, D., Cheng-Mayer, C., and Peterlin, B. M. (1997) *Immunity.* **6**, 283-291
44. Bodeus, M., Marie-Cardine, A., Bougeret, C., Ramos-Morales, F., and Benarous, R. (1995) *J. Gen. Virol.* **76 (Pt 6)**, 1337-1344
45. Sawai, E. T., Cheng-Mayer, C., and Luciw, P. A. (1997) *Res. Virol.* **148**, 47-52
46. Sawai, E. T., Baur, A. S., Peterlin, B. M., Levy, J. A., and Cheng-Mayer, C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 15307-15314
47. Renkema, G. H., Manninen, A., Mann, D. A., Harris, M., and Saksela, K. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 1407-1410
48. Arora, V. K., Molina, R. P., Foster, J. L., Blakemore, J. L., Chernoff, J., Fredericksen B.L., and Garcia, J. V. (2000) *J Virol* **74**, 11081-11087

49. Fackler, O. T., Lu, X., Frost, J. A., Geyer, M., Jiang, B., Luo, W., Abo, A., Alberts, A. S., and Peterlin, B. M. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 2619-2627
50. Sells, M. A., Boyd, J. T., and Chernoff, J. (1999) *J. Cell Biol.* **145**, 837-849
51. Rudel, T., Zenke, F. T., Chuang, T. H., and Bokoch, G. M. (1998) *J. Immunol.* **160**, 7-11
52. Bagrodia, S., Derijard, B., Davis, R. J., and Cerione, R. A. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 27995-27998
53. Rudel, T. and Bokoch, G. M. (1997) *Science* **276**, 1571-1574
54. Jakobi, R., Moertl, E., and Koepfel, M. A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 16624-16634
55. Schurmann, A., Mooney, A. F., Sanders, L. C., Sells, M. A., Wang, H. G., Reed, J. C., and Bokoch, G. M. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 453-461
56. Wiskerchen, M. and Cheng-Mayer, C. (1996) *Virology* **224**, 292-301
57. Kirchhoff, F., Schindler, M., Bailer, N., Renkema, G. H., Saksela, K., Knoop, V., Muller-Trutwin, M. C., Santiago, M. L., Bibollet-Ruche, F., Dittmar, M. T., Heeney, J. L., Hahn, B. H., and Munch, J. (2004) *J. Virol.* **78**, 6864-6874
58. Geffin, R., Wolf, D., Muller, R., Hill, M. D., Stellwag, E., Freitag, M., Sass, G., Scott, G. B., and Baur, A. S. (2000) *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**, 1855-1868
59. Lang, S. M., Iafrate, A. J., Stahl-Hennig, C., Kuhn, E. M., Nisslein, T., Kaup, F. J., Haupt, M., Hunsmann, G., Skowronski, J., and Kirchhoff, F. (1997) *Nat. Med.* **3**, 860-865
60. Manninen, A., Hiipakka, M., Vihinen, M., Lu, W., Mayer, B. J., and Saksela, K. (1998) *Virology* **250**, 273-282
61. Krautkramer, E., Giese, S. I., Gasteier, J. E., Muranyi, W., and Fackler, O. T. (2004) *J. Virol.* **78**, 4085-4097
62. Khan, I. H., Sawai, E. T., Antonio, E., Weber, C. J., Mandell, C. P., Montbriand, P., and Luciw, P. A. (1998) *J. Virol.* **72**, 5820-5830
63. Sawai, E. T., Khan, I. H., Montbriand, P. M., Peterlin, B. M., Cheng-Mayer, C., and Luciw, P. A. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 1519-1527
64. Carl, S., Iafrate, A. J., Lang, S. M., Stolte, N., Stahl-Hennig, C., Matz-Rensing, K., Fuchs, D., Skowronski, J., and Kirchhoff, F. (2000) *J. Virol.* **74**, 4155-4164
65. Luo, T., Livingston, R. A., and Garcia, J. V. (1997) *J. Virol.* **71**, 9524-9530
66. Sawai, E. T., Hamza, M. S., Ye, M., Shaw, K. E., and Luciw, P. A. (2000) *J. Virol.* **74**, 2038-2045
67. Hanna, Z., Priceputu, E., Hu, C., Vincent, P., and Jolicoeur, P. (2005) *Virology* (In press)
68. Hanna, Z., Priceputu, E., Kay, D. G., Poudrier, J., Chrobak, P., and Jolicoeur, P. (2004) *Virology* **327**, 273-286
69. Hanna, Z., Weng, X., Kay, D. G., Poudrier, J., Lowell, C., and Jolicoeur, P. (2001) *J. Virol.* **75**, 9378-9392
70. Huang, M., Hanna, Z., and Jolicoeur, P. (1995) *J. Virol.* **69**, 60-68
71. Boyle, W. J., van der, G. P., and Hunter, T. (1991) *Methods Enzymol.* **201**, 110-149
72. Weng, X., Priceputu, E., Chrobak, P., Poudrier, J., Kay, D. G., Hanna, Z., Mak, T. W., and Jolicoeur, P. (2004) *J. Virol.* **78**, 5244-5257
73. Priceputu, E., Rodrigue, I., Chrobak, P., Poudrier, J., Mak, T. W., Hanna, Z., Hu, C., Kay, D. G., and Jolicoeur, P. (2005) *J. Virol.* **79**, 6377-6391
74. Brown, A., Wang, X., Sawai, E., and Cheng-Mayer, C. (1999) *J. Virol.* **73**, 9899-9907
75. Renkema, G. H., Manninen, A., and Saksela, K. (2001) *J. Virol.* **75**, 2154-2160
76. Pulkkinen, K., Renkema, G. H., Kirchhoff, F., and Saksela, K. (2004) *J. Virol.* **78**, 12773-12780
77. Shin, E. Y., Shin, K. S., Lee, C. S., Woo, K. N., Quan, S. H., Soung, N. K., Kim, Y. G., Cha, C. I., Kim, S. R., Park, D., Bokoch, G. M., and Kim, E. G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 44417-44430
78. Shin, E. Y., Woo, K. N., Lee, C. S., Koo, S. H., Kim, Y. G., Kim, W. J., Bae, C. D., Chang, S. I., and Kim, E. G. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 1994-2004
79. Turner, C. E., Brown, M. C., Perrotta, J. A., Riedy, M. C., Nikolopoulos, S. N., McDonald, A. R., Bagrodia, S., Thomas, S., and Leventhal, P. S. (1999) *J. Cell. Biol.* **145**, 851-863

80. Liu, L. X., Heveker, N., Fackler, O. T., Arold, S., Le Gall, S., Janvier, K., Peterlin, B. M., Dumas, C., Schwartz, O., Benichou, S., and Benarous, R. (2000) *J.Virol.* **74**, 5310-5319
81. Iafrate, A. J., Bronson, S., and Skowronski, J. (1997) *EMBO J.* **16**, 673-684
82. Keppler, O. T., Allespach, I., Schuller, L., Fenard, D., Greene, W. C., and Fackler, O. T. (2005) *J.Virol.* **79**, 1655-1665
83. Gatti, A., Huang, Z., Tuazon, P. T., and Traugh, J. A. (1999) *J.Biol.Chem.* **274**, 8022-8028
84. Manser, E., Loo, T. H., Koh, C. G., Zhao, Z. S., Chen, X. Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T., and Lim, L. (1998) *Mol.Cell.* **1**, 183-192
85. Luo, T. and Garcia, J. V. (1996) *J.Virol.* **70**, 6493-6496
86. Foster, J. L., Molina, R. P., Luo, T., Arora, V. K., Huang, Y., Ho, D. D., and Garcia, J. V. (2001) *J.Virol.* **75**, 1672-1680
87. Fackler, O. T., Luo, W., Geyer, M., Alberts, A. S., and Peterlin, B. M. (1999) *Mol.Cell* **3**, 729-739
88. Huang, Z., Traugh, J. A., and Bishop, J. M. (2004) *Mol.Cell.Biol.* **24**, 1582-1594
89. Wolf, D., Witte, V., Laffert, B., Blume, K., Stromer, E., Trapp, S., D'Aloja, P., Schurmann, A., and Baur, A. S. (2001) *Nat.Med.* **7**, 1217-1224
90. Lee, C. H., Leung, B., Lemmon, M. A., Zheng, J., Cowburn, D., Kuriyan, J., and Saksela, K. (1995) *EMBO J.* **14**, 5006-5015
91. Lee, C. H., Saksela, K., Mirza, U. A., Chait, B. T., and Kuriyan, J. (1996) *Cell* **85**, 931-942
92. Hua, J., Blair, W., Truant, R., and Cullen, B. R. (1997) *Virology* **231**, 231-238
93. Aiken, C., Krause, L., Chen, Y. L., and Trono, D. (1996) *Virology* **217**, 293-300

FOOTNOTES

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research, HIV/AIDS Research Program to P.J. and Z.H. We thank Mathieu Arcand and Sylvain Meloche previously from our Institute for the help in the phosphoaminoacid analysis experiment, Pascale Jovert, Valérie Coté, Karina Lamarre, Jean-René Sylvestre and Benoit Laganière, for their excellent technical assistance. We are grateful to Rita Gingras, Monique Villani, Chantal Gagnon and Chantal Guertin for typing the manuscript.

FIGURE LEGENDS

Fig.1. Nef interacts with a serine kinase in major immune subsets of cells from CD4C/HIV-Nef^{WT} Tg mice. *A*, Expression of Nef in major immune subset of Tg cells. Total protein extracts (100 µg) from thymus (Thy), macrophages (M) and dendritic cells (DC) of one-month-old CD4C/HIV-Nef^{WT} Tg and non-Tg animals were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting with anti-Nef polyclonal serum. The membrane was stripped and probed with anti-actin Ab. *B*, NAK activity in different subsets of Nef-expressing cells from CD4C/HIV-Nef^{WT} Tg mice. Total protein extract from thymocytes (250 µg), macrophages (100 µg) and DC (100 µg) from three month-old CD4C/HIV-Nef^{WT} Tg and non-Tg littermate mice were incubated with an anti-Nef polyclonal serum overnight and subjected to an IVKA using 10 µCi of [³²P]ATP for 5 min at room temperature. The phosphorylated proteins were next separated by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. The data obtained from thymocytes and macrophages are presentative of at least 20 independant experiments and those obtained from DC are representative of 3 independant experiments, each involving cells from pooled Tg (n=3) and non-Tg (n=3) mice in each experiment. *C*, Phosphoamino acids analysis of the ³²P-labeled p62/p95/p85 species. IVKA was performed on thymocytes extracts using an anti-Nef serum. The samples were run on SDS-PAGE, transferred onto membrane and autoradiography performed. The p62, p85 and p95 phosphoproteins found in the Nef immunoprecipitates were excised from the membrane, incubated in 5.7 N HCl and the released amino acids subjected to one-dimensional chromatography, on thin layer cellulose plate.

Fig. 2. PAK2 is selectively activated in the immune cells of CD4C/HIV-Nef^{WT} Tg mice. *A*, Total extracts of thymocytes (250 μ g), macrophages (100 μ g) and DC (100 μ g) from three-month-old CD4C/HIV-Nef^{WT} Tg and non-Tg littermate mice were immunoprecipitated with specific serum raised against PAK1, PAK2 and PAK3 (47) followed by an IVKA. The samples were then run on SDS-PAGE and visualized by autoradiography. These data are representative of 6 independent experiments done with a group of 4 or 5 pooled Tg and non-Tg littermate animals in each experiment. Membranes were cut and protein loading in each lane was determined by Western (W) blotting with anti-PAK (C-19) Ab or with Ab specific for PAK3. *B*, Immunodepletion of Nef. The anti-Nef immunoprecipitates from the total thymocyte extracts (TE) or from supernatants (sup) were run on SDS-PAGE and Western blotting was done with anti-Nef Ab. The right panel is a control with immunoblotting without immunoprecipitation. *C*, Immunodepletion experiments. Total protein extract (TE) from thymocytes (250 μ g) or macrophages (100 μ g) of CD4C/HIV-Nef^{WT} Tg and non-Tg mice were Nef-depleted by two or three successive rounds of immunoprecipitation with an anti-Nef serum and the subsequent supernatant (sup) was immunoprecipitated with anti-PAK2 (V-19) antibodies. The reverse experiment was also carried out for macrophages: PAK2-depletion, followed by IP with anti-Nef on the subsequent supernatants. An IVKA was performed on each immunoprecipitate and the samples were run on SDS-PAGE. The phosphorylated proteins were detected by autoradiography.

Fig. 3. β -PIX/COOL is part of the Nef-NAK complex. Cell extracts from thymuses (250 μ g) *A*, or macrophages (100 μ g) *B*, of three-month-old CD4C/HIV-Nef^{WT} Tg and non-Tg animals were subjected to an immunoprecipitation with an anti-Nef serum or an anti- β -PIX/COOL serum overnight followed by an IVKA. The samples were then run on SDS-PAGE and the phosphoproteins were visualized by autoradiography. These data are representative of 4 independent experiments. Membranes were subjected to Western (W) blotting with anti- β -PIX Ab to estimate the protein loading in each lane. *C*, Immunodepletion experiments. Total protein extract (TE) from thymocytes (250 μ g) or macrophages (100 μ g) of CD4C/HIV-Nef^{WT} Tg and non-Tg mice were Nef-depleted by two or three successive rounds of immunoprecipitation with an anti-Nef or anti- β -PIX/COOL serum and the subsequent supernatant (sup) was immunoprecipitated with anti- β -PIX/COOL or Nef Ab. *D*, Proteolytic digests of ³²P-labeled p85 and p95 species. Thymic extracts were immunoprecipitated with an anti-Nef or anti- β -PIX/COOL serum followed by IVKA. The ³²P-labeled p85 and p95 and a control Ig band were cut off from the dried gel and partially digested with *Staphylococcus aureus* V8 peptidase or chymotrypsin. The data are representative of 5 independent experiments. Symbols: *, fragments similar in both anti-Nef and anti- β -PIX/COOL immunoprecipitates; O, p85-specific ³²P-labeled fragment.

Fig. 4. Nef Expression in CD4C/HIV-Nef^{P69A}, CD4C/HIV-Nef^{RR106AA} and CD4C/HIV-Nef^{P147A/P150A} Tg mice. *A*, Structure of the CD4C/HIV-Nef^{P69A}, CD4C/HIV-Nef^{RR105/106AA} and CD4C/HIV-Nef^{P147A/P150A} transgenes. The human CD4C regulatory sequences were used to drive transgene expression. Thin bar, CD4C promoter fused to the mouse enhancer (En); large bar, HIV sequences; strippled bar, SV40 poly A signal. *B*, Northern blot analysis of HIV-1 RNA in various tissues. Total RNA (10 μ g) extracted from different organs of mice from different founder Tg lines and from non-Tg mice were hybridized with a [³²P]-labeled HIV-1 specific probe. Samples from CD4C/HIV-Nef^{WT} (Nef^{WT}) Tg mice were used as positive controls. Symbols: T, thymus, L, lymph node, S, spleen, K, kidney. To control sample loading, blots were washed and rehybridized with an 18S ribosomal specific probe. *C*, Western blots analysis of Nef protein in thymus of Tg animals. Total thymus extracts (100 μ g) from mice of different founder Tg lines and non-Tg mice were blotted with an anti-Nef serum. Thymuses of CD4C/HIV-Nef^{WT} [F27367, moderate (M) Nef expresser and F27372, low (L) expresser] were used as positive controls. Membranes were stripped and re-probed with anti-actin Ab to control sample loading.

Fig. 5. Characterization of Nef/NAK interaction in Tg mice expressing Nef^{P69A}, Nef^{P147A/P150A} and Nef^{RR105/106AA} mutants. Thymocyte (250 μ g) or macrophage (100 μ g) extracts from the indicated Tg mice were precipitated with anti-Nef *A*, or anti-PAK2 (V-19) (*B*, Top) antibody followed by IVKA. Samples from CD4C/HIV-Nef^{WT} Tg animals were used as controls. Following IVKA, [³²P]-labeled Nef-associated proteins were separated by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. These data are representative of at least 3 independent experiments. Western blot using anti-PAK2 (V-19) antibody was performed on each anti-PAK2 immunoprecipitate to document the presence of equal amount of PAK2 in each reaction (*B*, Bottom). The numbers above the lanes show semi-quantitation of PAK2 activation values in each Nef mutants relative to non-Tg samples. Values represent the ratio of the amount of phosphorylated substrates over levels of PAK2 proteins normalized (obtained with the Odyssey software (Licor) normalized to non-Tg values. *C*, Thymocytes from CD4C/HIV-Nef^{WT}, CD4C/HIV-Nef^{P69A} and CD4C/HIV-Nef^{RR105/106AA} Tg mice and non-Tg control littermates were incubated with [³⁵S]-methionine and then extracts were immunoprecipitated with the anti-Nef serum. The ³⁵S-labeled proteins were separated by SDS-PAGE and the Nef protein visualized by autoradiography. Note the capacity of this polyclonal anti-Nef serum used in the above experiment to immunoprecipitate the mutated Nef proteins effectively. The symbol (*) indicates that these control lanes are the same as those shown in Fig. 7, since all these samples were loaded on the same gel.

Fig. 6. Immunophenotypic analysis of lymphocytes from CD4C/HIV-Nef^{P69A}, CD4C/HIV-Nef^{RR105/106AA} and CD4C/HIV-Nef^{P147A/P150A} Tg mice. FACS analysis of cell populations from thymus *A*, and lymph nodes (*B*, *C*, *D*) from representative CD4C/HIV-Nef^{P69A}, CD4C/HIV-Nef^{RR106AA}, CD4C/HIV-Nef^{P147A/P150A} and CD4C/HIV-Nef^{WT} Tg mice and their non-Tg littermates. (*A*, *B*) T-cells were labeled for the CD4, CD8 and TcR markers. The percentage of cells found in each quadrant is indicated. A dotted line is drawn across the panels to show the downregulation of the cell surface CD4. *C*, Analysis of surface activation markers. Three-color staining of LN cells. T-cells were labeled for CD4 and TcR $\alpha\beta$ as well as for CD25, CD44, CD45RB, CD62L or CD69. Results from a representative experiment on cells gated on CD4⁺ TcR $\alpha\beta$ ⁺ CD44⁺ are shown. The percentage of cells found in each quadrant is indicated. At the bottom, a summary of the results for additional cell activation markers is presented as a ratio (Tg/non-Tg). The data were pooled from 4 non-Tg and 4 Tg mice from each mutant. The statistical analysis was done by the Student's t-test. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.003. *D*, Quantitation of apoptotic/dead CD4⁺ T cells. LN cells of Tg or non-Tg mice were analyzed by FACS after staining with anti-CD4-APC mAbs and 7AAD. The data pooled from 3 non-Tg and 4 Tg mice of each indicated line represent percentages of apoptotic/dead cells among the CD4⁺ T cell subpopulation. Statistical analysis was performed by the Student's t-test.

Fig. 7. Characterization of Nef/NAK interaction in Tg mice expressing additional Nef mutants. Thymocyte (250 μ g) or macrophage (100 μ g) extracts from Tg mice expressing control Nef^{WT} or Nef with point mutations at G²A, P⁷²AXXP⁷⁵A, RD³⁵AA and D¹⁷⁴K (*A*), or Nef with an internal deletion at Δ 8-17, Δ 25-65, Δ 56-66 (*B*), were precipitated with anti-Nef serum followed by IVKA. The phosphorylated samples were separated by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. The symbol (*) indicates that these control lanes are the same as those shown in Fig. 5, since all these samples were loaded on the same gel. These data are representative of at least 3 independent experiments done with a group of 3 Tg and non-Tg littermate animals in each experiment. *C*, Thymocytes from non-Tg or Tg mice expressing Nef^{WT} or Nef with mutation at G²A and P⁷²AxxP⁷⁵A were incubated with [³⁵S]-methionine and their extracts immunoprecipitated with anti-Nef serum. The ³⁵S-labeled Nef proteins were detected as described in the legend to Fig. 5C. Note the capacity of this anti-Nef serum used to immunoprecipitate the mutated Nef proteins effectively. *D*, Thymocyte and macrophage extracts from non-Tg or Tg mice expressing Nef^{G2A}, Nef^{RD35AA} and Nef^{D174K} were immunoprecipitated with anti-PAK2 (V-19) antibody

followed by IVKA (top). The numbers above the lanes show semi-quantitation values of PAK2 activity for the mutants relative to non-Tg samples, as described in the legend to Fig. 5B. Western blot with anti-PAK2 (V-19) Ab was performed to detect the amount of immunoprecipitated PAK2 in the thymocyte extracts (bottom).

Table I
Cell number in lymphoid organs of control and CD4C/HIV-Nef mut Tg mice

<i>Mouse line^a</i>	<i>Number of cells (x 10⁶)/organ</i>		
	<i>Thymus</i>	<i>Spleen</i>	<i>Mes. Lymph Nodes</i>
Non-Tg ^b	111.1 ± 22.3	94.4 ± 44.0	23.8 ± 7.4
CD4C/HIV-Nef ^{WT}	17.7 ± 11.7 ^c	51.3 ± 9.8 ^c	6.8 ± 2.7 ^c
CD4C/HIV-Nef ^{P69A}			
F62331	60.6 ± 18.4 ^c	68.8 ± 24.6 ^c	13.4 ± 4.4 ^c
F62335	58.6 ± 14.9 ^c	66.9 ± 13.2 ^c	18.6 ± 2.8
F62337	32.6 ± 18.1 ^c	43.4 ± 27.7 ^c	17.8 ± 9.7
CD4C/HIV-Nef ^{RR105/106AA}			
F95139	85.3 ± 24.1	90.2 ± 33.7	19.4 ± 8.9
F98769	100.4 ± 13.9	96.6 ± 16.2	17.9 ± 6.6
CD4C/HIV-Nef ^{P147A/P150A}			
F59063	60.6 ± 15.5 ^c	85.3 ± 26.5	28.0 ± 13.6
F61937	96.7 ± 17.6	94.8 ± 24.8	30.9 ± 7.4

^a A minimum of nine mice (3-9 month-old) of each founder line were analyzed.

^b The non-Tg control values were obtained by pooling the results of all the non-Tg littermates from different lines.

^c $P < 0.05$ by using Student's t-test.

Table II
Thymic cell surface marker analysis in CD4C/HIV-Ne^fmut Tg mice

Mouse line ^a	Cell number in different subpopulations (X10 ⁶)						Mean Fluorescence (%) ^c	
	Thy 1.2	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁻ CD8 ⁺	CD4/CD8	TcR	CD4	CD8
Non-Tg ^b	107.4 ± 22.4	99.3 ± 20.2	7.5 ± 1.5	1.8 ± 0.5	4.0 ± 0.7	12.0 ± 3.5	100	100
CD4C/HIV-Ne ^f WT	16.9 ± 2.7 ^d	13.5 ± 2.6 ^d	1.5 ± 0.6 ^d	1.3 ± 0.3 ^d	0.9 ± 0.3 ^d	2.5 ± 1.7 ^d	31.5 ± 7.6 ^d	36.1 ± 6.9 ^d
CD4C/HIV-Ne ^f P89A								
F62331	43.8 ± 11.4 ^d	53.7 ± 16.4 ^d	2.7 ± 0.7 ^d	2.1 ± 0.7	1.7 ± 1.0 ^d	6.9 ± 2.4 ^d	51.8 ± 18.5 ^d	76.1 ± 23.9 ^d
F62335	57.4 ± 14.6 ^d	50.8 ± 12.8 ^d	3.4 ± 1.3 ^d	2.4 ± 0.6	1.8 ± 1.3 ^d	9.0 ± 2.0 ^d	63.3 ± 23.2 ^d	74.8 ± 28.7 ^d
F62337	31.2 ± 17.8 ^d	27.4 ± 16.1 ^d	1.6 ± 0.8 ^d	1.6 ± 0.9	1.2 ± 0.4 ^d	4.4 ± 2.3 ^d	52.8 ± 29.4 ^d	66.4 ± 16.2 ^d
CD4C/HIV-Ne ^f PR105/106AA								
F95139	84.4 ± 23.6	74.1 ± 22.1	6.3 ± 1.4	2.6 ± 0.8	2.6 ± 0.6	14.7 ± 4.6	81.3 ± 17.8 ^d	76.1 ± 11.7 ^d
F98769	96.0 ± 13.4	88.4 ± 12.8	7.0 ± 1.0	2.6 ± 0.4	3.1 ± 1.5	10.2 ± 1.4	71.3 ± 4.1 ^d	71.6 ± 3.9 ^d
CD4C/HIV-Ne ^f P147A/P150A								
F59063	58.2 ± 14.8 ^d	52.6 ± 13.2 ^d	2.8 ± 0.7 ^d	2.6 ± 0.8	1.4 ± 0.9 ^d	5.4 ± 1.5 ^d	46.7 ± 30.1 ^d	69.9 ± 29.4 ^d
F61937	94.3 ± 17.2	85.0 ± 16.4	5.4 ± 0.9	2.8 ± 0.3	1.9 ± 0.9 ^d	7.0 ± 0.7 ^d	36.4 ± 4.1 ^d	62.6 ± 3.4 ^d

^a FACS analysis was performed on at least nine mice (3-9 month-old) for each Tg line.

^b The non-Tg control values were obtained by pooling the results of all non-Tg littermates from different lines.

^c The mean fluorescences for CD4 were obtained by calculating the ratio of CD4 staining in Tg thymuses relative to that of non-Tg thymuses (100%). Mean values were then calculated with the values for each line.

^d P<0.05 by using Student's t-test.

Table III
Mesenteric lymph node cell surface marker analysis in CD4C/HIV-Ne^f^{mut} Tg mice

Mouse line ^a	Cell populations (%)							CD4/CD8 Ratio	Mean Fluorescence (%) ^c	
	Thy 1.2	CD4 ⁺	CD8 ⁺	B220	TcR	Mac-1	CD4		CD8	
Non-Tg ^b	27.6 ± 12.9	17.6 ± 7.9	10.4 ± 4.7	52.6 ± 24.9	28.4 ± 12.5	6.0 ± 1.4	1.8 ± 0.3	100	100	
CD4C/HIV-Ne ^f ^{M/I}	14.9 ± 3.9 ^d	5.8 ± 1.4 ^d	4.6 ± 1.1 ^d	33.9 ± 4.2	13.9 ± 2.8 ^d	12.0 ± 2.3	0.9 ± 0.1 ^d	38.7 ± 8.9 ^d	93.8 ± 6.9	
CD4C/HIV-Ne ^f ^{P69A}										
F62331	14.2 ± 5.0 ^d	8.4 ± 3.2 ^d	6.2 ± 1.9	39.2 ± 15.1	15.2 ± 5.3 ^d	10.6 ± 4.2	1.2 ± 0.2 ^d	53.5 ± 20.6 ^d	76.6 ± 19.7 ^d	
F62335	20.7 ± 5.0	9.6 ± 2.1 ^d	8.7 ± 2.2	37.8 ± 7.1	20.4 ± 4.4	12.0 ± 1.4	1.4 ± 0.4	84.1 ± 19.4	99.5 ± 17.4	
F62337	8.5 ± 4.1 ^d	3.8 ± 2.3 ^d	4.8 ± 2.2	28.7 ± 22.5	12.3 ± 8.9 ^d	5.2 ± 3.2	0.7 ± 0.1 ^d	21.4 ± 3.0 ^d	94.6 ± 10.5	
CD4C/HIV-Ne ^f ^{PR105/106AA}										
F95139	20.2 ± 6.4	12.2 ± 5.3	8.0 ± 2.7	64.2 ± 21.9	22.1 ± 7.8	6.0 ± 3.4	1.6 ± 0.5	69.0 ± 16.6 ^d	99.9 ± 7.1	
F98769	19.4 ± 3.2	12.2 ± 1.9	7.4 ± 0.9	61.9 ± 9.2	22.5 ± 3.8	11.3 ± 6.4	1.7 ± 0.5	72.1 ± 1.4 ^d	96.0 ± 3.7	
CD4C/HIV-Ne ^f ^{P147A/P150A}										
F59063	19.1 ± 4.5	12.5 ± 3.3	8.3 ± 2.2	50.2 ± 17.1	22.0 ± 5.3	5.5 ± 2.9	1.5 ± 0.3	66.8 ± 11.1 ^d	95.8 ± 6.0	
F61937	23.9 ± 8.3	15.7 ± 4.5	11.0 ± 3.8	53.9 ± 12.1	28.9 ± 8.7	12.8 ± 8.3	1.5 ± 0.3	56.8 ± 4.0 ^d	96.1 ± 4.2	

^a FACS analysis was performed on at least nine mice (3-9 month-old) for each Tg line.

^b The non-Tg control values were obtained by pooling the results of all the non-Tg littermates from different lines.

^c The mean fluorescences for CD4 were obtained by calculating the ratio of CD4 staining in Tg thymuses relative to that of non-Tg thymuses (100%). Mean values were then calculated with the values for each line.

^d P<0.05 by using Student's t-test.

Table IV
Summary of the phenotypes observed in CD4C/HIV^{Nef} mutants Tg mice

<i>Nef</i> <i>Mutation</i>	<i>NAK</i> <i>association</i>	<i>Non-lymphoid</i> <i>organ disease^a</i>	<i>CD4</i> <i>Downregulation^c</i>		<i>CD4⁺</i> <i>T cell Depletion^c</i>	
			<i>Thy</i>	<i>LN</i>	<i>Thy</i>	<i>LN</i>
WT	Yes	Severe	+++	+++	++++	+++
G ² A	No	ND ^b	+++	++	-	++
P ⁷² A/P ⁷⁵ A	No	ND	+	+	-	-
P ⁶⁹ A	No	ND	+++	++	+++	+++
RR ^{105/106} AA	No	ND	+	+	+	+
RD ³⁵ AA	Yes	ND	+	+	-	+
D ¹⁷⁴ K	Yes	Moderate	-	-	+	++
Δ8-17	Yes	Severe	++	-	+++	+
Δ25-65	Yes	ND	-	+	+	++
Δ56-66	No	ND	-	-	-	+
P ¹⁴⁷ A/P ¹⁵⁰ A	Yes	ND	++	+	++	+

a A mean score was calculated for all mice of the group, as described in Materials and Methods.

B ND, no disease.

C The symbol “+” and “-” reflect the percentages of CD4 downregulation or CD4⁺ T cell depletion according to the following scale: the score “-” was given for < 15%, “+” for 15-40%, “++” for 40-60%, “+++” for 60-80% and “++++” for >80%. Percentages were calculated relative to non-Tg control mice. The data shown are for the founder lines expressing the highest levels of each Nef mutant.

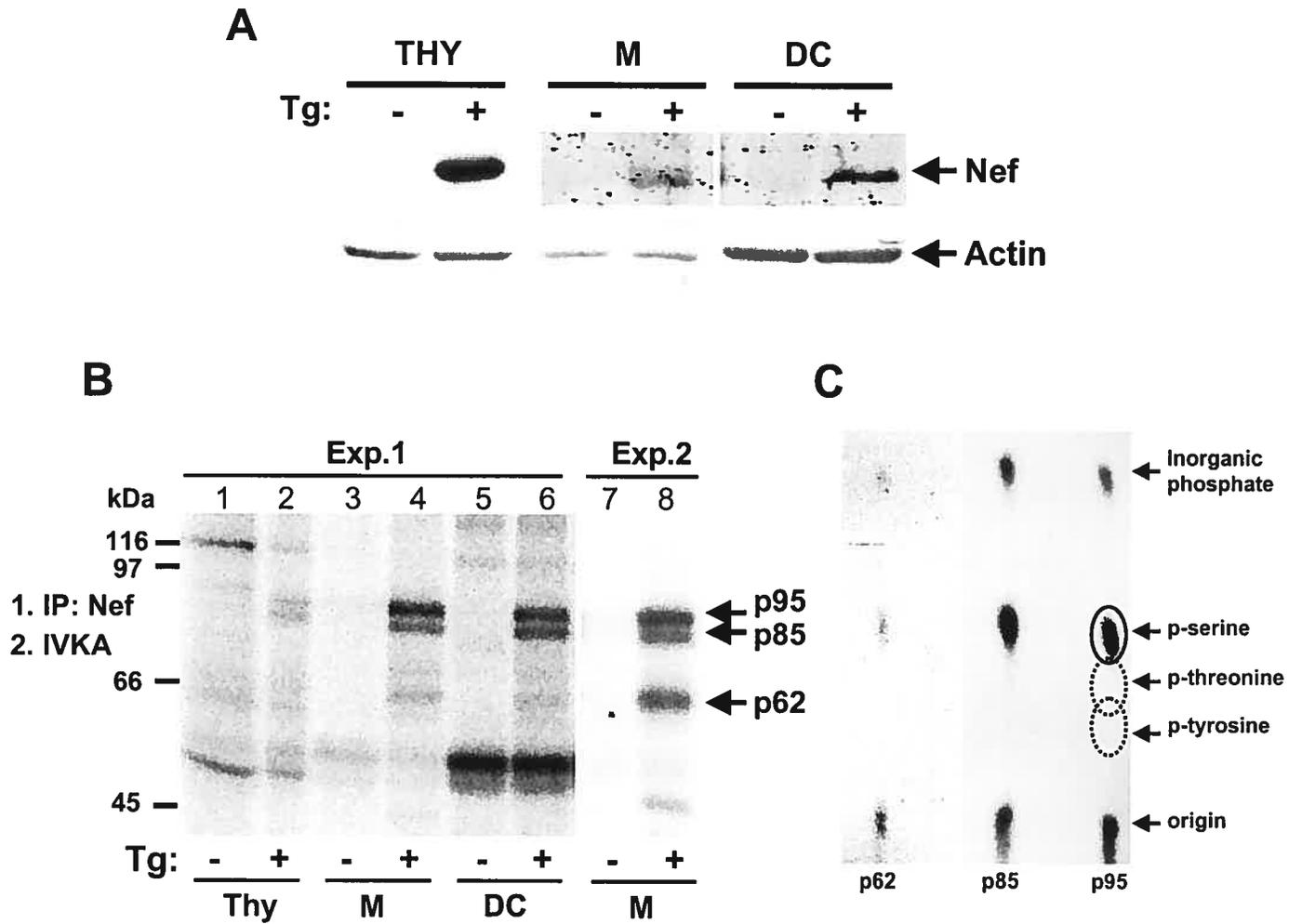


Figure 1 (Vincent et al)

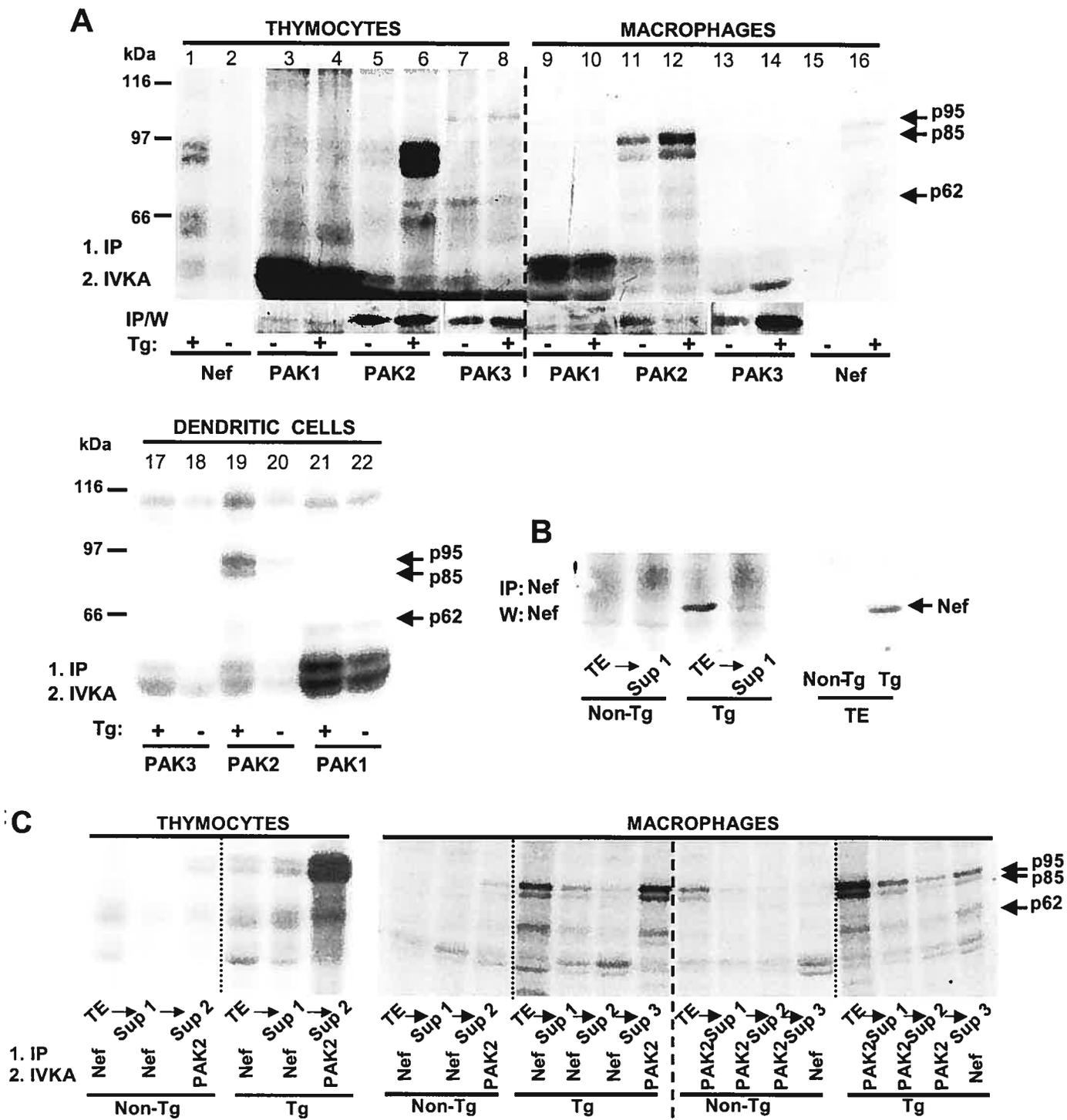


Figure 2 (Vincent et al)

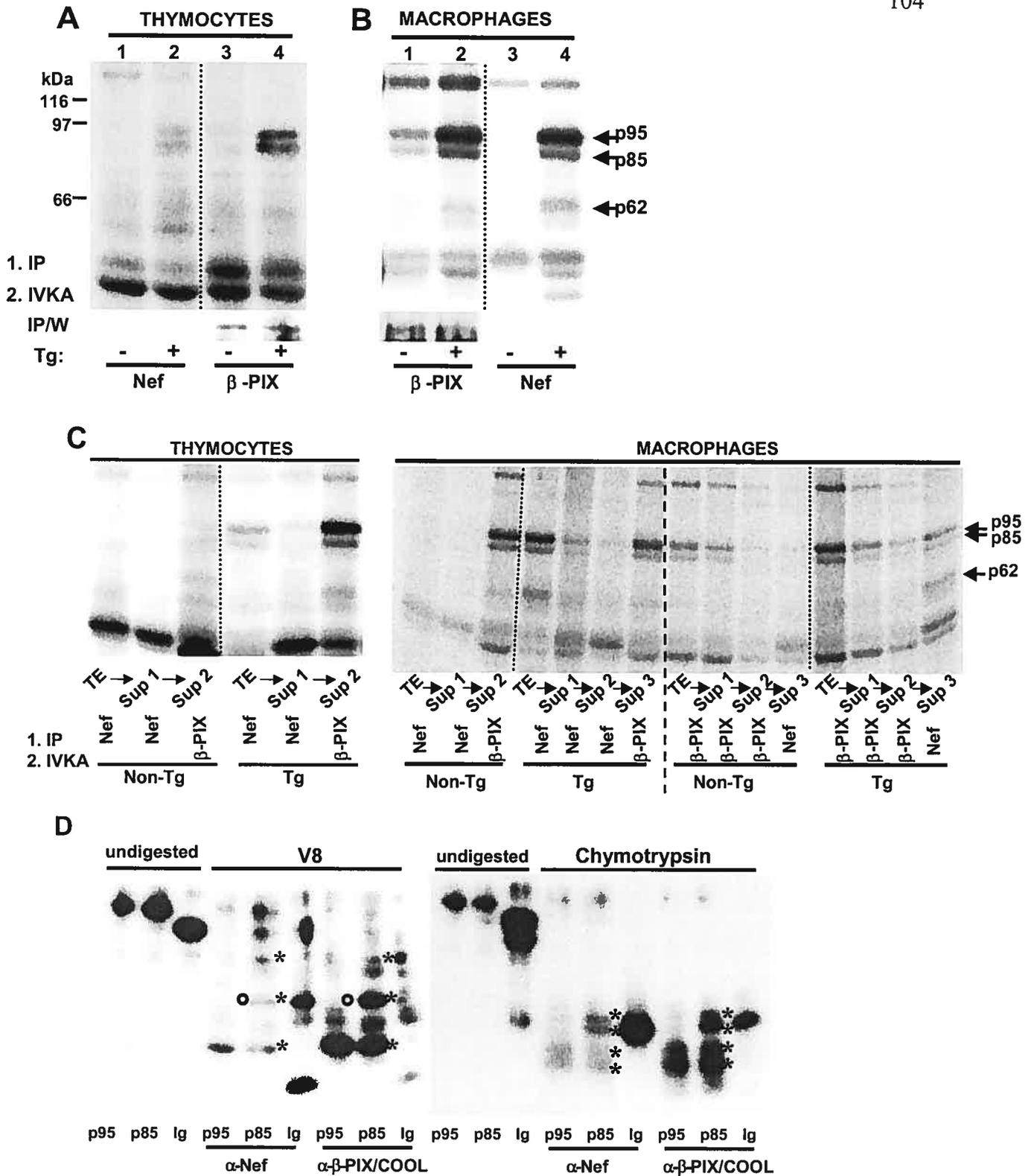


Figure 3 (Vincent et al)

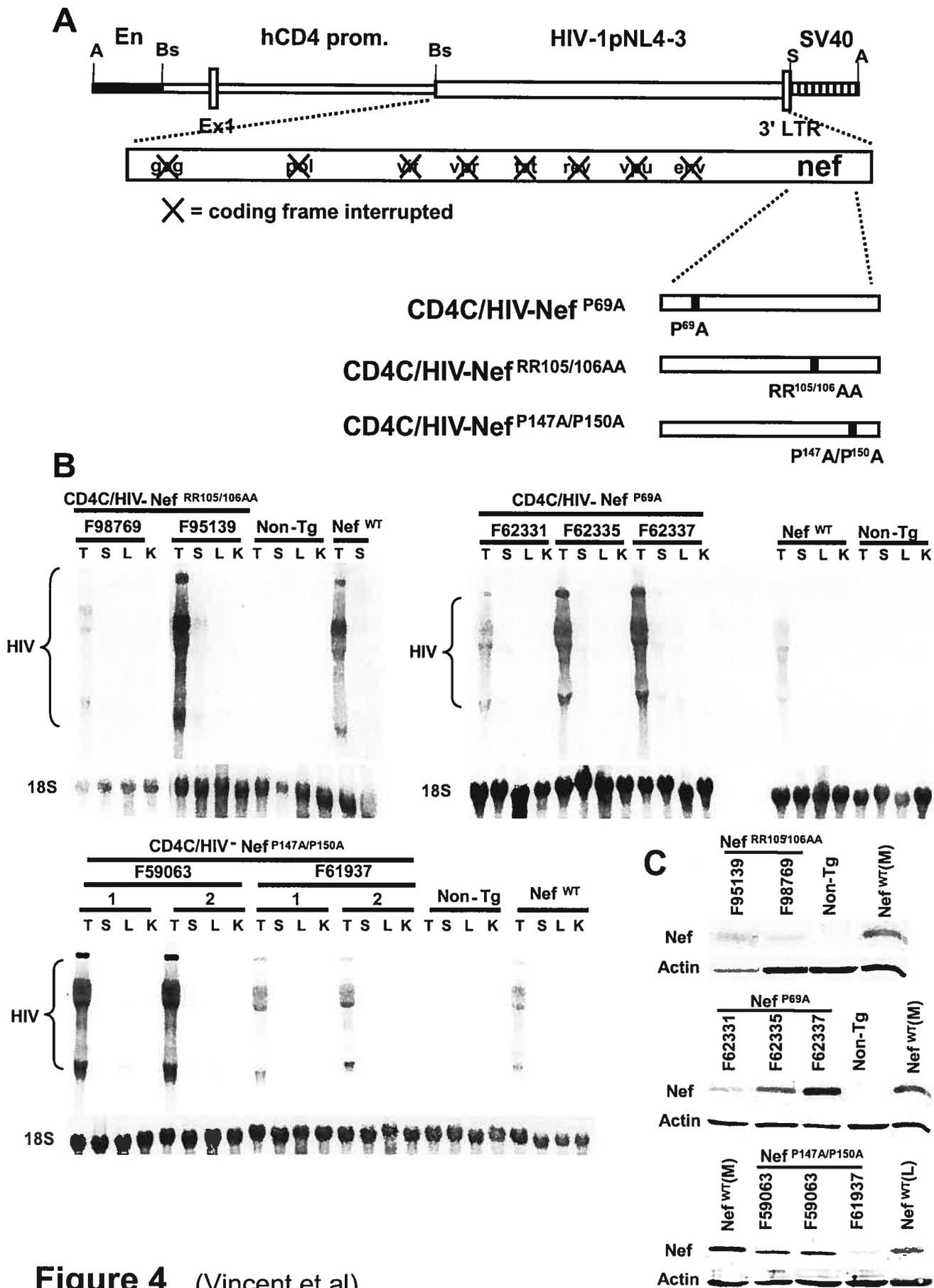


Figure 4 (Vincent et al)

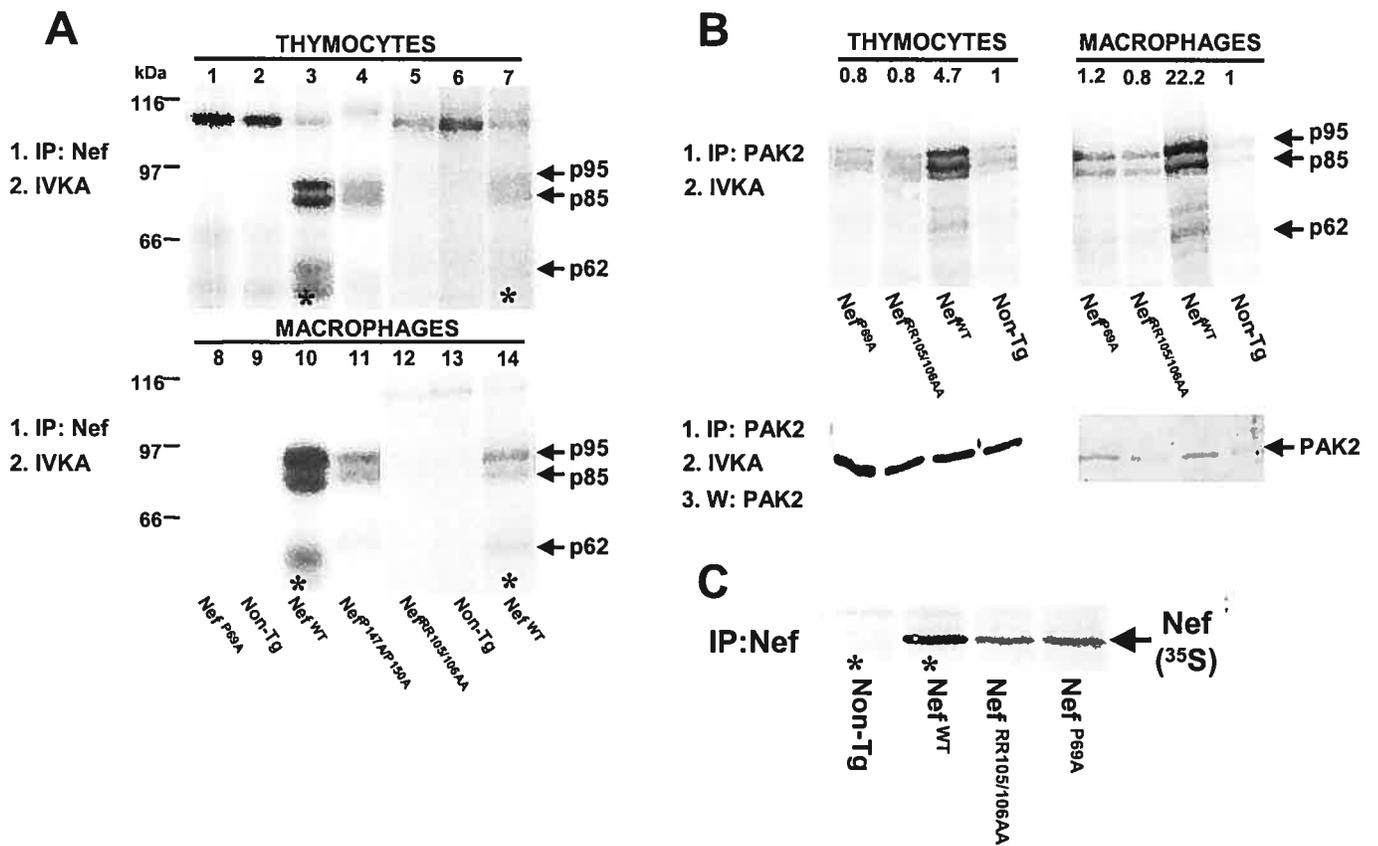


Figure 5 (Vincent et al)

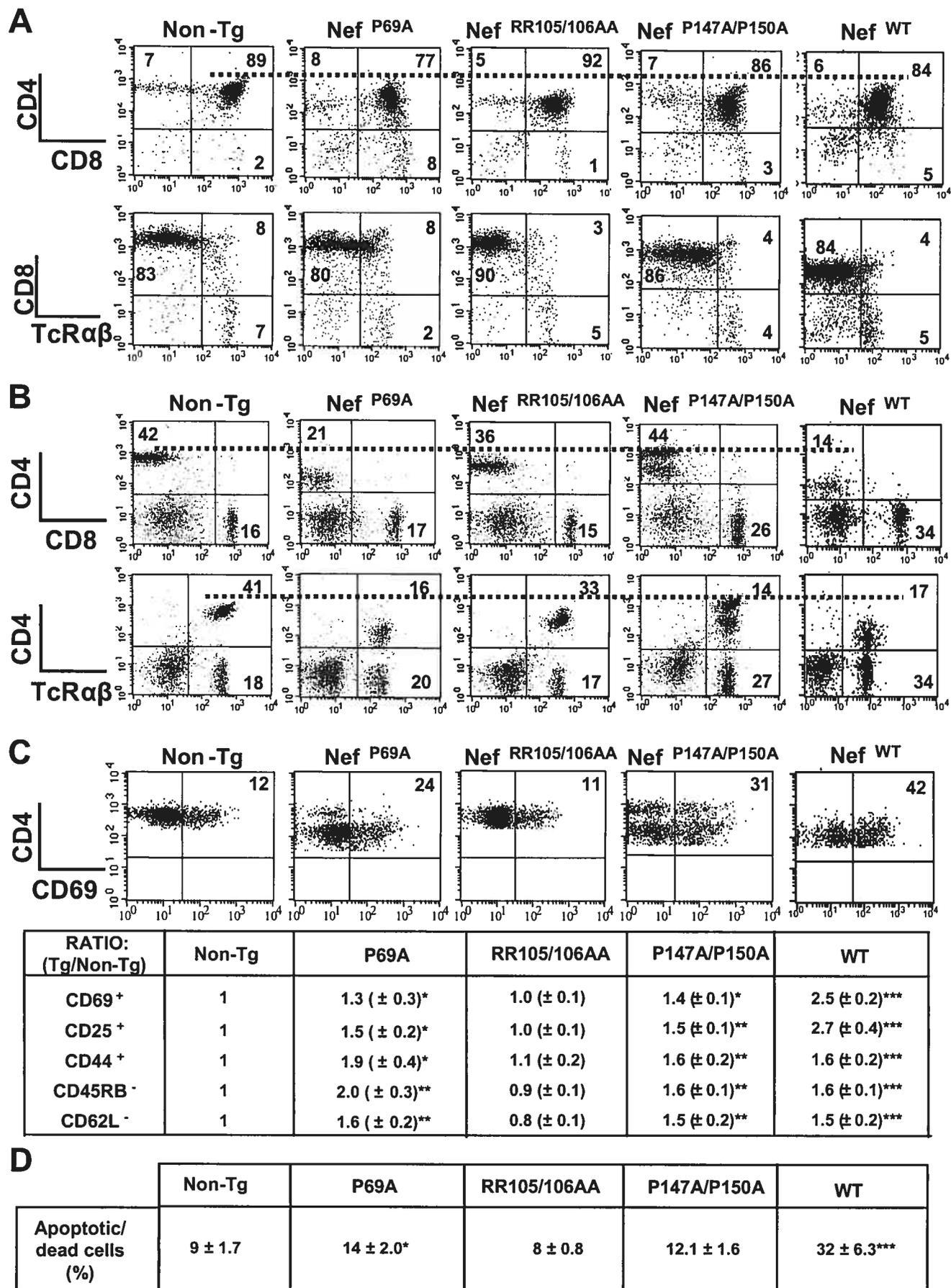


Figure 6 (Vincent et al)

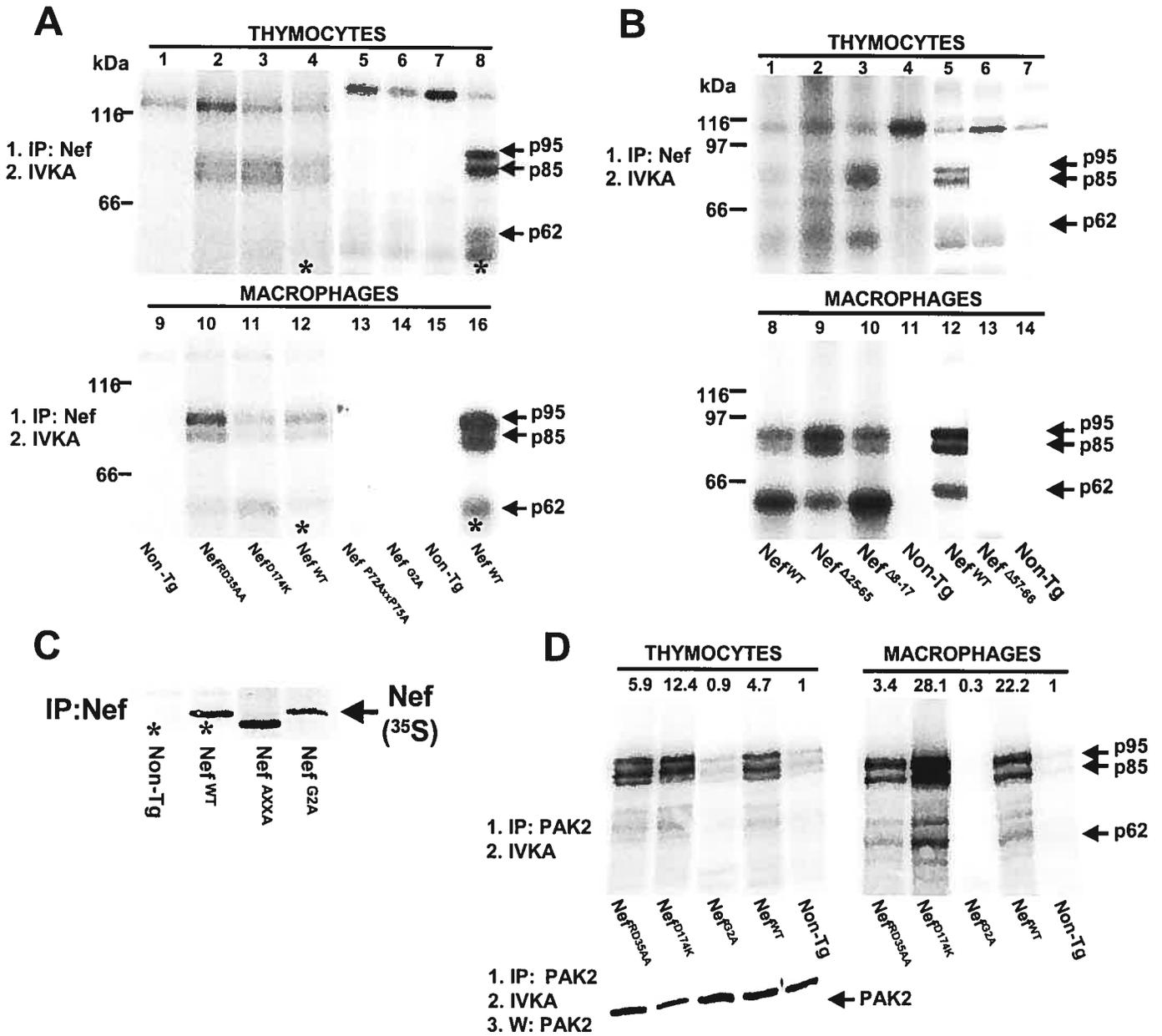


Figure 7 (Vincent et al)

APPENDICE I

La protéine Nef du VIH-1 a été largement étudiée lors de manipulations effectuées de façon *in vitro*. Un nombre important de partenaires cellulaires interagissant avec Nef a été identifié lors de ces études. Pour identifier ces partenaires cellulaires, diverses lignées cellulaires ou divers variants de Nef ont été utilisés. Les résultats présentés dans cet appendice permettront de mettre en valeur le modèle murin CD4C/HIV^{Nef} en démontrant certaines similitudes entre les résultats produits *in vitro* et *in vivo* dans les souris Tg CD4C/HIV^{Nef}. De plus, les résultats présentés permettront de mieux définir le rôle de l'interaction entre Nef et NAK dans différentes lignées de souris Tg utilisées dans notre laboratoire.

p95PKL est une protéine présente dans le complexe Nef/PAK2

Plusieurs groupes de recherches ont tenté de déterminer quelles étaient les protéines cellulaires associées à Nef et plus particulièrement celles retrouvées dans le complexe Nef/PAK (Sawai *et al*, 1996; Manninen *et al*, 1998; Brown *et al*, 1999; Arora *et al*, 2000). Les protéines PAK1 (Fackler *et al*, 2000), PAK2 (Renkema *et al*, 1999; Arora *et al*, 2000) et β -PIX (Vincent *et al*, 2006 (chapitre II); Brown *et al*, 1999; Renkema *et al*, 2000) font parti de ce complexe. La protéine p95PKL, membre de la famille des GAP (GTPase activating protein), est reconnue pour interagir fortement avec β -PIX (Turner *et al*, 1999; Zhao *et al*, 2000). Afin de déterminer si p95PKL est l'un des membres du complexe associé à Nef, nous avons effectué une immunoprécipitation avec un anti-p95PKL suivi d'un essai kinase chez les thymocytes et les macrophages provenant de souris CD4C/HIV-Nef et non-Tg (figure 2-1). Dans un premier temps, on peut observer la présence de substrats phosphorylés ayant un poids moléculaire d'environ 85 et 95 kDa chez les thymocytes provenant des souris Tg. Ces mêmes substrats sont identiques à ceux retrouvés suite à une immunoprécipitation avec un anti-Nef également chez les souris Tg. Ces résultats suggèrent que p95PKL soit l'un des membres du complexe Nef/PAK2/ β -PIX car les protéines associées à Nef semblent être les mêmes que celles associées à p95PKL suite à un essai kinase. De plus, la présence des substrats est observée seulement chez les thymocytes et est absente chez les macrophages.

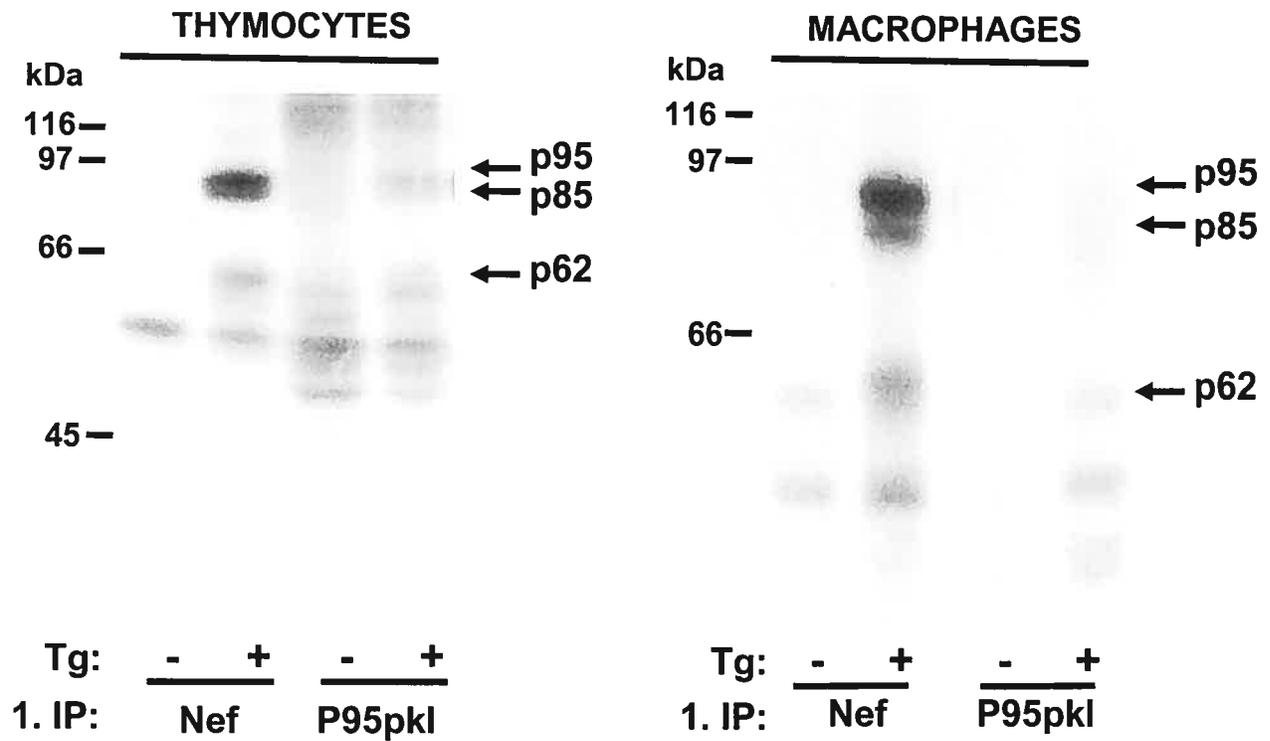


Figure 2-1: p95PKL est l'une des protéines cellulaires membre du complexe Nef/PAK2
 Une immunoprécipitation avec un anti-p95PKL ou un anti-Nef (utilisé comme témoin positif) dans 250 μ g d'extrait cellulaire de thymocytes et 100 μ g d'extraits cellulaires de macrophages péritonéaux provenant de souris Tg CD4C/HIV-Nef et non-Tg suivi d'un essai kinase fut effectué. Les substrats furent ensuite révélés par autoradiographie. Symbole IP, immunoprécipitation

L'association entre Nef et NAK est indépendante de la présence de VAV.

Différents groupes de recherche ont démontré que l'interaction entre VAV et Nef est impliqué dans l'apparition de différents phénotypes chez les cellules en culture (Quaranta *et al*, 2003, Fackler *et al*, 1999, 2000). De plus, VAV serait présent dans le complexe incluant PAK et Nef (Fackler *et al*, 1999). Afin de déterminer si VAV était présent dans un complexe avec Nef chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef, nous avons effectué un essai kinase suivant l'immunoprécipitation de Nef ou de PAK2 dans les thymocytes provenant des souris Tg CD4C/HIV^{mutA} et knock-out (KO) pour protéine VAV ainsi que chez les souris témoins CD4C/HIV^{mutA}, les souris VAV KO et les souris non-Tg (figure 2-2). Les résultats démontrent, comme attendu, la présence de substrats phosphorylés seulement chez les souris possédant le transgène suite à une immunoprécipitation avec un anti-Nef. Ces substrats sont également présents dans les thymocytes provenant des souris Tg croisées avec des souris VAV KO ce qui démontre que VAV n'est pas impliqué dans la formation du complexe Nef/NAK. Lorsque l'anti-PAK2 est utilisé pour l'immunoprécipitation, les substrats phosphorylés sont présents chez tous les échantillons mais le niveau de phosphorylation est augmenté lorsque Nef est présent, tel qu'observé lors des expériences précédentes. De plus, un fait surprenant est que le niveau de phosphorylation des substrats est plus élevé chez les thymocytes provenant de souris Tg déficiente en VAV comparativement aux souris Tg possédant VAV. Cette observation suggère que la perte de VAV et la présence de Nef accentue le niveau de phosphorylation des substrats. Cependant, afin d'affirmer cette hypothèse une expérience aurait dû être effectuée et il s'agit de démontrer le niveau de PAK2 immunoprécipité pour chaque échantillon.

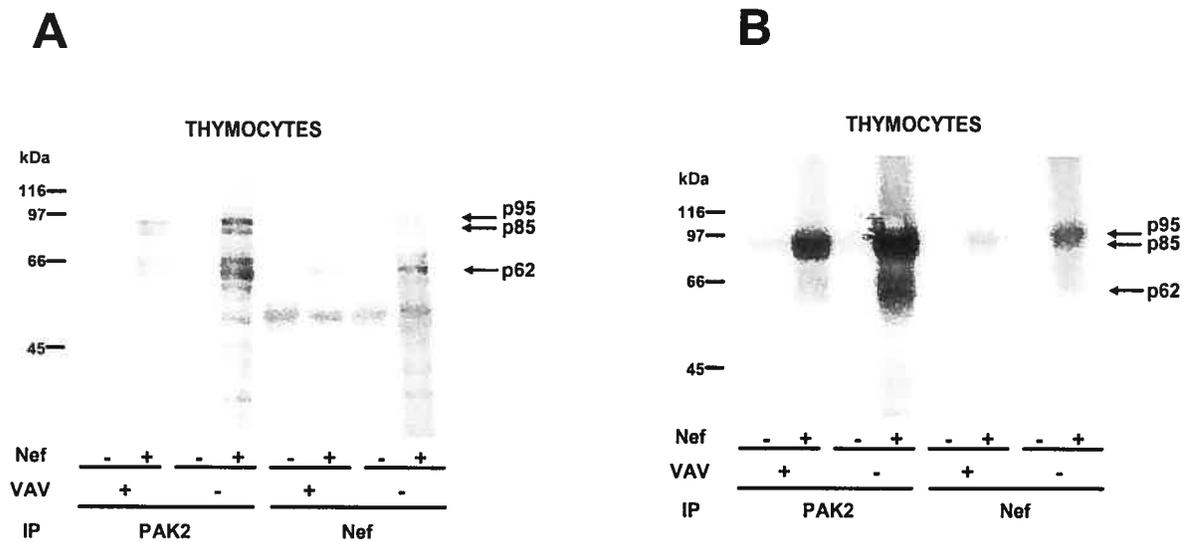


Figure 2-2: La protéine VAV n'est pas impliquée dans la formation du complexe Nef/NAK. Une immunoprécipitation avec un anti-Nef ou un anti-PAK2 dans 250 μ g d'extrait cellulaire de thymocytes provenant de souris hétérozygotes Tg et non-Tg et homozygotes Tg et non-Tg fut effectué. Chaque échantillon fut par la suite soumis à un essai kinase et les substrats furent révélés suite à une autoradiographie (A). Une exposition plus longue a permis de démontré la présence des substrats p85 et p95 dans les immunoprécipitations avec l'anti-PAK2 (B). Symbole IP, immunoprécipitation

Le mutant Nef^{T71R} démontre une plus grande phosphorylation de NAK et ses substrats.

La souche HIV-1 NL4-3 utilisé pour la génération des souris Tg est une souche dérivée pour l'utilisation en laboratoire (Kirchhoff *et al*, 1999). Le variant naturel de cette souche possède un arginine en position 71 à la place de la thréonine pour la souche de laboratoire. Nous avons donc voulu observer l'effet de la mutation Nef^{T71R} au niveau de l'interaction entre Nef et NAK (Figure 2-3). L'immunoprécipitation de Nef chez les thymocytes et macrophages provenant de souris Tg CD4C/HIV-Nef^{WT}, CD4C/HIV-Nef^{T71R} et non-Tg suivi d'un essai kinase démontre dans un premier temps la phosphorylation des mêmes substrats chez Nef^{T71R} que ceux retrouvés chez Nef^{WT}, c'est-à-dire p95 et p85 chez les thymocytes et macrophages ainsi que p62 chez les macrophages seulement. De plus, chez la souris Tg exprimant Nef^{T71R}, plusieurs nouveaux substrats sont présents comparativement à la souris exprimant Nef^{WT}. Ces derniers, principalement retrouvés chez les macrophages, représentent principalement des protéines phosphorylées d'environ 50, 35 et 30 kDa. Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a déterminé quels pourraient être ces nouveaux substrats. Également, chez les thymocytes de la souris Tg exprimant Nef^{T71R}, le substrat p62 est hautement phosphorylé et facile à visualiser ce qui n'était pas le cas pour tous les autres types de transgènes où nous avons effectué un essai kinase.

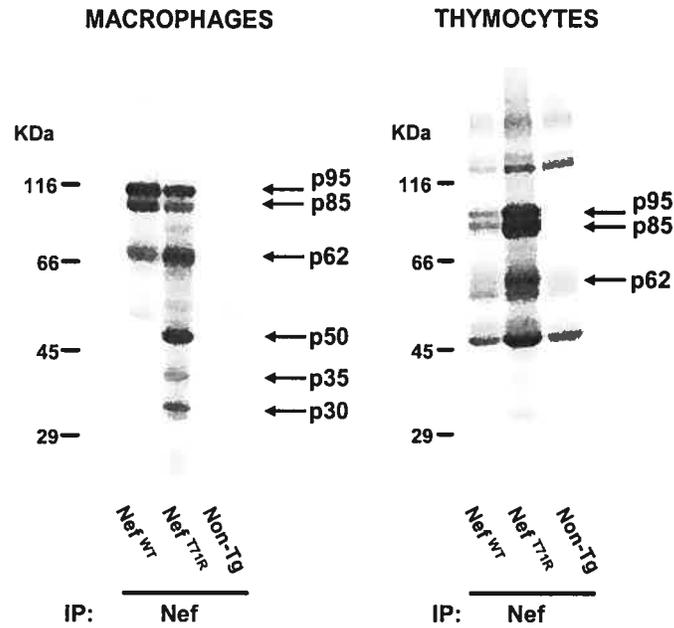


Figure 2-3: Un variant naturel de Nef ayant une mutation dans la région de polyproline (T71R) démontre une phosphorylation accrue de NAK et ses substrats. Une immunoprécipitation avec un anti-Nef dans 250 μ g d'extrait cellulaire de thymocytes et 100 μ g d'extrait cellulaire de macrophages provenant de souris Tg exprimant Nef^{T71R}, Nef^{WT} et de souris non-Tg suivi d'un essai kinase fut effectué. Les protéines phosphorylées sont révélées par autoradiographie. On peut noter la présence de substrats additionnels chez les macrophages provenant de la souris Tg exprimant la mutation T⁷¹R. Symbole IP, immunoprécipitation

L'interaction entre Nef et NAK est également présente chez différentes souches du VIH-1.

L'importance de l'isolat viral duquel provient le VIH-1 pour le niveau de réplication, pour son association avec NAK et pour la pathogénèse est clairement établi lors d'études *in vitro* ou chez les humains infectés par le VIH-1 (Luo et Garcia, 1996; Deacon *et al*, 1995). Avec l'aide de nouvelles souris Tg exprimant différentes souches du VIH-1, JRCSF, SF2, PYU10X, NP032, NP039 et NPAD1, (manuscrit en préparation) nous avons vérifié, *in vivo*, si Nef était toujours capable d'interagir avec NAK. Nous avons effectués un essai kinase suite à une immunoprécipitation avec un anti-Nef (provenant de la souche NL4-3) dans les macrophages péritonéaux et thymocytes provenant de ces nouvelles souris Tg et chez la souris Tg exprimant Nef^{WT} utilisée comme témoin positif. On peut observer à la figure 2-4 que l'expression de Nef provenant des souches PYU10X, SF2, NPAD1, NP039 et NP032 dans les thymocytes et macrophages permet de garder l'interaction avec NAK. Les substrats p62, p85 et p95 sont facilement distinguables pour tous ces allèles. À l'opposé, l'isolat JRCSF ne démontre aucune interaction entre Nef et NAK et son profil d'essai kinase est identique à celui retrouvé chez la souris non-Tg.

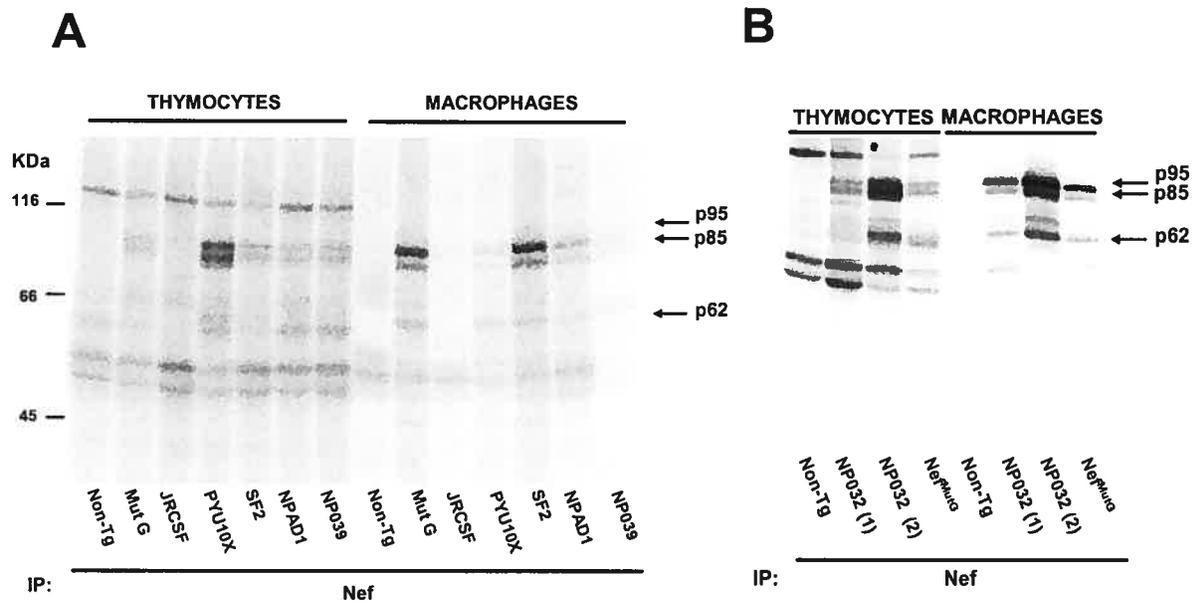


Figure 2-4 : L'interaction entre Nef et NAK est également présente chez diverses souches du VIH-1. Une immunoprécipitation avec un anti-Nef dans 250 μ g d'extrait cellulaire de thymocytes et 100 μ g d'extrait cellulaire de macrophages provenant des souris non-Tg et Tg exprimant les allèles du VIH-1 PYU10X, JRCSF, SF2, NPAD1, et NP039 (A) et NP032 (B) suivi d'un essai kinase fut effectué. Les protéines phosphorylées sont révélées par autoradiographie. Symbole IP, immunoprécipitation

L'expression de Nef dans une seule sous population cellulaire est suffisante pour permettre son interaction avec NAK.

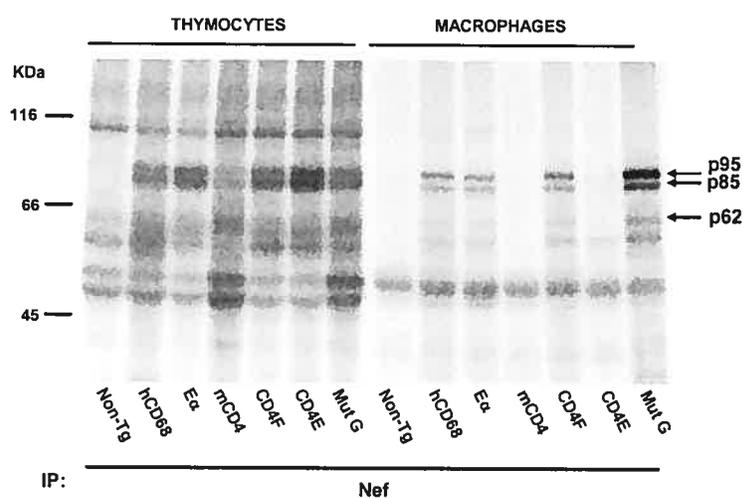
Chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef^{WT}, Nef est exprimé dans diverses sous populations cellulaires dont les macrophages/monocytes, les cellules dendritiques, les thymocytes CD4+CD8+ et les lymphocytes T CD4+. Cependant, nous ne savons pas si les phénotypes retrouvés chez cette souris Tg nécessitent la présence du transgène dans toutes les sous populations cellulaires ciblées ou si l'expression de Nef dans une seule population cellulaire est suffisante pour induire les phénotypes. Afin de répondre à cette question, Hanna *et al* ont construit des souris Tg qui expriment la protéine Nef seulement dans sous populations cellulaires ciblées par un promoteur spécifique (Hanna *et al*, en préparation). La figure 2-5 (A) illustre la spécificité cellulaire du transgène nef selon le promoteur utilisé. Nous avons tiré profit de la disponibilité de ces souris pour déterminer quelle sous-population cellulaire doit exprimer le transgène afin de permettre une interaction entre Nef et NAK. Nous avons effectué un essai kinase suite à une immunoprécipitation avec un anti-Nef dans les thymocytes et les macrophages de ces différentes souris Tg. On peut noter la présence de NAK et de ses substrats chez toutes les souris Tg exprimant Nef sous le contrôle de différents promoteurs. Lorsque Nef est exprimé dans une seule sous-population cellulaire que ce soit les lymphocytes T (mCD4, CD4E) les macrophages (hCD68) ou les cellules dendritiques (CD11c), Nef interagit avec NAK. On peut donc conclure que l'expression de Nef dans une seule sous population cellulaire est suffisante interagir avec la kinase qui lui est associée.

A

Promoteur	Expression cellulaire
CD4C	thymocytes doubles positifs macrophages/monocytes cellules dendritiques lymphocytes T CD4+
mCD4	lymphocytes T
CD4E	lymphocytes T
CD4F	lymphocytes T / macrophages
E α	Cellules dendritiques lymphocytes B macrophages
hCD68	macrophages
CD11C	cellules dendritiques

Selon la littérature scientifique

B



C

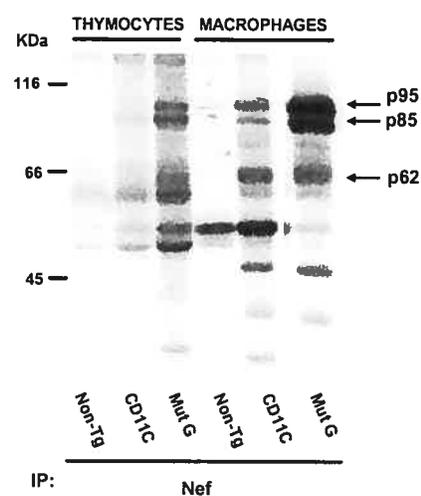


Figure 2-5: L'expression de Nef dans une seule sous population cellulaire est suffisante pour permettre l'interaction Nef/NAK. (A) Sous populations cellulaires exprimant le transgène selon le promoteur utilisé. Ces informations proviennent de la littérature scientifique Une immunoprécipitation avec un anti-Nef dans 250 μ g d'extrait cellulaire de thymocytes et 100 μ g d'extrait cellulaire de macrophages provenant des souris non-Tg et Tg exprimant Nef sous le contrôle de des promoteurs hCD68, E α , mCD4, CD4F, CD4E et CD4C (A) et CD11c (B) suivi d'un essai kinase fut effectué. Les protéines phosphorylées furent révélées par autoradiographie. Symbole IP, immunoprécipitation

NAK est présent dans les thymocytes doubles négatifs des souris CD4C/SHIV-*Nef*^{SIV}.

Nous avons clairement démontré que Nef interagit avec NAK dans trois populations cellulaires distinctes : les thymocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Cependant, dans la population thymique il existe quatre différentes sous-populations bien caractérisées qui sont les cellules double négatives CD4⁻CD8⁻, les doubles positives CD4⁺CD8⁺ et les simples positives CD4⁺ et CD8⁺. Simard *et al* ont démontré que les souris Tg CD4C/SHIV-*nef*^{SIV} possèdent un défaut de maturation thymique caractérisé par une diminution des thymocytes simples et double positifs mais une accumulation des thymocytes doubles négatifs (Simard *et al*, 2002). De plus, Stove *et al* ont démontré en utilisant un système culture de thymus foetal (fetal thymic organ culture (FTOC)) que Nef altère la thymopoïèse en diminuant significativement le nombre de thymocytes (Stove *et al*, 2003). En utilisant des protéines mutantes de Nef reconnues pour ne plus interagir avec PAK2 (Nef^{G2A} et Nef^{R106A}) ce groupe a démontré que la culture thymique foetale génère un nombre normal de thymocytes ce qui suggère que l'interaction entre Nef et PAK2 est important pour le développement des lymphocytes T.

Suite à ces observations, nous avons déterminé si l'interaction Nef/NAK est présente dans la sous-population thymique double négative provenant des souris Tg CD4C/SHIV-*nef*^{SIV}. Dans un premier temps, nous avons effectué un marquage des thymocytes des souris Tg CD4C/SHIV-*nef*^{SIV} et non-Tg avec des anticorps spécifiques aux marqueurs suivants : Thy 1.2 CD4, CD8, TcRαβ et TcRγδ. Sélectionnés suite au tri cellulaire, seulement les cellules positives pour le marqueur Thy 1.2 et négatives pour tous les autres marqueurs furent utilisées. Ces cellules correspondent aux thymocytes CD4⁻CD8⁻. Par la suite, nous nous sommes assuré par une réaction de RT-PCR que le transgène *nef* était exprimé dans cette sous-population cellulaire (non illustré). Les thymocytes double négatifs furent soumis à un essai kinase suite à l'immunoprécipitation de SIV Nef avec un sérum polyclonal dirigé contre la protéine Nef du VIS. Également, une immunoprécipitation de Nef (avec un sérum polyclonal dirigé contre la protéine Nef du VIH-1) dans les macrophages et thymocytes provenant des souris Tg CD4C/HIV^{mutG} et non-Tg a servi de témoin positif et négatif respectivement. On peut noter l'interaction entre SIVNef et NAK dans les thymocytes doubles négatifs provenant des souris CD4C/SHIV-

nef^{SIV} (Figure 2-6). Les substrats phosphorylés de la kinase qui interagit avec SIV Nef sont les mêmes que ceux retrouvés associés avec HIV Nef ce qui suggère une interaction de SIV Nef avec la même kinase que HIV Nef. On peut donc conclure que Nef s'associe avec NAK dans les thymocytes doubles positifs chez les souris Tg CD4C/SHIV-*nef*^{SIV}

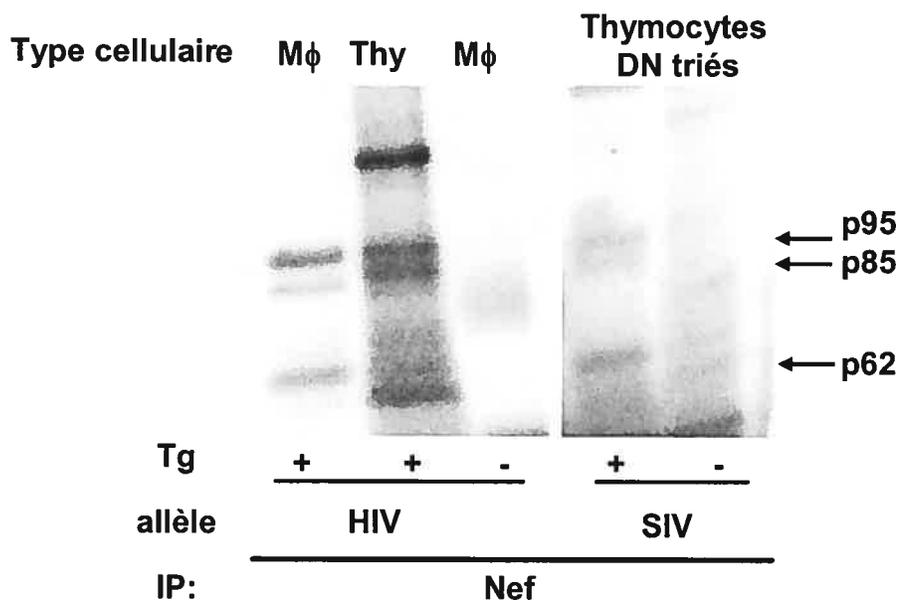


Figure 2-6: NAK est présent chez les thymocytes double négatif des souris CD4C/SHIV. Une immunoprécipitation avec un anti-Nef dans les thymocytes double négatif (DN) triés provenant des souris Tg CD4C/SHIV et non-Tg ainsi que dans les thymocytes et macrophages des souris CD4C/HIV^{Nef^{WT}} suivi d'un essai kinase a été effectué. Les échantillons ont été chargés sur un gel SDS-PAGE. Le gel a été séché et exposé sur un film autoradiographe. Symbole: Tg, transgène IP, immunoprécipitation Mφ, macrophage

NAK est absent dans la moelle épinière des souris MBP/HIV^{Nef}.

Une des cibles du VIH-1 est l'oligodendrocyte retrouvée dans le cerveau. Bien que l'infection de ces cellules par le VIH-1 soit difficilement démontrable (Pumarola-Sune *et al*, 1987; Gyorkey *et al*, 1987), des techniques plus sensibles ont permis de démontrer la présence du génome viral dans les oligodendrocytes (An *et al*, 1999). Il se pourrait que l'infection de ces cellules chez l'humain soit responsable de la myélopathie vacuolaire caractérisée par la présence de vacuoles interlamellaires dans la matière blanche de la moelle épinière. Afin de déterminer le rôle de Nef dans le développement de cette maladie, la souris Tg MBP/HIV^{Nef} a été produite et caractérisée (Radja *et al*, 2003). Ces souris Tg développent également une myélopathie vacuolaire caractérisée par une immaturité des oligodendrocytes et diminution des niveaux d'expression des protéines MAG, CMPase et MBP. Dans le but de vérifier si NAK joue un rôle dans les phénotypes observés chez la souris Tg MBP/HIV^{Nef}, des immunoprécipitations avec un anti-PAK2 ou un anti-Nef ont été effectués dans des lysats cellulaires provenant de la moelle épinière des souris Tg MBP-HIV^{Nef} et non-Tg ainsi que dans les macrophages péritonéaux non-Tg et de ceux provenant des souris Tg CD4C/HIV^{Nef} ont servis de témoins négatifs et positifs respectivement (Figure 2-7). Dans un premier temps, on peut observer que les substrats p62, p85 et p95 retrouvés dans les macrophages des souris CD4C/HIV^{Nef} sont absents dans la moelle épinière des souris Tg MBP-HIV^{Nef}. Également, lorsque l'anti-PAK2 est utilisé, aucune augmentation du niveau de phosphorylation n'est observée comme chez les souris Tg CD4C/HIV^{Nef}. Ces résultats démontrent que NAK est absent et n'influence aucunement l'activité kinase de PAK2 dans la moelle épinière des souris Tg exprimant Nef sous le contrôle du promoteur MBP.

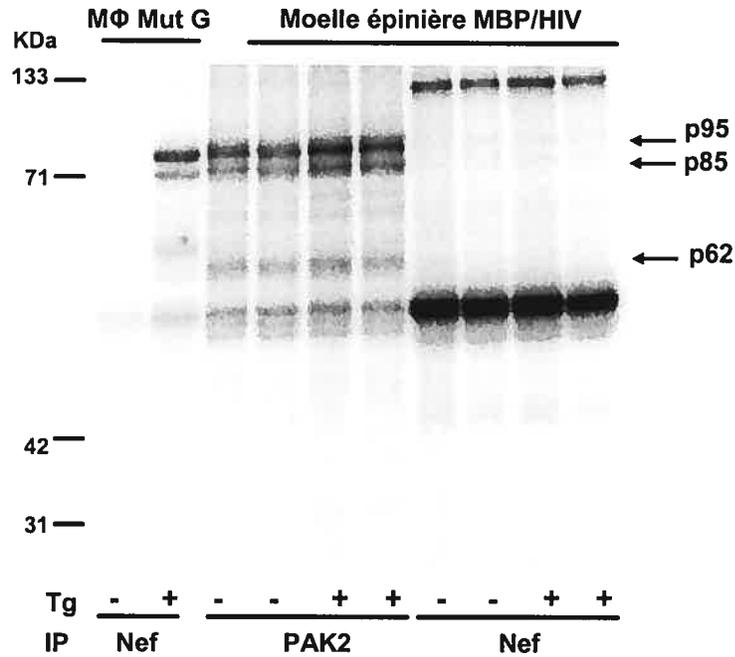


Figure 2-7: L'interaction entre Nef et NAK est absente chez les souris Tg MBP/HIV^{Nef}. Une immunoprécipitation avec un anti-Nef ou un anti-PAK2 dans 500 μ g d'extrait cellulaire de moelle épinière des souris MBP/HIV ou 100 μ g d'extrait cellulaire de macrophages provenant de souris CD4C/HIV^{Nef} servant de témoin positif suivi d'un essai kinase a été effectué. Les protéines phosphorylées sont révélées par autoradiographie. Symbole: Tg, transgène IP, immunoprécipitation MΦ, macrophage

CHAPITRE III

AVANT-PROPOS

Lors de l'infection par le VIH-1, différents types cellulaires peuvent être infectés et permettre ainsi la réplication du virus. Parmi ces cellules cibles on retrouve notamment les macrophages. Lorsqu'ils sont infectés par le VIH-1, les macrophages démontrent une altération de plusieurs de leurs fonctions biologiques en particulier, la sécrétion de chémokines et cytokines, la phagocytose et la capacité à éliminer des microbes intracellulaires. L'altération de toutes ces fonctions jouera un rôle éventuel dans la progression de la maladie du SIDA. Les études effectuées chez les macrophages proviennent majoritairement de cellules récoltées du sang de patients infectés par le VIH-1. Les effets observés sont donc causés par l'ensemble des gènes du virus.

Les effets de la protéine Nef sur l'altération des fonctions biologiques des cellules T sont largement documentés. Cependant, peu d'études ont porté sur les effets de Nef chez les cellules de la lignée monocyte/macrophage. Pour étudier le rôle de Nef dans l'altération des fonctions biologiques des macrophages, nous avons utilisé les macrophages péritonéaux provenant de souris Tg CD4C/HIV^{Nef} exprimant la protéine Nef dans les thymocytes doubles positifs, dans les lymphocytes T CD4⁺ et chez la lignée des monocytes/macrophages incluant les cellules dendritiques. Nous avons comparé diverses fonctions biologiques des macrophages péritonéaux provenant de souris Tg et non-Tg. Plus spécifiquement, la morphologie, l'endocytose/phagocytose, la sécrétion de cytokines, la capacité à éliminer des bactéries intracellulaires ainsi que la signalisation intracellulaire sont étudiés.

Les résultats de ces travaux seront soumis à la revue Journal of Immunology et je serai co-premier auteur avec Dragan Jovanovic. Les travaux furent initiés par le Dr Jovanovic et terminés par moi-même. Ma contribution à ces travaux est équivalente à celle du Dr Jovanovic. Plus précisément, j'ai caractérisé la morphologie des macrophages présentée à la figure 1 du manuscrit. Également, j'ai effectué les expériences de signalisation intracellulaire suite à la stimulation des cellules. Ces résultats sont présentés à la figure 6 du manuscrit. Les expériences d'endocytose et de phagocytose ainsi que la détermination de la viabilité des cellules ont été effectuées conjointement avec le Dr Jovanovic (figure 3 du manuscrit). Dans l'ensemble, la majorité des travaux portant sur l'étude des macrophages ont été partagés entre les deux premiers auteurs du manuscrit. Les résultats obtenus avec les souris "knock-out" pour les gènes iNOS et eNOS (figure 2 du manuscrit) et la quantification des cytokines sécrétées suite à la stimulation des cellules (tableaux I et II du manuscrit) sont les seuls auxquels je n'ai pas participé.

Functional characteristics of Nef-expressing peritoneal macrophages of CD4C/HIV^{MutG} transgenic mice following different stimuli

Dragan V. Jovanovic[‡], Patrick Vincent[‡], Elena Priceputu, Zaher Hanna, and Paul Jolicoeur

Clinical Research Institute of Montreal
Montreal, Quebec, H2W 1R7
Canada
Department of Medicine
Department of Microbiology and Immunology
Université de Montreal
Montreal, Quebec, H3C 3J7
Canada

[‡]: These two authors contributed equally to the work

Corresponding authors:

Dr Paul Jolicoeur, M.D., Ph.D.
Tel. #: (514) 987-5569
Fax #: (514) 987-5794
Email: [REDACTED]

Dr Dragan Jovanovic, M.D., Ph.D.
Tel. #: (514) 987-5531
Fax #: (514) 987-5794
Email: [REDACTED]

Running Title: Peritoneal macrophages of HIV Tg mice

Key Words: Macrophages, HIV, transgenic, Mice, Nef, Function

ABSTRACT

Rationale: Resident tissue macrophages are major targets for HIV-1. CD4C/HIV transgenic (Tg) mice express HIV-1 Nef protein in CD4⁺ T cells, macrophages and DC, and develop an AIDS-like disease. To define macrophage's dysfunction in this model, the function of peritoneal macrophages of these Tg mice was examined.

Methods: Purified resident peritoneal macrophages were stimulated with increasing concentrations of LPS and with IFN- γ . NO production was determined by Griess reaction. IL-1 β and TNF- α measurement was performed using ELISA kits. Cell viability was evaluated by MTT assay and cells undergoing apoptosis were determined by Annexin V staining. IgG-opsonized TexasRed-conjugated zymosan particles and heat-aggregated IgG were used for phagocytosis and endocytosis assays, respectively. rmMCP-5 was used for chemotaxis assay. For calcium mobilization assay INDO-1 AM loaded cells were stimulated with rmIL-17. Ionomycin was used to measure intracellular calcium stores. Acute Listeria infection in cultured peritoneal macrophages was used as a model of in vitro killing assay.

Results: Tg macrophages showed morphology of LPS-stimulated non-Tg macrophages and further LPS stimulation had no effect on their morphology. Significantly higher TNF- α ($p \leq 0.04$) and NO ($p \leq 0.04$) production by Nef expressing cells compared with control cells was found only when Nef was expressed in macrophages, T cells and dendritic cells. The percentage of non-stimulated Tg macrophages able to internalize aggregated IgG was significantly higher ($p \leq 0.01$) when compared with non-Tg cells. LPS stimulation significantly increased ($p \leq 0.001$) the phagocytosis by non-Tg macrophages, while no effect of this stimulation on the zymosan internalization by Tg cells was found. Tg cells showed slightly decreased level of migration in response to MCP-5 compared to control cells. Decreased viability and increased Annexin V staining were found after LPS stimulation of Tg macrophages. Nef-expressing macrophages showed a delayed IL-17-induced calcium mobilization and increased intracellular calcium store content compared to control cells. There was no significant difference between Tg and non-Tg mice in their capacity to kill intracellular Listeria. Finally, iNOS and eNOS are found to be dispensable for organ disease.

Conclusion: Nef-expressing macrophages from CD4C/HIV MutG Tg mice exhibited functional impairments following different stimuli. These findings are similar to results obtained with macrophages from AIDS patients. Our HIV Tg mice can be used to further study macrophage dysfunction caused by HIV.

INTRODUCTION

Following HIV-1 infection of human cells *in vivo* and *in vitro*, a number of monocyte/macrophage functions are impaired, including chemotaxis (31,32), intracellular killing of microbes (33), phagocytosis (33,35), and cytokine production (35). The mechanisms by which HIV-1 impairs effector functions of macrophages are still unclear.

The CD4C/HIV Tg mice develop an AIDS-like disease with several features remarkably similar to those found in human AIDS. These include immune dysfunction (thymic atrophy destruction of the lymphoid organ architecture, loss of CD4⁺ T cells, increase of B cells, activation of T and B cells, loss of helper CD4⁺ T cell function with impaired germinal center formation), lung, kidney and heart diseases (1,9)

Cells of macrophage lineage represent a key target of human or similar immunodeficiency virus (HIV, SIV) in addition to CD4 T lymphocytes. Resident tissues macrophages, such as alveolar macrophages, peritoneal macrophages, placental macrophages and microglia have been reported to constitute major targets for HIV-1 or SIV. Tissue macrophages infected with HIV-1 or SIV are resistant to cytopathic effects and persist throughout the course of infection (5). As the half-life of macrophages ranges from as long as two months for alveolar macrophages to decades for microglial cells (6), tissue macrophages can act as long-term stable reservoirs for HIV-1 capable of disseminating the virus to the tissues (7,8). In addition, HIV-1 infected macrophages are thought to contribute on their own to the pathogenesis of AIDS and to the breakdown of resistance against various pathogens. In particular, the Nef gene product of SIV or HIV has been found to be responsible for the increased release in supernatants of macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α and MIP-1 β , as well as of still unidentified soluble factor(s) able to activate lymphocytes (13,14). It was already reported that the functional characteristics of HIV macrophages in humans and animal models dependent on the stage of the disease (15,16).

However, although large amounts of information have been accumulated on the effect on Nef in T cells, much less is known about the effects of Nef on monocyte/macrophages. In order to better define the macrophage dysfunction induced by Nef, we examined the function of peritoneal macrophages expressing HIV-1 Nef protein in CD4C/HIV Tg mice, a murine model of AIDS.

The CD4C/HIV^{wt} Tg mice express HIV-1 in the same natural target cells of the virus in humans, namely immature thymic CD4⁺CD8⁺ T cells, mature thymic and peripheral CD4⁺ T cells and in cells of the macrophage/dendritic lineage. Among cells of this latest lineage, expression of HIV-1 has been documented in peritoneal and alveolar and tissue macrophages, in microglial cells, in Kupffer cells and in dendritic cells (DC). These CD4C/HIV Tg mice develop a very severe AIDS-like disease. The disease involves immune defect of the lymphoid organs (thymic atrophy, preferential loss of CD4⁺ T cells, activation of CD4⁺ T cells and B cells, germinal center formation, presence of auto-antibodies, loss of dendritic cells) as well as other organs notably the lungs (lymphocytes interstitial pneumonitis), kidney (interstitial nephritis, segmental glomerulosclerosis) and the heart (cardiomyolysis, myocarditis) (9, 94).

Here, we present data showing that Tg peritoneal macrophages from CD4C/HIV Tg mouse have impaired capacity in the spreading process. Endocytosis and phagocytosis assays reveal that these cells have an increased basal activity and are impaired to respond to LPS stimulation for these two functions compared to their non-Tg control. Tg peritoneal macrophages also showed a basal increase production of NO and COX2 protein that correlates with the increase NO production in the supernatant of cell culture.

MATERIAL AND METHODS

Tg mice

The CD4C/HIV^{MutG} transgene (Tg) was constructed by mutating the NL4-3 HIV-1 genome of the CD4C/HIV^{wt} Tg as previously described (9). HIV-1 transgenic model was created in C3H mice and maintained in the heterozygous state with respect to the HIV trans-gene. As human CD4 promoter controlled the expression of viral gene in these mice, HIV Nef protein was detected in T cells, macrophages and dendritic cells (DC). CD4CHIV^{MutG} Tg deficient mice for inducible isoform of nitrogen oxide synthase (NOS2), (iNOS^{-/-}) (11) or for constitutive endothelial isoform of this enzyme (NOS3) (eNOS^{-/-}) (92) were generated by crossbreeding of iNOS^{-/-} and eNOS^{-/-} mice with CD4C HIV^{MutG} Tg mice. Sex-matched, non-Tg and Tg littermates between 8 and 10 weeks of age were used, and displayed no visible signs of HIV-related disease (wasting, diarrhea, renal or lung disease). All animals were housed in specific pathogen free animal facility.

Harvesting of peritoneal macrophages

Resident peritoneal macrophages were harvested from mice by peritoneal lavage. Peritoneal cavities were flushed with 10 ml (2 X 5 ml) of RPMI containing 10% fetal calf serum (FCS; HyClone, Utah). Cells were washed with cold phosphate-buffered saline (PBS) by centrifugation, counted and resuspended in RPMI 10% FCS, antibiotics (penicillin 100 U/ml and streptomycin 100 µg/ml) and plated on tissue culture-treated plastic. 3 hours later non-adherent cells were removed by repeated (3X) washing with pre-warmed (37 °C) PBS and mono-layers replenished with fresh RPMI 10% FCS. The purity of recovered cell population was assayed by FACS analysis by means of PE-conjugated anti-Mac-1, and anti-CD3 antibodies as well as by FITC-conjugated anti-B220 antibodies. The purified cells were at list 97% positive for Mac-1 antigen. For morphological study 10⁵ macrophages were stimulated in 8 chamber tissue culture treated glass slides (Labtek, Becton Dickinson) for additional 12 h with lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/ml to 500 ng/ml). Morphology of the cells was afterwards analyzed under the light microscope.

Histological analysis

A group of 15-20 Tg animals and an equivalent number of non-Tg littermates were generated from each line. Mice were sacrificed and lymphoid and non-lymphoid organs

were collected and embedded in paraffin blocks. Sections (5 μm) were processed for microscopic and histological assessment, essentially as previously described (9,40).

Measurement of nitric oxide (NO), IL-1 β and TNF- α production

Peritoneal cells were plated at a density of 5×10^5 cells/well (24-well/plate) for 4 hours and then washed to remove non-adherent cells as described above. The plated cells were incubated in the presence of increasing concentrations (0, 20, 100, and 500 ng/ml) of LPS (Sigma) and INF γ (100 mg/ml), (Sigma, for 5 days in a total volume of 0.4 ml. NO production was measured by determining the stable NO metabolite, nitrite, in conditioned medium, by modified Griess reaction. Measurement of IL-1 β and TNF- α was performed using IL-1 β and TNF- α kits (BioSource International Inc., CA). The minimum detectable dose for mIL-1 β and mTNF- α was less than 7 pg/ml and 3 pg/ml, respectively.

Endocytosis of Immune Complexes

Endocytosis was determined Using flow cytometry by measuring the uptake of FITC-labeled heat-aggregated mediated by the Fc γ R. 250 μl of biotinylated rabbit IgG (Pierce), (10 mg/ml solution in PBS) was heated to 63 $^\circ\text{C}$ for 30 min to partially denature and aggregate the immunoglobulins. These complexes were labeled by addition of 5 μg of FITC-conjugated streptavidin. Resuspended peritoneal macrophages (HBSS plus 1% BSA) were incubated with immune complexes at a final concentration of 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 20 min at 37 $^\circ\text{C}$. Cells were washed in HBSS and surface-bound immune complexes were removed by PBS treatment, pH 2.5, for 1 min at 4 $^\circ\text{C}$. After an additional HBSS wash, cells were fixed in 1% paraformaldehyde in PBS, and analyzed by flow cytometry to measure endocytosed IgG.

Phagocytosis Assays

Phagocytosis of IgG-opsonized Texas Red-conjugated zymosan particles (Molecular Probes) was carried out as described (XI-21). Briefly, zymosan particles (100 μl) were incubated for 30 minutes at 37 $^\circ\text{C}$ with 100 μl of purified rabbit polyclonal IgG antibodies that are specific for the zymosan. Washed IgG-opsonized particles (5×10^5) were added to confluent monolayer of peritoneal macrophages cultured in 96-well black-sided tissue culture plates (Corning Incorporates 3603). Plates were centrifuged at 150g for 45 sec. Cells were then incubated on ice for 30 min and un-bond particles were removed by washing with PBS. Phagocytosis was initiated with the addition of 37 $^\circ\text{C}$ pre-warmed medium. To stop the endocytosis, 2% paraformaldehyde was add to the washed cells

removed from 37°C at the indicated times. The fluorescent plate reader (Molecular Devices) was used to measure total fluorescence. Then, fluorescence from bound but not internalized zymosan particles was quenched by addition of 2 mg/ml trypan blue in 0.15 M NaCl/20 mM sodium citrate buffer, pH 4.4 and the plate was reread in the fluorescent plate reader. Percentage of phagocytosis was calculated by dividing the value of the trypan blue-quenched signal by the total fluorescence for each well.

Photomicroscopy

For the photomicroscopy, macrophages were cultured on 8 chamber tissue culture treated glass slides (Becton Dickinson). Phagocytosis of IgG-opsionized Texas Red-conjugated zymosan particles was carried out as described above. Cells were then washed twice in PBS and fixed in 3% paraformaldehyde for 15 min on ice. After three more PBS washes, cells were stained with FITC-conjugated phalloidin (Sigma) for 40 min at room temperature. Cells were washed twice in PBS and fixed in 1% paraformaldehyde for 10 min. Digital images were captured in two fluorescent channels on a Zeiss LSM 510 microscope. Actin polymerization after antigenic modulation was visualized by staining the cells with FITC-phalloidin as previously described (12).

Chemotaxis Assays

Chemotaxis assays were performed using 5.0 µm pore size filters (Transwell, 24-well cell clusters; Costar, Boston, MA) as described elsewhere (21). In brief, 4×10^5 purified resident peritoneal macrophages suspended in 300 µl of migration medium (RPMI, 0.5% BSA) seeded onto polycarbonate membranes of trans-well inserts that closely fitted into 48-well plates. Filters were then transferred to another well containing 600 µl of migration medium with 75 µg/ml of recombinant mouse MCP-5/CCL12 (R&D System). The plates were incubated for 10 hours at 37 °C and 5% CO₂. The upper chambers were then removed and the cells in the bottom chambers were washed with PBS resuspended and quantitated using the trypan blue exclusion method.

Cell Viability

Cell viability in a 96-well culture plate was evaluated using a modification of the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (22). 5×10^5 of peritoneal cells were adhered as described above. For the colorimetric MTT assay, 10 µl MTT, a soluble tetrazolium salt solution (5 mg/ml in PBS), was added to the wells, containing 100 µl medium, and the plate was incubated for an additional 4 h. Thereafter,

100 μ l solubilisation solution (0.04 M HCl-isopropanol) was added to dissolve the water-insoluble formazan salt. Quantification was then conducted with ELISA reader at 590 nm. Results were expressed as OD units per 10^4 adherent cells.

Annexin V Staining

Annexin V-FITC was used to quantitatively determine the percentage of the cells undergoing apoptosis. Briefly, 1×10^5 peritoneal resident macrophages were washed twice with cold PBS and then resuspended in binding buffer (10 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl). The cells were incubated with 5 μ l Annexin V-FITC and 10 ml PI (Propidium iodide, 50 μ g/ml in PBS) for 15 min at room temperature in the dark. 400 ml of binding buffer was added and the cells were analyzed immediately by Flow cytometry.

Calcium Mobilization and Intracellular Free Ca^{2+} Concentrations [Ca^{2+}]

For calcium (Ca^{2+}) mobilization assays (23), peritoneal resident macrophages (10^7 cells/ml in HBSS without phenol red, 0.1% BSA) were loaded with 5 μ M INDO-1 AM (Molecular Probes) for 45 min at 37 °C in the dark. The loaded cells were washed twice, resuspended at 5×10^6 cells/ml and let to rest for about 15 min. 0.2 ml of loaded cells (10^6 cells) were stimulated with rmIL-17 (100 ng/ml) and the calcium flux was recorded for indicated period of time. Ionomycin (15 μ g/ml) was used as a control of INDO-1 AM loading. To separate the initial Ca^{2+} release phase from the subsequent Ca^{2+} influx phase, the following protocol was used. Cells were kept in a Ca^{2+} -free medium. Under this conditions, the [Ca^{2+}]_c increase in response to ionomycin stimulation was used as a measure for Ca^{2+} release.

Anti Fc γ R stimulation of peritoneal macrophages

Stimulation of peritoneal macrophages was performed as described (79). Briefly, resident macrophages were seeded at 3×10^6 cells per well in a 6-well culture plate in 3 ml 10% FCS-Iscove. 3 hours later non-adherent cells were removed by repeated wash with pre-warmed PBS. Adherent macrophages were incubated on ice with 10 μ g of rat anti-mouse anti-CD16 (clone 2,4G2, Pharmingen) for 30 min. Peritoneal macrophages were then warmed at 37 °C and cross-linked with goat anti-rat (10 μ g) for 5 min. Cells were then lysed as described below.

Western Immunoblots

Peritoneal resident macrophages were washed with ice-cold PBS once and lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml each of aprotinin, leupeptin, and pepstatin, 1% Nonidet P-40, 1 mM sodium orthovanadate, and 1 mM NaF). The cell lysate was incubated on ice for 30 min and then boiled for 5 min. The supernatant (10 µg of proteins) was subjected to SDS-PAGE through 9% gels (final concentration of acrylamide) under reducing conditions and transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham, Oakville, Canada). After blocking with Superblock blocking buffer in TBS (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) and washing, the membranes were incubated overnight at 4 °C with primary Ab in the blocking buffer as above and 0.05% Tween 20. The Abs used were polyclonal anti-mouse phospho-p38 MAP Kinase, anti-mouse phospho-p44/42 Map Kinase (1:1000) dilution, Cell Signaling technology), A second anti-rabbit antibody-horseradish peroxidase (HRP) conjugate (1:10000 dilution) was subsequently incubated with the membrane specimens for 1 hour at room temperature, and then was washed extensively with TBST. Following incubation with the SuperSignal Ultra Chemiluminescent substrate, membranes were prepared for autoradiography, exposed to X-omat film (Eastman Kodak, Rochester, NY), and then subjected to a digital imaging system (Alpha G-imager 2000). Results were calculated as relative units. All values were normalized to those obtained for actin. To detect Nef protein, actin or phosphotyrosine proteins, 50 µg of cell lysates were loaded into a 8% SDS-PAGE and transferred onto PVDF membrane. Following an O/N blocking in 5% skim milk/TBS-tween 0.1%, the membrane was blotted for 2 hours with anti-phosphotyrosine Ab (1:1000, Upstate biotech), anti-Nef polyclonal serum (1:1000) or anti-actin (1:1000, Sigma). Proteins were visualized by incubating the membranes with secondary antibodies coupled to Alexa 680 fluorochrome followed by scanning with Odyssey[®] infrared imaging system (Licor). Quantification of phosphorylated proteins was achieved using the Odyssey[®] software (Licor).

In vitro killing assay

Acute *Listeria* infection in cultured peritoneal macrophages has been used as a model of *in vitro* killing assay. Modified protocol of Beckerman *et al* was performed to measure killing efficacy (97). Briefly, peritoneal resident cells were plated for 4 hours at a density of 10⁶

cells per well (24-well plate). Non-adherent cells were removed and monolayers were cultured for 24 hours in RPMI 10% FCS, washed with RPMI without antibiotics and activated with LPS (500 ng/ml) and IFN γ (100 U/ml) for an additional 12 hours. Live *L. monocytogenes* was added (2×10^5 /well) in fresh RPMI without antibiotics, LPS and IFN γ . The plates were centrifuged at room temperature for 10 minutes at 3000 rpm and incubated for 70 minutes at 37 °C (5% CO $_2$). In order to kill extra-cellular bacteria the cultures were treated for additional 5 hours with gentamycin (5 μ g/ml). Triton X-100 (0.05%) was used to lyse the cells and in PBS diluted lysate were plated on BHI agar for the determination of viable counts. Prior to the addition of gentamycin, control wells were lysed to determine the total number of viable bacteria exposed to macrophage monolayer. Dividing the number of bacterial colonies by the number of viable macrophages at the time when *L. monocytogenes* was added normalized the Listeria survival expressed as relative units.

Statistical Analysis

Values were expressed as the mean \pm SEM; n values refer to the number of different mice. Statistical significance was assessed using Student's *t*-test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS

Nef expression alters the morphology of peritoneal macrophages,

Quality control of peritoneal macrophages was performed by FACS analysis with MAC1, B220 and Thy 1.2 markers. 97% of adherent purified cells expressed mac-1 antigen. This population contained only 2% of B cell specific antigen (B220) and 1% of T cell specific CD3 marker (data not shown). Western blot analysis confirmed the presence of Nef protein in peritoneal macrophages of Tg mice (Fig 1A). Mac-1 positive peritoneal macrophages of Tg mice showed slightly higher expression of activation and antigen presenting cell specific marker MHC II (72.7% vs 67.8%, respectively), (data not shown). Although this difference is not statistically significant, it may suggest that Nef-expressing peritoneal macrophages of Tg mice are *in vivo* more pre-activated as compared to the non-Tg control, We next looked at the cell morphology plated peritoneal macrophages either treated or not with LPS during a time course experiment. The morphology of Tg macrophages differed from that of the control cell population. Without LPS treatment, Tg macrophages exhibit a more rounded morphology whereas non-Tg control showed an elongated phenotype characteristic of adherent macrophage (Fig 1B). The biggest difference between Tg and non-Tg macrophages morphology was obtained following 3 hours of plating. After 6 hours of adhesion, this difference was not anymore visible. Each cell population displayed typical morphology of adherent macrophages with long dendrites (Data not shown). Following LPS treatment of Tg and non-Tg macrophages, the difference observed between both cell populations was less obvious. Cells from Tg and non-Tg mice displayed a similar mature rounded morphology with smooth plasma membrane and significantly fewer prolongations caused by LPS treatment. In addition, quantification of the size of non-stimulated peritoneal macrophages showed that Tg macrophages had a significantly reduced diameter compared to their control (Fig 1C). Furthermore, non-treated peritoneal macrophages from Tg mice were also more elongated than non-Tg cells (Fig 1D). Taken together, these results suggest that peritoneal macrophages of HIV Tg mice are more mature than normal peritoneal macrophages and that these cells answer poorly to additional LPS stimulation. To further characterize the spreading dysfunction observed in Tg macrophages, we looked to the actin content with a phalloidin staining on these cells following their adhesion. Because podosome formation is better seen when cells adhere to glass surface ((80), data not shown) we select this type of surface to look at actin

redistribution following adhesion. As shown in Fig 1E, the phalloidin treatment on peritoneal macrophages adhered onto glass revealed a cup-like shape actin staining. These structures have been described by other group as podosomes (80, 81). We can observe that a significant increase of Tg macrophages displayed podosomes compared to the non-Tg control. Stimulation of macrophages with LPS did not augment the number of cells expressing podosome whereas there was an increase for the control cells (Fig 1 E, F). Again, Tg macrophage could not respond to LPS stimulation.

Altered TNF- α and NO production in Tg peritoneal macrophages

To examine cytokine profile secreted by peritoneal macrophages we measured *in vitro* IL-1 β and TNF- α secretion by Tg and non-Tg cells (Table I). These two cytokines have been chosen because they are key mediators of the body response to inflammation (26) and although they share many activities, their expression and secretion are quite distinctly regulated (26, 27). No difference between non-Tg and Tg macrophages in the steady state of TNF- α production could be found. Increased concentration of LPS stimulation significantly augment TNF- α secretion in Tg macrophages as compared to the control cells. In contrast, LPS-stimulation (20ng/ml and 100 ng/ml) was not able to significantly increase the basal IL-1 β production both in non-Tg and Tg macrophages. Although, in all LPS concentrations used there was a trend of increased IL-1 β secretion by non-Tg macrophages but the differences did not reach statistical significance.

In mice and rats macrophages the synthesis of NO is induced by several cytokines by the activation of the inducible form of NO synthase. The basal NO production of Tg macrophages was higher than what found in non-Tg macrophages (Table 1). The nitrite concentration in the culture supernatants of Tg macrophages was found to be higher than that found in the supernatants of control cultures for all used LPS concentrations.

iNOS and eNOS are dispensable for organ disease

Overproduction of NO, usually caused by inducible NO synthase (iNOS), which is mainly expressed in inflammatory phagocytic cells, or endogenously NO secreted by epithelial (eNOS) or neuronal cells (nNOS) could have a variety of deleterious effects contributing to AIDS, including the organ diseases (88). As the NO production by LPS -stimulated Tg macrophages was found to be increased only in CD4CHIV^{MutG} Tg mice

(Table I) we wanted to know if NO may be implicated in the lung and kidney diseases, we already described in this model of HIV Tg mice (9). This was tested in iNOS deficient (iNOS^{-/-}) and eNOS (eNOS^{-/-}) deficient CD4CHIV^{MutG} Tg mice. We first calculated the incidence of mortality of each line. There was no significant difference between iNos^{-/-} and eNOS^{-/-} Tg compared to iNos^{-/-} and eNOS^{-/-} non-Tg animals (Fig 2A). Histological examination demonstrate that 62% of iNOS^{+/-} HIV Tg mice and in 66% of iNOS^{-/-} HIV Tg mice displayed interstitial infiltration, tissue condensation, and mild perivascular and peribronchial mononuclear cell accumulation (Fig. 2B). Similar pathological changes in the lung were found in 50% of eNOS^{+/-} HIV Tg mice and in 67% of eNOS^{-/-} HIV Tg mice (Fig. 2B). In 100% of iNOS^{+/-} HIV Tg mice and iNOS^{-/-} HIV Tg mice as well as in 100% of eNOS^{+/-} and eNOS^{-/-} HIV Tg mice, interstitial mononuclear cell infiltration, tubular epithelium atrophy and tubular dilatation as well as initial glomerular sclerosis in kidney was found (Fig 2B). These results demonstrated that iNOS and eNOS function is not required for lung and kidney diseases in our model of HIV Tg mice. This conclusion is supported by the findings of no differences in mortality incidence between NOS^{+/-} and NOS^{-/-} Tg mice for both forms of NOS (Fig. 2)

Impaired internalization and decreased viability

Internalization of soluble immune complexes and Ig-coated particles (>1 μm in diameter) was examined by measuring endocytosis and phagocytosis, respectively. Although both processes are Fc γ R-mediated ligand internalization, phagocytosis is distinguished from endocytosis by a requirement for actin polymerization, tyrosine kinase and PI3 kinase activation, and absolute inhibition at temperatures below 18° C (28). The percentage of the non-stimulated non-Tg peritoneal macrophages that were able to internalize FITC-labeled heat-aggregated IgG (9.4 ± 1.7) was significantly less ($p < 0.01$) when compared with Tg macrophages (25.7 ± 3.2), (Fig. 3A). LPS stimulation significantly increased the endocytosis (4.8 fold) both by non-Tg ($44.9 \pm 6.7\%$, $p < 0.007$) and 1.6 fold by Tg macrophages ($39.9 \pm 1.4\%$, $p < 0.02$) as compared with the non-stimulated controls.

An assay for phagocytosis based on the ingestion of IgG-coated zymosan particles was used to measure the rate of phagocytosis accurately. Fig. 3B shows a time course experiment in which the decreased capacity of phagocytosis of Tg macrophages is evident.

At the early time point (10 min) non-stimulated and LPS-stimulated non-Tg and Tg macrophages internalized equally of the bound zymosan. At 30 min the defect in Tg macrophages was the greatest. By 30 min non-stimulated non-Tg macrophages have internalized $19.6 \pm 1.4\%$ of the bound zymosan particles which is significantly less ($p < 0.005$) as compared with the non-stimulated Tg cells ($34.1 \pm 3.7\%$). However, LPS stimulation significantly increased ($p < 0.001$) the phagocytosis by non-Tg macrophages ($40.7 \pm 3.5\%$) when compared with the non-stimulated cells, while this stimulation had no effect on the zymosan internalization by Tg macrophages ($32.8 \pm 3.4\%$ Tg vs $34.1 \pm 3.7\%$ non-Tg). Poorer phagocytosis by Tg macrophages was not due to the down-regulation of phagocytic receptors. We found that non-Tg and Tg macrophages displayed equivalent cell-surface levels of FcγRII and III as determined by flow cytometry (264.5 ± 13.7 mean int. non-Tg vs 281.1 ± 26.3 mean int. Tg), (Fig. 3C). These results suggest that the inhibition of phagocytosis occurs after receptor binding. Fig. 3D shows impaired actin polymerization in Tg macrophage after antigenic modulation induced by the incubation of macrophages by anti mac-1 monoclonal antibodies. Defective actin remodeling is a potential mechanism underlying impaired phagocytic function by Nef-expressing peritoneal macrophages of HIV Tg mice.

Cell viability of 12-hour adherent peritoneal control and LPS-stimulated macrophages was measured by MTT test. There was no difference between non-stimulated non-Tg and non-stimulated Tg macrophages (OD 0.87 ± 0.05 and 0.87 ± 0.07 , respectively), in the capacity of mitochondria to oxidize a soluble tetrazolium salt (Fig. 3E). After LPS stimulation of non-Tg cells, viability significantly increased (OD 1.12 ± 0.12 , $p < 0.05$), when compared with non-stimulated cells, while LPS-stimulated Tg macrophages showed a tendency of decreased mitochondrial activity (OD 0.78 ± 0.01). This is in concordance with the results of FACS analysis of Annexin V binding (Fig. 3F) which was used to determine the percentage of the cells undergoing apoptosis. Increased cell viability of non-Tg macrophages after LPS stimulation was accompanied by the decrease of Annexin binding ($11.3 \pm 1.6\%$ LPS-stimulated vs $20.1 \pm 2.3\%$ non-stimulated), while decreased cell viability of LPS-stimulated Tg macrophages was followed by an increase in the number of cells with surface phosphatidyl serine expression ($30.4 \pm 4.1\%$ LPS-stimulated vs $20.5 \pm 0.9\%$ non-stimulated).

Migration of Nef-expressing macrophages in response to MCP-5

Performing cell migration assay, as described in Material and Methods, assessed the effect of Nef on chemotaxis of peritoneal macrophages. Macrophages obtained from CD4CHIV^{MutG} Tg mice showed slightly decreased level of migration in response to chemotactic stimuli (MCP-5) as compared to the control cells (data not shown). Migration level of non-stimulated non-Tg and Tg macrophages was $36.0 \pm 3.2\%$ and $30.6 \pm 3.2\%$ of total cells, respectively. After LPS-stimulation the migration level of non-Tg and Tg macrophages reached $42.8 \pm 5.8\%$ and $34.0 \pm 1.8\%$ of total cells, respectively. However, these differences were not statistically significant.

Calcium mobilization

$[Ca^{2+}]_i$ was monitored using the fluorescent Ca^{2+} indicator FURA-1 AM. We performed side-by-side experiments on both non-Tg and Tg macrophages. As the answer of peritoneal macrophages to LPS stimulation was very modest with respect to Ca^{2+} mobilization (data not shown), IL-17, which we reported to induce the increase in $[Ca^{2+}]_i$ in monocyte/macrophages (26), was used. Non-transgenic macrophages showed a typical increase in the intracellular Ca^{2+} concentration after IL-17 stimulation (360 ± 48 FL4/FL5:RATIO) while the mobilization of Ca^{2+} in Tg macrophages was found to be delayed (284 ± 31 FL4/FL5:RATIO), (Fig. 4A, the traces are representatives of more than 6 experiments), expressed as bound vs free FURA-1 AM. As a control of the correct FURA-1 loading a characteristic Ca^{2+} mobilization after Ionomycin stimulation was observed both in control and Tg cells. Delayed agonist-induced Ca^{2+} influx in Nef-expressing cells was not due to the decreased expression of IL-17R. The same percentage of IL-17R positive non-Tg and Tg cells (44.3 ± 3.6 and 41.4 ± 2.2 , respectively) showed the same mean of fluorescence intensity (269.2 ± 13.7 non-Tg vs. 291.0 ± 39.6 Tg) after staining with specific anti-IL-17R antibodies, (Fig. 4B). The IL-17R expressed on Tg macrophages was found to be functional. These cells answered to IL-17 stimulation by higher NO production when compared with control macrophages (data not shown). The NO production after IL-17 stimulation was induced by stimulation of inducible nitric oxide synthase expression in non-Tg and Tg cells (Fig. 4C). Although the measurements of prostaglandins were not performed in this experiment, we presume that the production of these hormones was also stimulated as the inducible isoform of cyclooxygenase (COX2)

was induced after IL-17 stimulation. This results showed that the defect in calcium mobilization occurred downstream of IL-17R activation. In separate experiments in which the cells were kept in Ca^{2+} -free medium we found that Nef-expressing macrophages displayed a significantly higher Ca^{2+} content (712 ± 25 FL4/FL5 mean, $p < 0.01$) in ionomycin-sensitive stores, when compared with control cells (585 ± 14 FL4/FL5 mean) (Table II). At the same time, time peak of Ca^{2+} mobilization from intracellular stores was significantly less ($p < 0.001$) in Tg cells when compared to non-Tg control (77 ± 44 sec vs 162 ± 32 sec, respectively). This would be compatible with the concept that an increased Ca^{2+} store content accounts for the decreased Ca^{2+} influx in Nef-expressing cells (29).

Intracellular Killing of Listeria

Macrophages monolayers pre-activated with IL-17 and $\text{INF-}\gamma$ were used to perform in *ex vivo* killing assays. Listeria survival, determined by the number of viable bacteria (bacterial colonies, Fig. 5A) and normalized to the number of macrophages in cell cultures before Listeria addition (Fig. 5B, shown as arbitrary units), was found to be higher in Tg macrophages (3.38 ± 0.65) when compared with non-Tg cells (2.18 ± 0.17). However, this difference did not reach statistical significance.

Phosphotyrosine content of peritoneal macrophages

To better understand the mechanisms that account for the $\text{Fc}\gamma\text{R}$ signaling defect observed in Tg peritoneal macrophages we studied early biochemical changes upon anti-CD16 cross-linking for 5 minutes. There were no significant changes in the total tyrosine phosphorylation pattern in Tg peritoneal macrophages extract compared to non-Tg control without anti-CD16 stimulation. Following stimulation, increased tyrosine phosphorylation could be detected in Tg lysates, especially for a 70 kDa protein (Fig 6A). Tg peritoneal macrophages had about 2-fold increase tyrosine phosphorylation of this 70 kDa phosphoprotein than control cells (Fig 6B).

DISCUSSION

We used a murine model of AIDS, the CD4C/HIV Tg mice, to study the effects of HIV-1 Nef on macrophages. We previously reported that the related myeloid dendritic cell population shows signs of immaturity and loss of function in these Tg mice (2). We also showed that Tg macrophages were abnormally distributed, accumulating to a greater extent in the marginal zone of the spleen and in the sub-capsular sinus of the lymph nodes (1). In addition, we found that PAK2 is greatly activated in these Tg macrophages (100). We extended these studies here and present evidence that Nef-expressing Tg macrophages are "activated", produce increased levels of cytokines and show lower phagocytosis, delayed agonist-induced Ca^{2+} flux as well as increased susceptibility to intracellular bacteria.

In order to purify the peritoneal macrophages, we took advantage of these cells to adhere onto a dish surface. Before harvesting the cells for further experiments, we showed that Tg peritoneal macrophages displayed an altered morphology when they were compared to their non-Tg control.

The exact mechanism that account for this phenotype has not been yet studied but the Nef-induced increase activation of PAK2 is likely to play a role in this phenotype by interacting with other component of the cytoskeleton. Such interaction has already been described before. PAK2 has been shown to interact with MLCK and RMLC, two important proteins involved in actin remodelling (17,86,87). These Tg peritoneal macrophages also displayed, at steady state level, an increase of podosomes formation. Src kinase is one family of protein that is involved in podosomes formation (18-20). The well-known interaction between Nef and member of the Src kinase gene family could occur for this phenotype.

HIV-1 infection has been associated with chronic immune activation and dysfunctional cytokine production (45). We previously documented an activated phenotype of Tg CD4^+ T cells (10), associated with enhanced CD4^+ T cell death (9). Similarly, Tg Nef-expressing macrophages showed signs of "activation" and after LPS-stimulation, were found to show enhanced cell death relative to non-Tg ones. A similar enhanced susceptibility to cell death has been reported in HIV-1 expressing human myeloid cells/in vitro (24,25), consistent with the progressive decline of circulating monocytes observed in HIV-1 infected individuals (28). LPS-stimulated Tg macrophages also produced

significantly higher levels of TNF- α than non-Tg cells. Similarly, *in vitro* infection of human primary macrophages or myeloid cells with HIV-1 result in up-regulation and constitutive secretion of TNF- α (30,45,46 and reviewed in (36)). Also, alveolar macrophages or mononuclear phagocytes from HIV-1 infected individuals were found to produce higher levels of TNF-2 after LPS stimulation than those from non-infected individuals (37,39). In addition, increased levels of TNF- α (48,49) were measured in the sera of HIV-infected subjects (38,41,43,51,75), in LN and PBMC of SIV-infected animals (44) or of other HIV Tg mice (47). Although IL-1 β and TNF- α share many activities, their expression and secretions are quite distinctly regulated (26,27). This was found to be the case for the LPS-stimulated Tg macrophages, which did not exhibit enhanced IL-1 β production. Human macrophages infected with HIV-1 have been found to produce enhanced levels of IL-1 β by some (52,95), but not all investigators (96). IL-1 β is processed by ICE/caspase1 (54). We have recently reported that ICE/caspase1 is dispensable for the loss of CD4⁺ T cells and for the development of the other organ phenotypes in these CD4C/HIV Tg mice (3). The lack of enhanced production of IL-1 β in murine Tg macrophages is consistent with these genetic data.

We also observed an increased NO production by *in vitro* LPS-stimulated Tg macrophages. A similar enhanced NO production was observed after HIV-1 infection of human monocytes *in vitro* (53) or in HIV-1 infected patients (15,51), and in plasma of SIV-infected animals, although not by all groups (55). However, lower NO production by inflammatory (thioglycollate-induced), but not by resident macrophages was documented in another model of HIV-1 Tg mice (50). The basis for these differences are unclear, they may reflect the distinct mouse background (FVB/n vs C3H), the different target cells expressing the transgene, the state of differentiation of macrophages, or the levels of Nef expression in both models. Despite the enhanced NO production by CD4C/HIV Tg macrophages, we found that two of the genes involved in NO production (iNOS and eNOS) were dispensable for the development of the organ diseases and for the CD4⁺ T cell loss in these Tg mice. These results suggest that the increased NO production by stimulated Tg macrophages may simply reflect the capacity of Nef protein to perturb macrophage function and/or signalling.

Indeed, direct measurement of two important macrophage functions, phagocytosis and cytokines production; confirm that the CD4C/HIV Tg macrophages were functionally impaired.

FcγR-mediated phagocytosis was significantly decreased in Tg macrophages. Defective phagocytic of opportunistic pathogens by cells of the macrophage lineage has been well documented following HIV-1 infection *in vivo* (59-67, 83; for review see (58). In particular, Nef was reported to decrease phagocytosis of PMNL apoptotic bodies in human macrophages (68) and to decrease the FcγR-mediated phagocytosis in MDM-infected cells (34). However, other studies have reported that the HIV-1-exposed macrophage populations are not altered in phagocytosis function (69-73).

The mechanism whereby HIV-1 impairs phagocytosis is not well elucidated. There are a number of phagocytic receptors, and engulfment of specific opportunistic pathogens is often receptor-specific (74). Our experiments involved phagocytosis of zymosan opsonized by IgG, a process mediated by the Fcγ receptors (FcγRs). Surface expression of these receptors on Tg macrophages was comparable to that of control cells, consistent with results in human cells (58,76). Thus, the inhibition of phagocytosis in Tg macrophages appears to occur after receptor binding. Binding of IgG-opsonized targets is followed by aggregation of FcγRs and activation of Src family of tyrosine kinase (4) Reduced phagocytosis has been observed in macrophages deficient for *hck*, *fgr* and *lyn* src-related kinases (56). The binding of Nef to *hck*, a phenomenon well documented (90,91) may result in lower phagocytosis capacity by Tg macrophages. We additionally showed that the total phosphotyrosine content of Tg macrophages lysate following anti-FcγR receptor is increase compared to non-Tg control cells, in particular, for one phosphoprotein of about 72 kDa. This phosphoprotein is likely to represent Syk kinase, a very important kinase involved in several functions of macrophages especially FcγR signalling (77,78). The hyperphosphorylation of the p72 protein may also be involved in the increase FcγR-dependant phagocytosis and endocytosis without LPS stimulation. This observation is in accordance to what as been previously described. The phosphorylation of Syk usually correlates with increased phagocytic capacity of macrophages (77,98,99). We also found defective actin polymerization in Tg macrophages after antigenic modulation. As actin polymerization plays a critical role in the formation of the phagocytic cup (4) and as *hck*, *fgr* and *lyn* are required for this process (56), impaired actin remodelling may be a

potential mechanism underlying impaired phagocytic function following LPS treatment by the Nef-expressing macrophages. Moreover, the strong activation of PAK2 detected in these Tg macrophages (100) may be involved in the morphological changes observed. Indeed, one of the major consequences of PAK activation is the reorganization of cytoskeletal elements (57).

The CD4C/HIV Tg macrophages were also found to be impaired in another important function, killing of intracellular bacteria, resulting in an increased susceptibility to acute infection by *Listeria monocytogenes*, thus indicating a defect in innate immunity. Impaired intracellular killing of *Toxoplasma gondii* by human MDM infected with HIV-1 *in vitro* was associated with increased intracellular growth of the pathogen in those cells (33). Similarly, impaired intracellular killing of *Candida albicans* or *pseudotropicalis* was reported in human monocytes from HIV-infected individuals (82), or in HIV-1 infected macrophages (83) although not by all groups (73). *In vitro* matured monocytes obtained from asymptomatic HIV-1-infected individuals were less efficient in killing *Toxoplasma gondii* (62,84) or *Histoplasma capsulatum* (93) than cells from uninfected individuals (62,84). Pittis *et al.* (85) showed that phagosome-lysosome fusion, which is critical for killing of ingested pathogens, was significantly reduced in peripheral blood monocytes obtained from HIV-infected individuals, and correlated with the stage progression.

The altered function of CD4C/HIV Tg macrophages is likely to reflect a perturbation of the genetic program induced by Nef in these cells. We have already reported that Nef significantly enhanced tyrosine phosphorylation of important signalling molecules (LAT, MAPK) in thymocytes (9). A similar phenomenon was observed here in Tg macrophages. In addition, the strong PAK-2 activation induced by Nef in Tg macrophages (100) may significantly affect their signalization. Finally, we documented here an additional signalling defect in these cells, namely a delayed agonist-induced intracellular Ca^{2+} flux as well as increased intracellular Ca^{2+} stores. Our results are consistent with reports showing an enhanced ionomycin-releasable Ca^{2+} from internal stores and decrease (~50%) in Ca^{2+} influx in Nef-expressing human myelomonocytic or lymphocytes cell line (29,89).

In conclusion, our results showed that Nef-expressing macrophages from CD4C/HIV Tg mice exhibited signalling defects, which are associated with significant impairments of functions important for macrophages. These findings are very similar to results obtained with

human monocytes/macrophages expressing HIV-1, suggesting that these Tg mice appear to represent an adequate model to study macrophage dysfunctions caused by HIV-1.

REFERENCES

1. Poudrier, J., Weng, X., Kay, D.G., Pare, G., Calvo, E.L., Hanna, Z., Kosco-Vilbois, M.H. and Jolicoeur P. 2001. The AIDS disease of CD4C/HIV transgenic mice shows impaired germinal centers and autoantibodies and develops in the absence of IFN-gamma and IL-6. *Immunity*. **15**(2):173-85.
2. Poudrier, J., Weng, X., Kay, D.G., Hanna, Z. and Jolicoeur, P. 2003. The AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with accumulation of immature CD11b^{hi} dendritic cells. *J. Virol.* **77**(21):11733-44.
3. Priceputu, E., Rodrigue, I., Chrobak, P., Poudrier, J., Mak, T.W., Hanna, Z., Hu, C., Kay, D.G. and Jolicoeur, P. 2005. The Nef-mediated AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with increased Fas/FasL expression on T cells and T-cell death but is not prevented in Fas-, FasL-, tumor necrosis factor receptor 1-, or interleukin-1beta-converting enzyme-deficient or Bcl2-expressing transgenic mice. *J. Virol.* **79**(10):6377-91.
4. 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**(5125): 1179-81.
5. Gartner, S.P., Markovits, D.M., Markovitz, M.H., Kaplan, M.H., Gallo, R.C. and Popovic, M. 1986. The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science*. **233**(4760):215-19.
6. Lassmann, H., Schmied, M., Vass, K. and Hickey, W.F. 1993. Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia*. **7**(1):19-24.
7. Hufert, F.T., Schmitz, J., Schreiber, R., Schmitz, H., Racz, P. and von-Laer, D.D. 1993. Human Kupffer cells infected with HIV-1 in vivo. *J. Acquir. Imm. Defic. Syndr.* **6**(7):772-77.
8. Ghorpade, A., Nukuna, A., Che, M., Haggerty, S., Persidsky, Y., Carter, E., Carhart, L., Shafer, L. and Gendelman, H.E. 1998. Human immunodeficiency virus neurotropism: an analysis of viral replication and cytopathicity for divergent strains in monocytes and microglia. *J. Virol.* **72**(4):3340-50.
9. Hanna, Z, Kay, D.G., Rebay, N., Guimond, A., Jothy, S., and Jolicoeur, P. 1998. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* **95**(2):163-75.
10. Weng, X., Priceputu, E., Chrobak, P., Poudrier, J., Kay, D.G., Hanna, Z., Mak, T.W. and Jolicoeur, P. 2004. CD4⁺ T cells from CD4C/HIVNef transgenic mice show enhanced activation in vivo with impaired proliferation in vitro but are dispensable for the development of a severe AIDS-like organ disease. *J. Virol.* **78**(10):5244-57.
11. Wei, X.Q., Charles, I.G., Smith, A., Ure, J., Feng, G.J., Huang, F.P., Xu, D., Muller, W., Moncada, S. and Liew, F.Y. 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* **375**(6530):408-11.
12. Carballo, E., Pitterle, D.M., Stumpo, D.J., Sperling, R.T., and Blackshear, P.J. 1999. Phagocytic and macropinocytic activity in MARKS-deficient macrophages and fibroblasts. *Am. J. Physiol.* **277**(1):C163-C173.

13. Swingler, S., Mann, A., Jacque, J., Brichacek, B., Sasseville, V.G., Williams, K., Lackner, A.A., Janoff, E.N., Wang, R., Fisher, D., and Stevenson, M. 1999. HIV-1 Nef mediates lymphocytic chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat. Med.* **5**(9):997-1003.
14. Alessandrini, L., Santarcangelo, A.C., Olivetta, E., Ferrantelli, F., d'Aloja, P., Pugliese, K., Pelosi, E., Chelucci, C., Mattia, G., Peschle, C., et al. 2000. T-tropic human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Nef protein enters human monocyte-macrophages and induces resistance to HIV replication: a possible mechanism of HIV T-tropic emergence in AIDS. *J. Gen. Virol.* **81**(12):2905-17.
15. Groeneveld, P.H., Kroon, F.P., Nibbering, P.H., Bruisten, S.M., van Swieten, S.M. and van Furth, R. 1996. Increased production of nitric oxide correlates with viral load and activation of mononuclear phagocytes in HIV-infected patients. *Scand. J. Infect. Dis.* **28**(4):341-45.
16. Vullo, V., Mastroianni, C.M., Lichtner, M., Mengoni, F., D'Agostino, C., Forcina, G., Corpolongo, A. and Delia, S. 1998. *Rhodococcus equi* infection of monocytes/macrophages from human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients and healthy individuals: evaluation of intracellular killing and nitric oxide production. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **21**(1):11-17.
17. Zeng, Q., Lagunoff, D., Masaracchia, R., Goeckeler, Z., Cote, G. et Wysolmerski, R. 2000. Endothelial cell retraction is induced by PAK2 monophosphorylation of myosin II. *J. Cell Sci.* **113**(3):471-82.
18. Bruzzaniti, A., Neff, L., Sanjay, A., Horne, W.C., De Camilli, P. et Baron, R. 2005. Dynamin Forms a Src- Kinase-sensitive Complex with Cbl and Regulates Podosomes and Osteoclast Activity. *Mol. Biol. Cell.* **16**(7):3301-13.
19. Berdeaux, R.L, Diaz, B., Kim, L. et Martin, G.S. 2004 Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. *J. Cell. Biol.* **166**(3):317-23.
20. Gatesman, A., Walker, V.G., Baisden, J.M., Weed, S.A. et Flynn, D.C. 2004, Protein kinase C α activates c-Src and induces podosome formation via AFAP-110. *Mol. Cell. Biol.* **24**(17):7578-97.
21. Sozzani, S. P., Allavena, G., D'Amico, W., Luini, G., Bianchi, M., Kataura, T., Imai, O., Yoshie, R., Bonecchi, A. and Mantovani, A. 1998. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* **161**(3):1083-86.
22. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay of cellular growth and survival: application to proliferate and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**(1-2):55-63.
23. Mellor, E.A., Maekawa, A., Austen, K. F. and Boyce, J. A. 2001. Cysteinyl leukotriene receptor 1 is also a pyrimidinergic receptor and is expressed by human mast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**(14):7964-69.
24. Badley, A.D., McElhinny, J.A., Leibson, P.J., Lynch, D.H., Alderson, M.R. and Paya, C.V. 1996. Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J. Virol.* **70**(1):199-206.
25. DeLuca, C., Kwon, H., Pelletier, N., Wainberg, M.A. and Hiscott, J. 1998. NF-kappaB protects HIV-1-infected myeloid cells from apoptosis. *Virology.* **244**(1):27-38.

26. Jovanovic, D., Di Battista, J., Martel-Pelletier, J., Jolicoeur, F.C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F. and Oelletier, J.P. 1998. IL-17 Stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines IL-1b and TNF-a by human macrophages. *J. Immunol.* **16**(7):3013-21.
27. Shapira, L.S., Takashiba, C., Champagne, S., and Van Dyke, T.E. 1994. Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF- α and IL-1b production by human monocytes. *J. Immunol.* **153**(4):1818-24.
28. Lucey, D.R., Hensley, R.E., Ward, W.W., Butzin, C.A. and Boswell, R.N. 1991. CD4+ monocyte counts in persons with HIV-1 infection: an early increase is followed by a progressive decline. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **4**(1):24-30.
29. Foti, M., Cartier, L., Piguetti, V., Lew, D.P., Carpentier, J.-L., Trono, D., and Krause, K.-H. 1999. The HIV Nef protein alter Ca²⁺ signaling in myelomonocytic cells through SH3-mediated protein-protein interactions, *J. Biol. Chem.* **274**(49):34765-72.
30. D'Addario, M., Roulston, A., Wainberg, M.A. and Hiscott, J. 1990. Coordinate enhancement of cytokine gene expression in human immunodeficiency virus type 1-infected promonocytic cells. *J. Virol.* **64**(12):6080-89.
31. Tas, M., Drexhage, H.A. and Goudsmit J, 1988. A monocyte chemotaxis inhibiting factor in serum of HIV-infected men shares epitopes with HIV transmembrane protein gp41. *Clin. Exp. Immunol.* **71**(1):13-18.
32. Wahl, S.M., Allen, J.B., Gartner, S., Orenstaein, J.M., Popovic, M., Chenoweth, D.E., Arthur, L.O. and Wahl, L.M. 1989. HIV-1 and its envelope glycoprotein down-regulate chemotactic ligand receptors and chemotactic function of peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* **142**(10):3553-59.
33. Biggs, B.A., Hewish, M., Kent, S., Hayes, K. and Crowe, S.M. 1995. HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* **154**(11):6132-39.
34. Kedzierska, K., Mak, J., Mijch, A., Greenway, A., Violo, A.C., Hocking, H.J., Purcell, D., Sullivan, S., Mills, J. and Crowe, S.M. 2001. *nef*-deleted HIV-1 inhibits phagocytosis by monocyte-derived macrophages in vitro but not by peripheral blood monocytes in vivo. *AIDS.* **15**(8):945-55.
35. Kedzierska, K. and Crowe, S.M. 2001. Cytokines and HIV-1: interactions and clinical applications. *Antiviral Chem. Chemother.* **12**(3):133-50.
36. Matsuyama, T., Kobayashi, N. and Yamamoto, N. 1991. Cytokines and HIV infection: is AIDS a tumor necrosis factor disease? *AIDS.* **5**(12):1405-17.
37. Mathys, J.M., Melanson, S.M., Schiffer-Alberts, D.J., Ioannidis, J.P., Koziel, H. and Skolnik, P.R. 2000. NF-kappa B modulates TNF-alpha production by alveolar macrophages in asymptomatic HIV-seropositive individuals. *J. Immunol.* **164**(3):1588-94.
38. Aukrust, P., Muller, F., Lien, E., Nordoy, I., Liabakk, N.B., Kvale, D., Espevik, T. and Froland, S.S. 1999. Tumor necrosis factor (TNF) system levels in human immunodeficiency virus-infected patients during highly active antiretroviral therapy: persistent TNF activation is associated with virologic and immunologic treatment failure. *J. Infect. Dis.* **179**(1):74-82.
39. Merrill, J.E., Koyanagi, Y. and Chen, I.S. 1989. Interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha can be induced from mononuclear phagocytes by human

- immunodeficiency virus type 1 binding to the CD4 receptor. *J. Virol.* **63**(10):4404-08.
40. Hanna, Z., Weng, X., Kay, D.G., Poudrier, J., Lowell, C. and Jolicoeur, P. 2001. The pathogenicity of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Nef in CD4C/HIV transgenic mice is abolished by mutation of its SH3-binding domain, and disease development is delayed in the absence of Hck. *J. Virol.* **75**(19):9378-92.
 41. Hittinger, G., Poggi, C., Delbeke, E., Profizi, N. and Lafeuillade, A. 1998. Correlation between plasma levels of cytokines and HIV-1 RNA copy number in HIV-infected patients. *Infection.* **26**(2):100-03.
 42. Zangerle, R., Gallati, H., Sarcelletti, M., Weiss, G., Denz, H., Wachter, H. and Fuchs, D. 1994. Increased serum concentrations of soluble tumor necrosis factor receptors in HIV-infected individuals are associated with immune activation. *Acquir. Immune Defic. Syndr.* **7**(1):79-85.
 43. Rizzardi, G.P., Barcellini, W., Tambussi, G., Lillo, F., Malnati, M., Perrin, L. and Lazzarin, A. 1996. Plasma levels of soluble CD30, tumour necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors during primary HIV-1 infection: correlation with HIV-1 RNA and the clinical outcome. *AIDS.* **10**(13):F45-50.
 44. Zou, W., Lackner, A.A., Simon, M., Durand-Gasselien, I., Galanaud, P., Desrosiers, R.C. and Emilie, D. 1997. Early cytokine and chemokine gene expression in lymph nodes of macaques infected with simian immunodeficiency virus is predictive of disease outcome and vaccine efficacy. *J. Virol.* **71**(2):1227-36.
 45. Esser, R., von Briesen, H., Brugger, M., Ceska, M., Glienke, W., Muller, S., Rehm, A., Rubsamen-Waigmann, H. and Andreesen R, *Pathobiology*, 1991. Secretary repertoire of HIV-infected human monocytes/macrophages. *Pathobiology* **59**(4): 219-22.
 46. Esser, R., Glienke, W., von Briesen, H., Rubsamen-Waigmann, H. and Andreesen, R. 1996. Differential regulation of proinflammatory and hematopoietic cytokines in human macrophages after infection with human immunodeficiency virus. *Blood.* **88**(9):3474-81.
 47. De, S.K., Devadas, K. and Notkins, A.L. 2002. Elevated levels of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in human immunodeficiency virus type 1-transgenic mice: prevention of death by antibody to TNF-alpha. *J. Virol.* **76**(22):11710-14.
 48. Lahdevirta, J., Mayri, C., Teppo, A. and Repo, H. 1988. Elevated levels of circulating cachectin/tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am. J. Med.* **85**(3):289-91.
 49. Baqui, A., Jabra-Rizk, M., Kelley, J., Zhang, M., Falkler, W.J. and Meiller, T. 2000. Enhanced interleukin-1beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by LPS stimulated human monocytes isolated from HIV+ patients. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **22**(3):401-21.
 50. Dickie, P., Roberts, A. and Lee, R. 2001. A defect in HIV-1 transgenic murine macrophages results in deficient nitric oxide production. *J. Leuk. Biol.* **70**(4):592-600.
 51. Zangerle, R., Fuchs, D., Reibnegger, G., Werner-Felmayer, G., Gallati, H., Wachter, H. and Warner, E.R. 1995. Serum nitrite and nitrate in infection with human immunodeficiency virus type-1. *193*(1):59-70.

52. Bergamini, A., Bolacchi, F., Bongiovanni, B., Colizzi, V., Cappelli, G., Uccella, I., Cepparulo, M., Capozzi, M., Mancino, G. and Rocchi, G. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 infection modulates the interleukin (IL)-1beta and IL-6 responses of human macrophages to CD40 ligand stimulation. *J. Infect Dis.* **182**(3):776-84.
53. Bukrinsky, M.I., Nottet, H.S.L.M., Schmidtayerova, H., Dubrovsky, L., Flanagan, C.R., Mullins, M.E., Lipton, S.A. and Gendelman, H.E. 1995. Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1` (HIV-1)-infected monocytes: implications for HIV-associated neurological disease. *J. Exp. Med.* **181**(2):735-45.
54. Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., Salfeld, J., et al. 1995. Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell.* **80**(3):401-11.
55. Persichini, T., Ascenzi, P., Colizzi, V., Fraziano, M., Venturini, G. and Colasanti, M. 1999. Molecular bases for the anti-HIV-1 effect of NO, *Int. J. Mol. Med.* **4**(4):365-68.
56. Fitzer-Attas, C.J., Lowry, M., Crowley, M.T., Finn, A.J., Meng, F., DeFranco, A.L. and Lowell, C.A. 2000. Fcgamma receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.* **191**(4):669-82.
57. Daniels, R.H. and Bokoch, G.M. 1999. p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem. Sci.* **24**(9):350-55.
58. Kedzierska, K. and Crowe S. 2002. The role of macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection, *Current Medicinal Chemistry*, **9**(21):1893-1903.
59. Bravo-Cuellar, A., Nowacky, W., Vuillier, D., de Saint-Martin, J. and Orbach-Arbouys, S. 1992. The bactericidal capacity of peripheral blood monocytes from HIV positive patients may collapse very soon after the infection. *Immunol. Lett.* **31**(3):297-99.
60. Cameron, P.U., Granger, D.L., Matthews, T.J. and Weiberg, J.B. 1993. Human immunodeficiency virus (HIV)-infected human blood monocytes and peripheral macrophages have reduced anticryptococcal activity whereas HIV-infected alveolar macrophages retain normal activity, *J. Infect. Dis.* **170**(1):60-67.
61. Delmarre, F., Stevenhagen, A., Kroon, F., van Eer, M., Meenhorst, P. and Furth, R. 1995. Reduced toxoplasmatatic activity of monocytes and monocyte-derived macrophages from AIDS patients is mediated via prostaglandin E2, *AIDS.* **9**(5):441-55.
62. Dobmeyer, T.S., Raffel, B., Dobmeyer, J.M., Findhammer, S., Klein, S.A., Kabelitz, D., Hoelzer, D., Helm, M.B. and Rossol, R. 1995. Decreased function of monocytes and granulocytes during HIV-1 infection correlates with CD4 cell counts, *Eur. J. Med. Res.* **1**(1):9-15.
63. Baqui, A.A., Meiller, T.F., Zhang, M., Falker. and W.A.J. 1999. The effects of HIV viral load on the phagocytic activity of monocytes activated with lipopolysaccharide from oral microorganisms, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **21**(3):421-38.

64. Estevez, M.E., Ballart, I.J., Diez, R.A., Planes, D.N., Scaglione, C. and Sen, L. 1986. Early defect of phagocytic cell function in subsets at risk for acquired immunodeficiency syndrome, *Scand. J. Immunol.* **24**(2):215-21.
65. Musher, D.M., Watson, D.A., Nickeson, D., Gyorkey, F., Lahart, C. and Rossen, R.D. 1990. The effect of HIV infection on phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by human pulmonary alveolar macrophages. *Am. J. med. Sci.* **299**(3):158-63.
66. Koziel, H., Eichbaum, Q., Kruskal, B.A., Pinkston, P., Rogers, R.A., Armstrong, M.Y., Richards, F.F., Rose, R.M. and Ezekowitz, R.A. 1998. Reduced binding and phagocytosis of *Pneumocystis carinii* by alveolar macrophages from persons infected with HIV-1 correlates with mannose receptor down-regulation. *J. Clin. Invest.* **102**(7):1332-44.
67. Wehle, K., Schirmer, M., Dunnebacke-Hinz, T. and Fitzner, P. 1993. Quantitative differences in phagocytosis and degradation of *Pneumocystis carinii* by alveolar macrophages in AIDS and non-HIV patients *in vitro*, *Cytopathology.* **4**(4):231-36.
68. Torre, D., Gennero, L., Baccino, F.M., Speranza, F., Biondi, G. and Pugliese, A. 2002. Impaired macrophage phagocytosis of apoptotic Neutrophils in patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Diagnos. Lab.immunol.* **9**(5):983-86.
69. Eversole, L.R., Fleischmann, J., Baldwin, G.C. and Sapp, J.P. 1994. The effects of human immunodeficiency virus infection on macrophage phagocytosis of *Candida*. *Oral Microbiol. Immunol.* **9**(1):55-59.
70. Nielsen, H., Kharazmi, A. and faber, V. 1986. Blood monocyte and neutrophil functions in the acquired immune deficiency syndrome, *Scand. J. Immunol.* **24**(3):291-96.
71. Lima, R.G., van Weyenbergh, J., Saraiva, E.M.B., Barral-Netto, M., Galvao-Castro, B. and Bou-Habib, D.C. 2002. The replication of human immunodeficiency virus type 1 in macrophages is enhanced after phagocytosis of apoptotic cells. *J. Infect.Dis.***185**(11):1561-66.
72. Nottet, H.S.L.M., de Graff, L., de Vos, N.M., et al. 1993. Phagocytic function of monocyte-derived macrophages is not affected with by human immunodeficiency virus type 1 infection, *J. Infect. Dis.* **168**(1):84-91.
73. Reed, S.G., da Silva, J.S., Ho, J.L., et al. 1992. Cytokine activation of human macrophages infected with HIV-1 to inhibit intracellular protozoa, *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **5**(7):666-75.
74. Greeneberg, S. 1995. Signal transduction of phagocytosis, *Trends cell. Biol.* **5**(3):93-99.
75. Stent, G., Irving, L., Lewin, C. and Crowe, S. 1995. The kinetics of surface expression of CD11/CD18 integrins and CD54 on monocytes and macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* **100**(2):366-76.
76. Dunne, J., Feighery, C. and Whelan, A. 1996. Beta-2-microglobulin, neopterin and monocyte Fc gamma receptors in opportunistic infections of HIV-positive patients. *Br. J. Biomed. Sci.* **53**(4):263-69.
77. Kiefer, F., Brumell, J., Al-Alawi, N., Latour, S., Cheng, A., Veillette, A., Grinstein, S. and Pawson, T. 1998. The Syk Protein Tyrosine Kinase Is Essential for Fc Receptor Signaling in Macrophages and Neutrophils. *Mol. Cell. Biol.* **18**(7):4209-20.

78. Darby, C., Geahlen, R.L. and Schreiber, A.D. 1994. Stimulation of macrophage Fc gamma RIIIA activates the receptor-associated protein tyrosine kinase Syk and induces phosphorylation of multiple proteins including p95Vav and p62/GAP-associated protein. *J. Immunol.* **152**(11):5429-37.
79. Crowley, M.T., Costello, P.S., Fitzer-Attas, C.J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V.L. et DeFranco, A.L. 1997. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc gamma receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* **186**(7):1027-39.
80. Saltel, F., Destaing, O., Bard, F., Eichert, D. and Jurdic, P. 2004. Apatite-mediated actin dynamics in resorbing osteoclasts. *Mol. Biol. Cell.* **15**(12):5231-41.
81. Mizutani, K., Miki, H., He, H., Maruta, H. and Takenawa, T. 2002. Essential role of neural Wiskott- Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblasts. *Cancer Res.* **62**(3):669-74.
82. Mastroianni, C.M., Lichtner, M., Mengoni, F., D'Agostino, C., Foreina, G., d'Ettore, G., Santopadre, P. and Vullo, V. 1999. Improvement in neutrophil and monocyte function during highly active antiretroviral treatment of HIV-1-infected patients. *AIDS.* **13**(8):883-90.
83. Baldwin, G.C., Fleischmann, J., Chung, Y., Koyanagi, Y., Hen, I.S.Y. and Golde, D.W. 1990. Human immunodeficiency virus causes mononuclear phagocyte dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**(10):3933-37.
84. Eales, L.J., Moshtael, O. and Pinching, A.L. 1987. Microbicidal activity of monocyte derived macrophages in AIDS and related disorders. *Clin. Exp. Immunol.* **67**(2):227-35.
85. Pittis, M.G., Prada, F., Mangano, A., Perez, L., Sternik, G., Redondo, J., Bolongna, R. and Sen, L. 1997. Monocyte phagolysosomal fusion in children born to human immunodeficiency virus-infected mothers. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **16**(1):24-28.
86. Goeckeler, Z.M., Masaracchia, R.A., Zeng, Q., Chew, T.L., Gallagher, P. et Wysolmerski, R.B. 2000. Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2. *J. Biol. Chem.* **275**(24):18366-74.
87. Chew, T.L., Masaracchia, R.A., Goeckeler, Z.M. et Wysolmerski, R.B. 1998. Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK). *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **19**(8):839-54.
88. Akaike, T. and Maeda H. 2000. Nitric oxide and virus infection. *Immunology.* **101**(3):300-08.
89. Zegarra-Moran, O., Rasola, A., Rugolo, M., Porcelli, A.M., Rossi, B. and Galletta, L.J. 1999. HIV-1 nef expression inhibits the activity of a Ca²⁺-dependent K⁺ channel involved in the control of the resting potential in CEM lymphocytes. *J. Immunol.* **162**(9):5359-66.
90. Cheng, H., Hoxie, J.P. and Parks, W.P. 1999. The conserved core of human immunodeficiency virus type 1 Nef is essential for association with Lck and for enhanced viral replication in T-lymphocytes. *Virology.* **264**(1):5-15.
91. Saksela, K., Cheng, G. and Baltimore, D. 1995. Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef⁺ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J.* **14**(3):484-91.

92. Shesely, E.G., Maeda, N., Kim, H.S., Desai, K.M., Krege, J.H., Laubach, V.E., Sherman, P.A., Sessa, W.C. and Smithies, O. 1996. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**(23):13176-81.
93. Chaturvedi, S., Frame, P. and Newman, S.L. 1995. Macrophages from human immunodeficiency virus-positive persons are defective in host defense against *Histoplasma capsulatum*. *J Infect Dis.* **171**(2):320-27.
94. Kay, D.G., Yue, P., Hanna, Z., Jothy, S., Tremblay, E. and Jolicoeur, P. 2002. Cardiac disease in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus-1 nef in cells of the immune system. *Am. J. Pathol.* **161**(1):321-35.
95. Olivetta, E., Percario, Z., Fiorucci, G., Mattia, G., Schiavoni, I., Dennis, C., Jager, J., Harris, M., Romeo, G., Affabris, E. and Federico, M. 2003. HIV-1 Nef induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappa B activation. *J. Immunol.* **170**(4):1716-27.
96. Ullum, H., Victor, J., Katzenstein, T.L., Gerstoft, J., Gotzsche, P.C., Bendtzen, K., Skinhoj, P. and Pedersen, B.K. 1997. Decreased short-term production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in human immunodeficiency virus-seropositive subjects. *J. Infect Dis.* **175**(6):1507-10.
97. Beckerman, K.P., Rogers, H.W., Corbett, J.A., Schreiber, R.D., McDaniel, M.L. and Unanue, ER. 1993. Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* **150**(3):888-95.
98. Majeed, M., Cavegion, E., Lowell, C.A. and Berton, G. 2001. Role of Src kinases and Syk in Fcgamma receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion. *J. Leukoc Biol.* **70**(5):801-11.
99. Strzelecka-Kiliszek, A., Kwiatkowska, K. and Sobota, A. 2002. Lyn and Syk kinases are sequentially engaged in phagocytosis mediated by Fc gamma R. *J. Immunol.* **169**(12):6787-94.
100. Vincent, P., Priceputu, E., Day, D., Saksela, K., Jolicoeur, P. and Hanna, Z. 2006. Activation of PAK2 and its association with NEF are conserved in Murine Cells, but are not sufficient to induce an Aids-Like disease in CD4C/HIV Transgenic Mice. *J. Biol. Chem.* (pré-publication)

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Nef expression and morphology of peritoneal macrophages,

(A) Expression of Nef protein in peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages were purified by adherence. Pooled total protein extracts (100 μ g) of macrophages and thymocytes from non-Tg and Tg mice were separated by SDS-PAGE and were subjected to Western blotting as described in Material and Methods. (B) Morphology of peritoneal macrophages. Non-tg and Tg peritoneal macrophages were harvested and plated into plastic dish (Nunc) for 3 hours and then treated or not with LPS for an additional 12 hours and analyzed under the light microscope. Quantification of the diameter (C) or elongation factor (D) of peritoneal macrophages. The size and the elongation factor of non-Tg and Tg Peritoneal macrophages ($n \geq 350$) were analysed using Northern Eclips software. At least 5 fields coming from 3 independent experiments were used for this analysis. Actin staining of peritoneal macrophages. (E) Peritoneal Macrophages from non-Tg and Tg mice were plate O/N into 8 chambers slide (Labtek,) for 3 hours and then treated or not with LPS (10 ng/ml). The cells were then fixed with 3.7% PFA, permeabilized with 0.2% Triton-X and stained for 30 min with phalloidin-FITC at 37°C. Visualization of actin content was performed under fluorescence microscopy. The arrows indicate rich actin podosome formation. Quantification of cells containing large rich-actin podosomes (F). Quantification was assessed by counting number of cells expressing large podosomes from 3 independent experiments.

Figure 2. iNOS and eNOS are dispensable for organ diseases

(A) The incidence of mortality of HIV/MutA Tg mice deficient in iNOS or eNOS. Hematoxylin and eosin staining of lungs (A) and kidneys (B) from iNOS^{+/-} (n = 8), iNOS^{-/-} (n = 3), eNOS^{+/-} (n = 3), and eNOS^{-/-} (n = 6) HIV^{MutG} Tg mice are shown. For every group more than 3 non-Tg controls were analyzed.

Figure 3. Impaired internalization and decreased viability of Tg macrophages

(A) Endocytosis of immune complexes. Fc γ R-mediated uptake of FITC-labeled heat-aggregated IgG was measured by flow cytometry. The percentage of non-Tg non-stimulated, (n = 3), (CTL) and LPS stimulated (n = 3) macrophages and the percentage of Tg CTL (n = 3) and LPS-stimulated (n = 3) macrophages stained for intracellular small soluble immune complexes are shown (open histogram). Auto fluorescences are shown as shaded

histograms. * Statistical analysis was done by Student's *t*-test. P values < 0.05 were considered significant.

(B) The rate of phagocytosis. The ingestion of IgG-opsonized Texas Red-conjugated zymosan particles by non-stimulated (n = 4) and LPS-stimulated (n = 4) non-Tg macrophages and Tg non-stimulated (n = 4) and LPS-stimulated (n = 4) macrophages was measured to determine the rate of phagocytosis in a time course experiment. * Statistical analysis was done by Student's *t*-test. P values < 0.05 were considered significant.

(C) Expression of FcγR II and FcγR III. Using anti-CD16/32 monoclonal antibodies cell-surface levels of FcγR II and III on macrophages from non-Tg mice (n = 4) and Tg mice (n = 4) was determined by flow cytometry.

(D) Actin remodeling. Actin polymerization after antigenic modulation by anti mac-1 monoclonal antibody was demonstrated by specific phalloidin staining (representative of 3 separate experiments).

(E) MTT test. The same source of the cells stained for annexin/PI after LPS stimulation (see Fig. 4F), were used to determine the capacity of mitochondria to oxidize a soluble tetrazolium salt. Results are expressed as OD units per 10⁴ adherent cells.

* Statistical analysis was done by Student's *t*-test. P values < 0.05 were considered significant

(F) Annexin V / propidium iodide (PI) staining. Annexin V was used to quantitatively determine the percentage of macrophages of non-Tg mice (n = 4) and of Tg mice (n = 4) undergoing apoptosis after LPS stimulation. The percentage of the cells in the early stage of apoptosis (cells stained for annexin V and negative for PI, lower right quadrant) is shown. The cells stained both for annexin V and PI (upper right quadrant) represents the cells in the late stage of apoptosis while the cells negative for annexin V/PI (lower left quadrant) represent alive cells.

Figure 4. Delayed agonist-induced calcium mobilization in Tg macrophages

(A) IL-17-stimulation of calcium influx. non-Tg and Tg macrophages were stimulated with mrIL-17 (100 ng/ml) and calcium influx, expressed as bound vs free INDO-1 AM, was recorded for indicated period of time. The traces are representatives of more than 6 experiments.

(B) IL-17R expression. Anti IL-17R specific monoclonal antibodies were used to determine the expression of IL-17R on non-Tg (n = 7) and Tg (n = 7) macrophages (open histogram,

representative of 7 separate experiments). Mean fluorescence intensity is shown. Shaded histograms represent isotypic control.

(C) iNOS synthase and COX-2 expression. Lysates (15 μ g) of non-stimulated and of 24 h IL-17-stimulated non-Tg and Tg macrophages were separated by SDS-PAGE. Western blotting was performed with anti-iNOS and anti-COX-2 specific antibodies.

Figure 5. Impaired killing capacity of Tg macrophages

Acute *Listeria* infection in cultured peritoneal macrophages from non-Tg mice (n = 6) and Tg mice (n = 6) has been used as a model of in vitro killing assay. Macrophages from Tg mice showed decreased capacity to kill intracellular bacteria, shown as higher number of bacterial colony from lysates of Tg cells (Fig. 6A, the picture is representative of 6 independent experiments), and normalized to the number of macrophages in cell cultures before *Listeria* adding (Fig. 6B).

Figure 6. Fc γ R-induced tyrosine phosphorylation in peritoneal macrophages.

(A) Analysis of total anti-phosphotyrosine (clone 4G10) protein after stimulation with anti-CD16. Peritoneal macrophages from non-Tg and Tg animals were plated for 2 hours and then stimulated with anti-CD16 for 5 minutes. Cell lysates were separated by 8% SDS-PAGE and subjected to phosphotyrosine immunoblot analysis.. (B) Quantification of the level of phosphorylation of the 70kDa protein with the Odyssey® software. Quantification of the 70 kDa phosphoprotein was normalized with the anti-actin immunoblot.

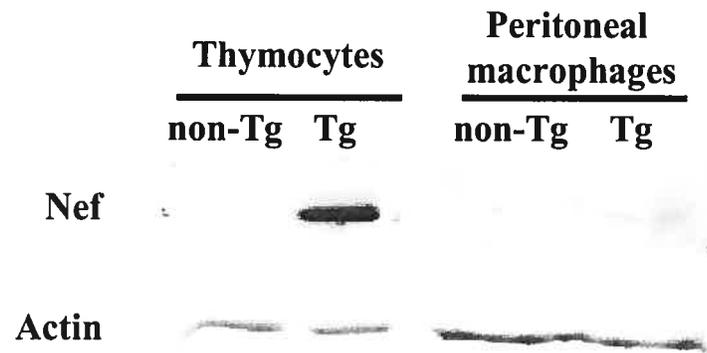
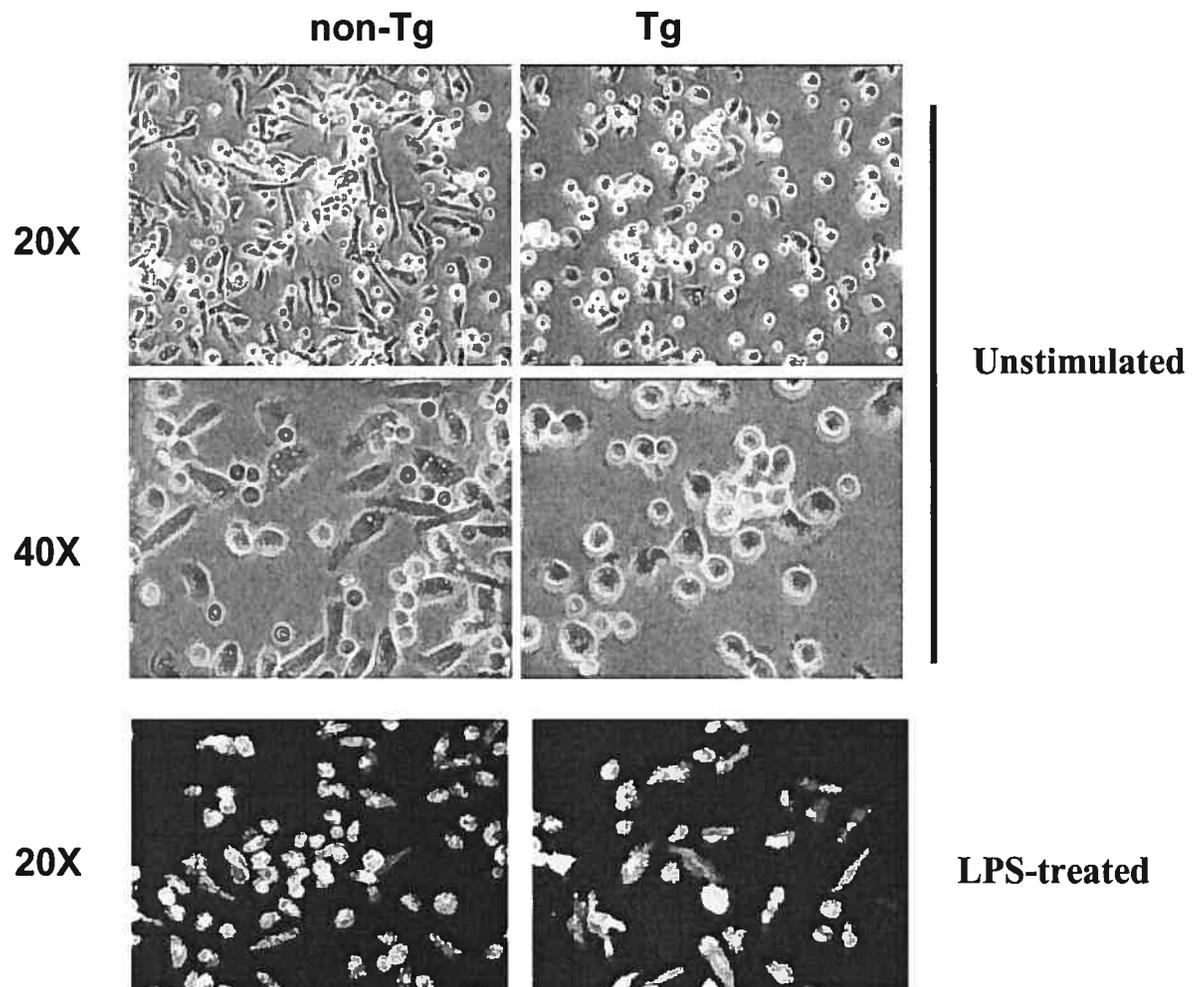
Table I. TNF- α , IL-1 β and NO secretion by LPS-stimulated peritoneal macrophages

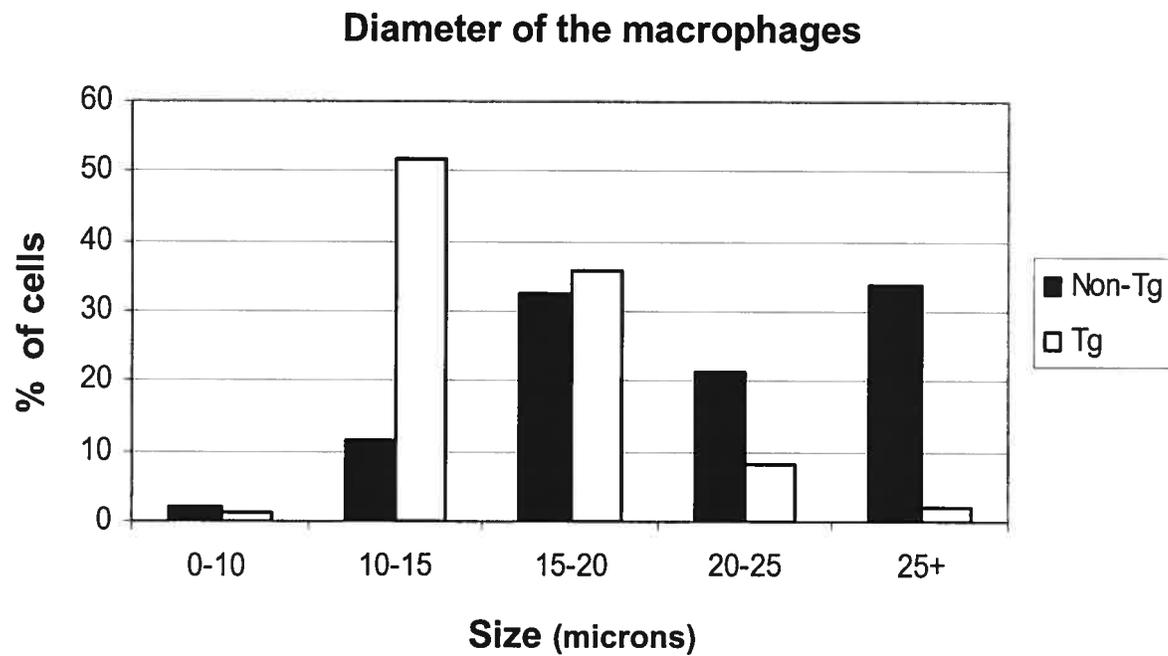
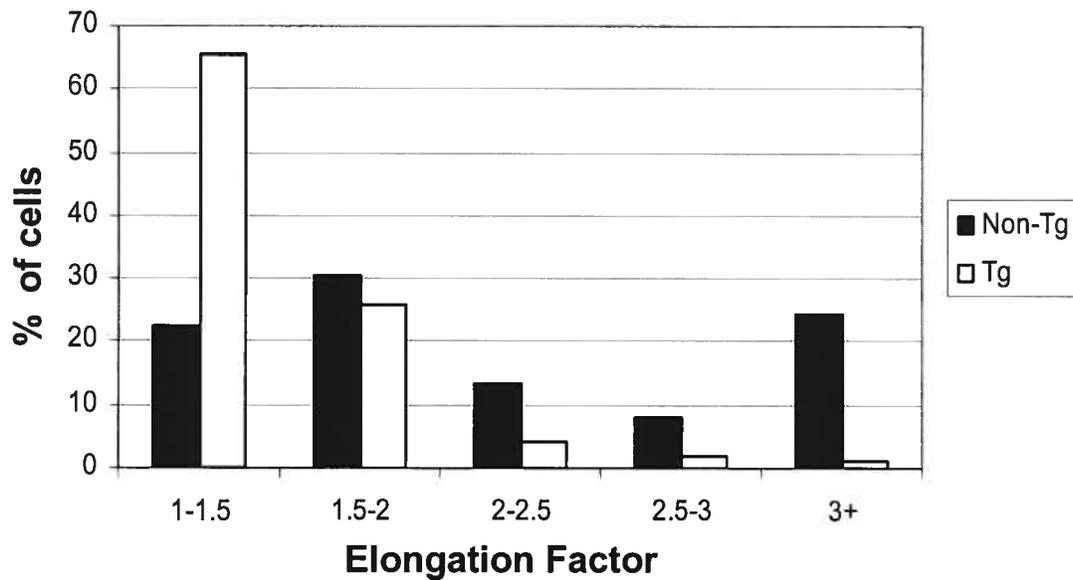
LPS (ng/mL)	TNF- α (ng/mL)		IL-1 β (ng/mL)		Nitrite (nmol)	
	nTg	Tg	nTg	Tg	nTg	Tg
0	218 \pm 32	222 \pm 64	654 \pm 61	550 \pm 89	0.39 \pm 0.08	0.66 \pm 0.22
20	621 \pm 75	916 \pm 124 (<i>p</i> =0.05) [®]	701 \pm 65	616 \pm 72	0.63 \pm 0.08	1.37 \pm 0.31 (<i>p</i> =0.05)
100	1384 \pm 121	1672 \pm 183	773 \pm 92	662 \pm 97	1.11 \pm 0.19	2.40 \pm 0.34 (<i>p</i> =0.02)
500	1703 \pm 88	2146 \pm 133 (<i>p</i> =0.04)	976 \pm 91	834 \pm 95	1.56 \pm 0.24	2.85 \pm 0.40 (<i>p</i> =0.04)

* Values are expressed as mean \pm SEM for 4 independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test, and values were compared with nTg control. [®] P values < 0.05 were considered significant.

Table II. Calcium release by Ionomycin-treated peritoneal macrophages

	non-Tg	Tg
time peak (sec)	162 ± 32	77 ± 44 (<i>p</i> Š0.001)
mean (FL4/FL5)	585 ± 14	715 ± 25 (<i>p</i> Š0.01)

A**B****Figure 1** (Jovanovic et al)

C**D****Figure 1** (Jovanovic et al)

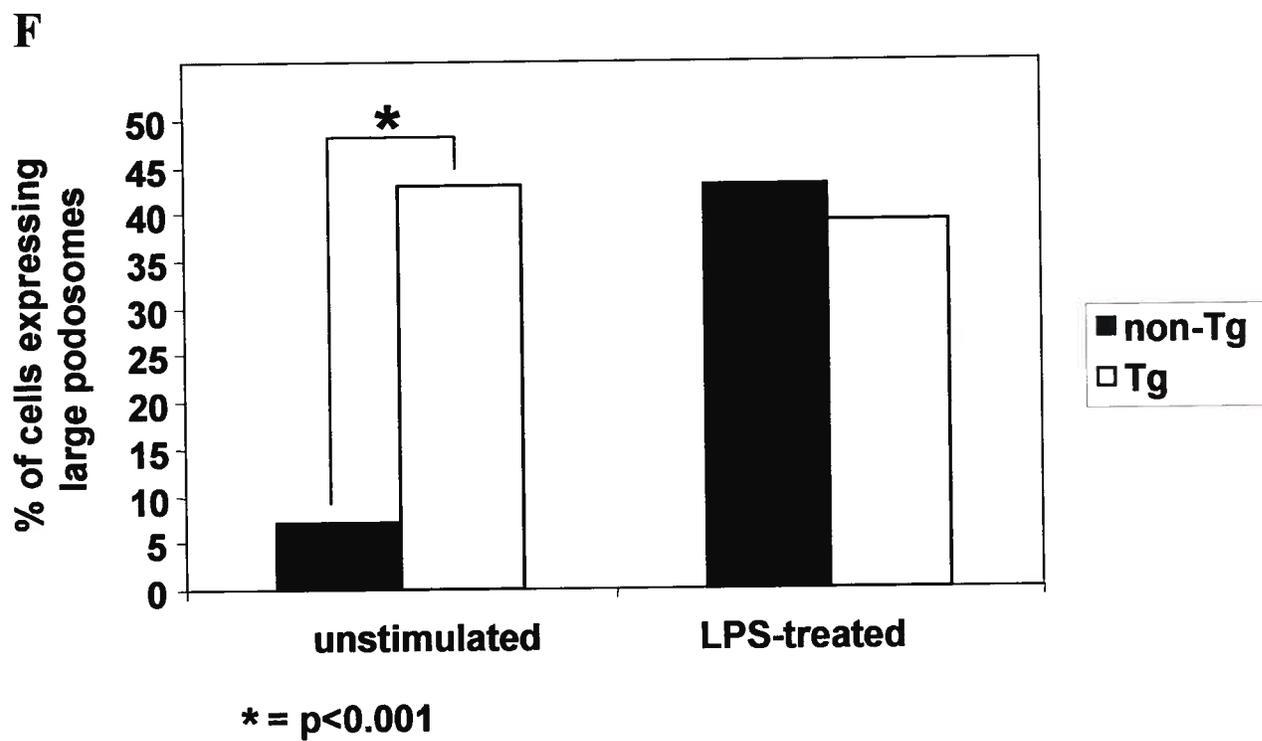
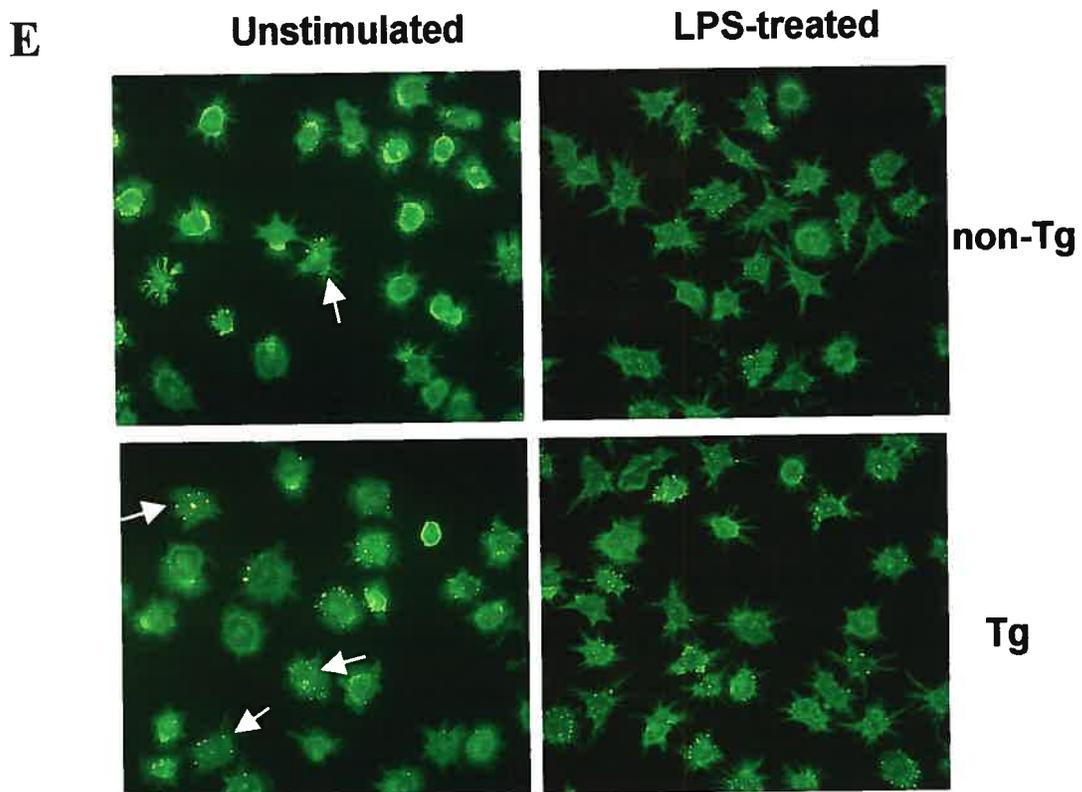


Figure 1 (Jovanovic et al)

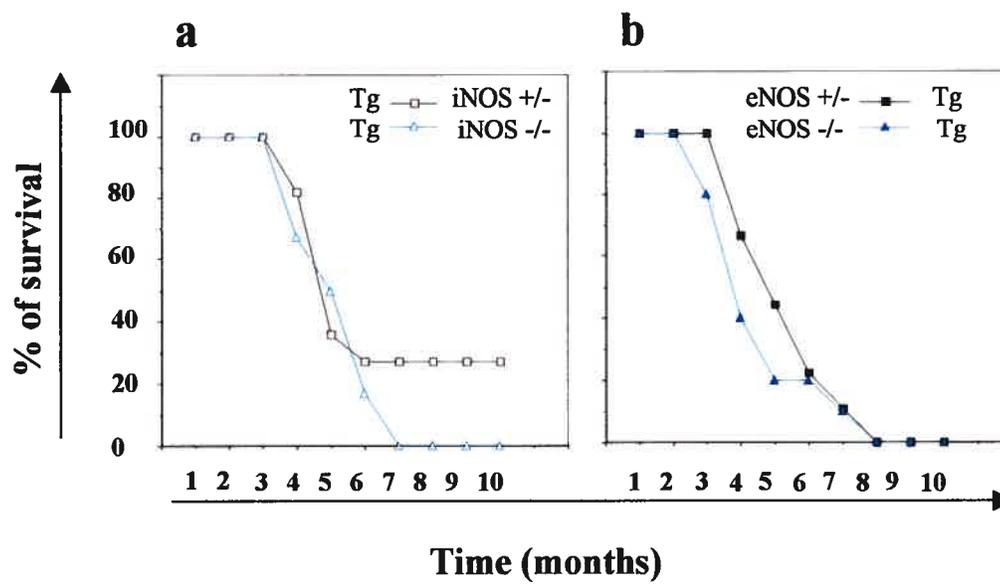
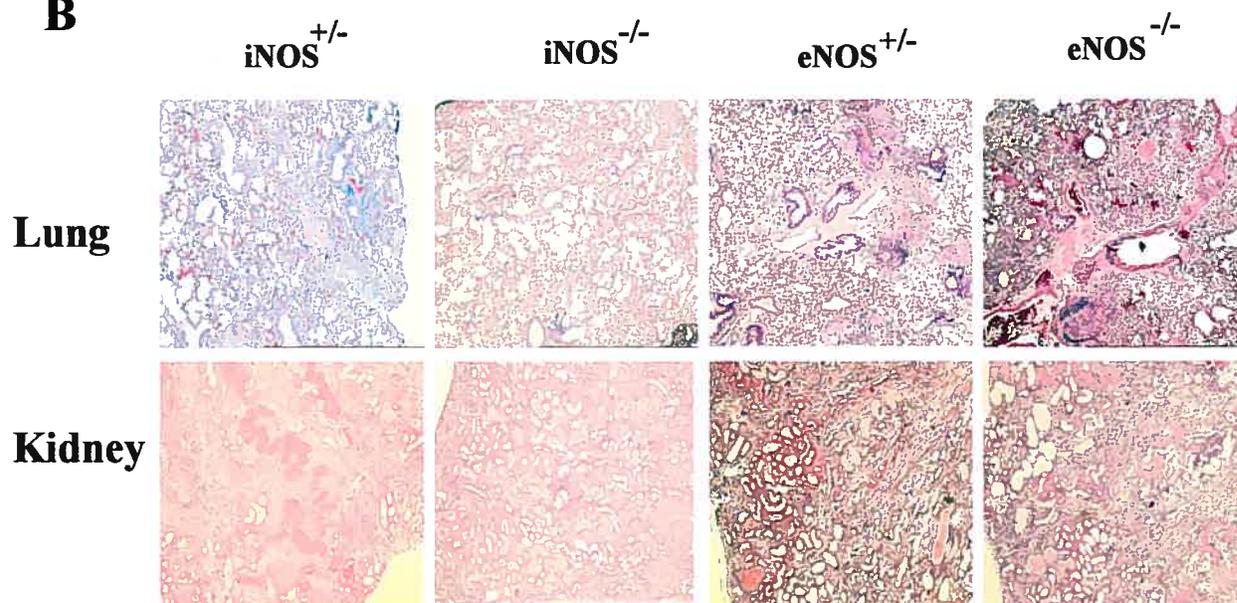
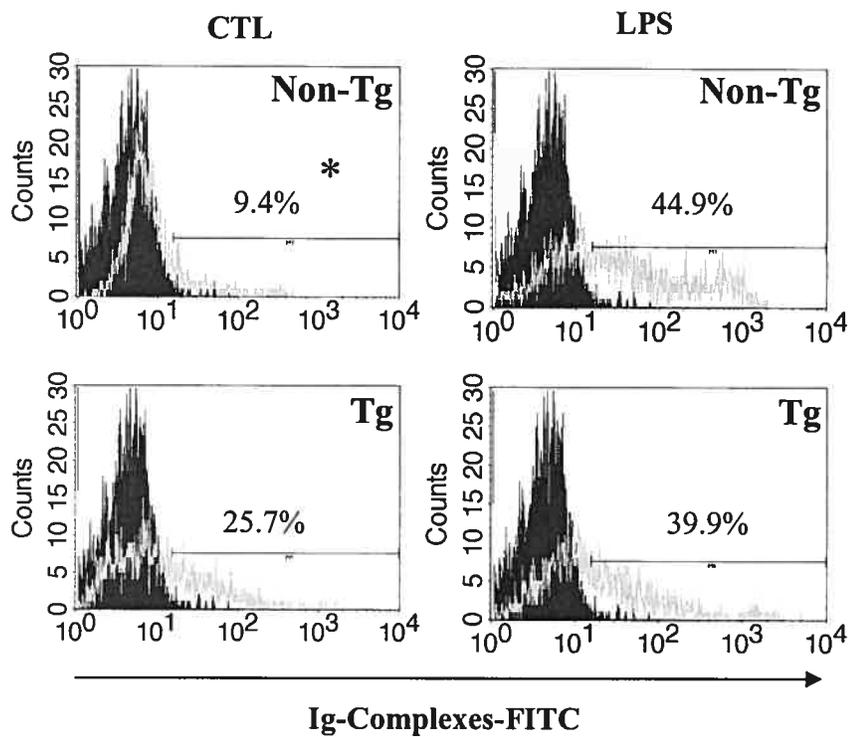
A**B**

Figure 2 (Jovanovic et al)

A



B

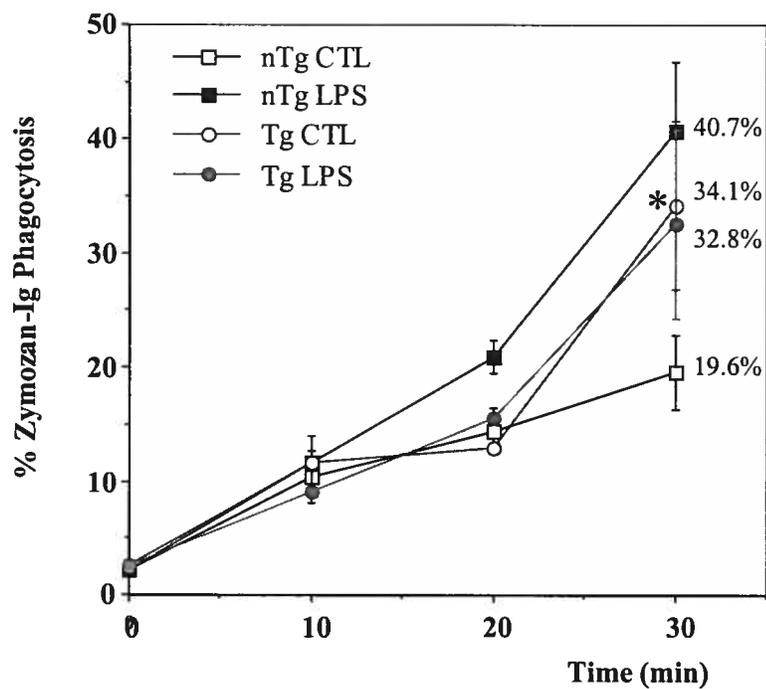
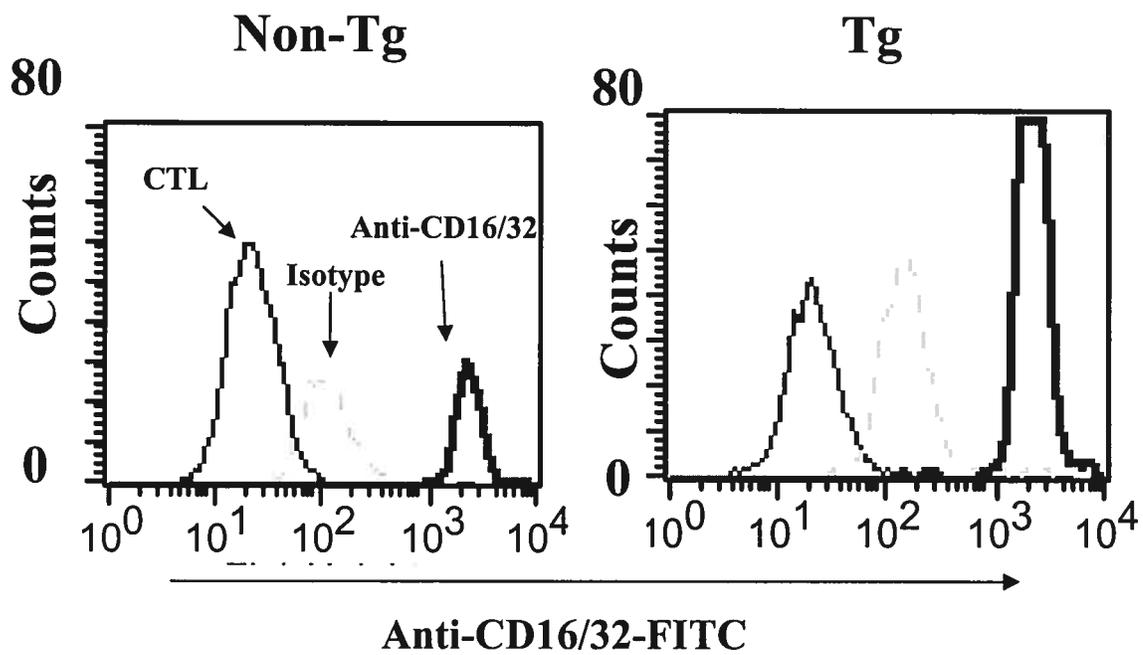


Figure 3 (Jovanovic et al)

C



D

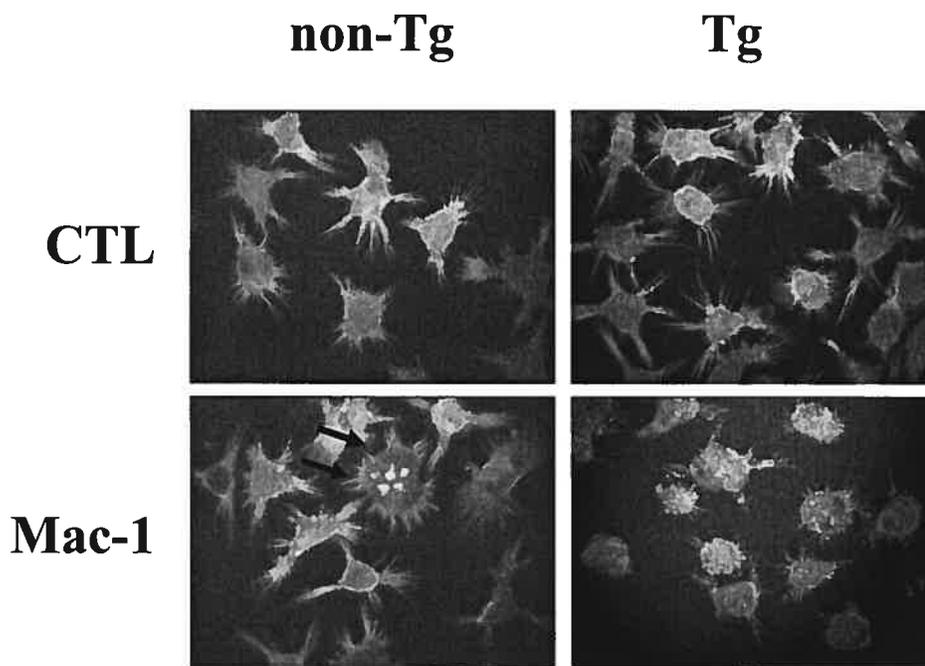


Figure 3 (Jovanovic et al)

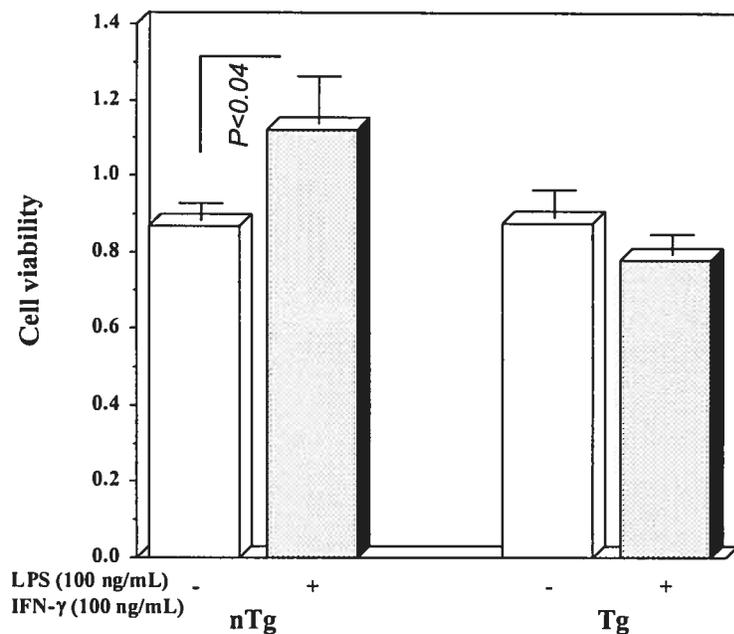
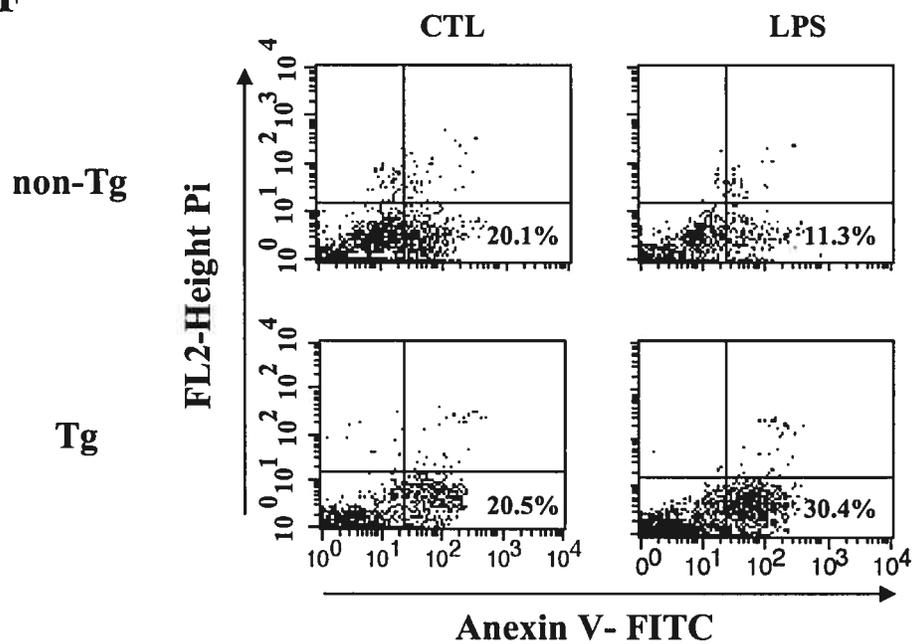
E**F**

Figure 3 (Jovanovic et al)

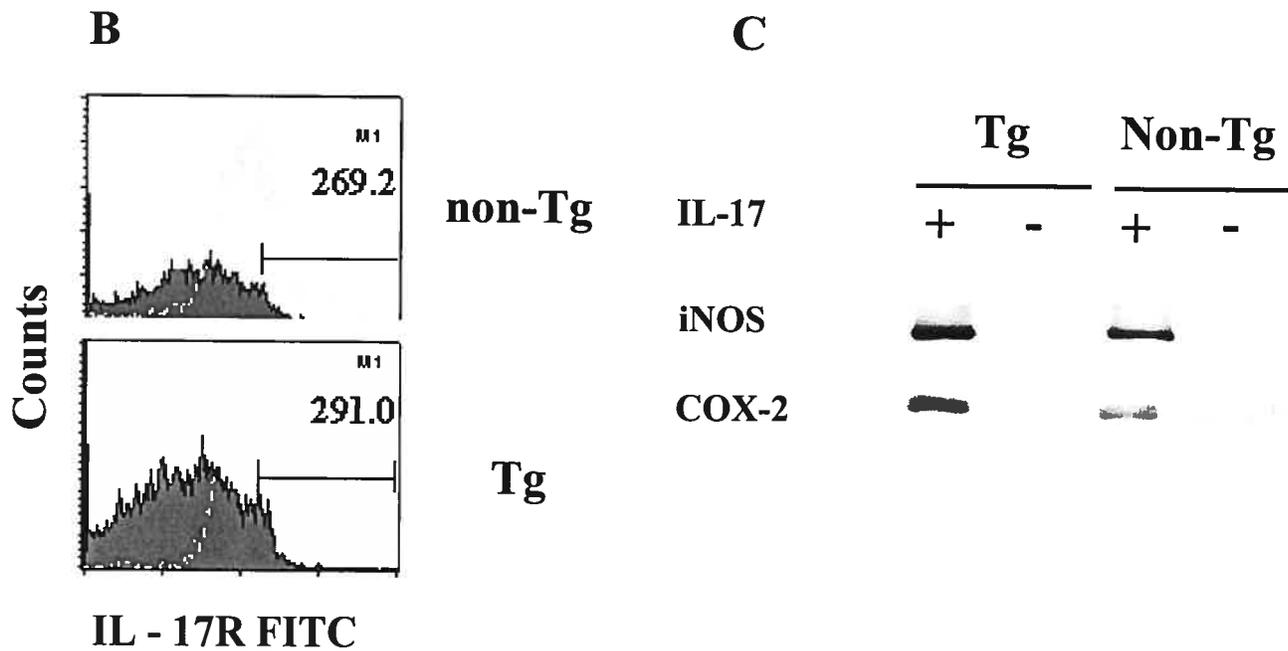
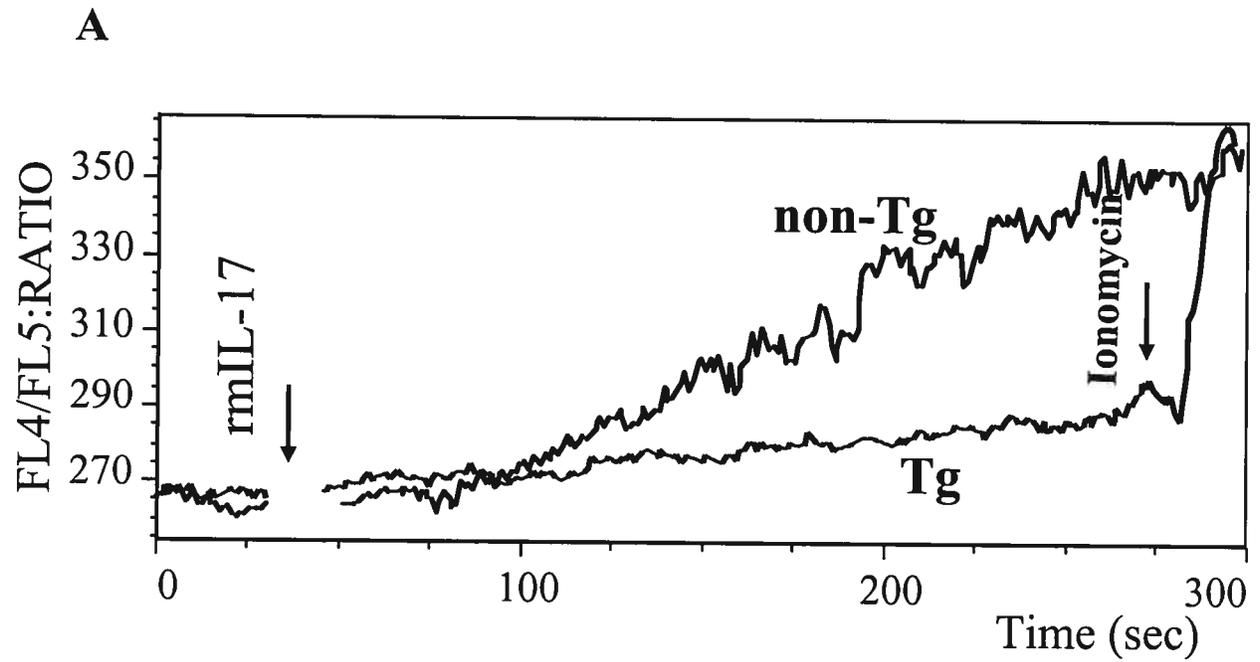
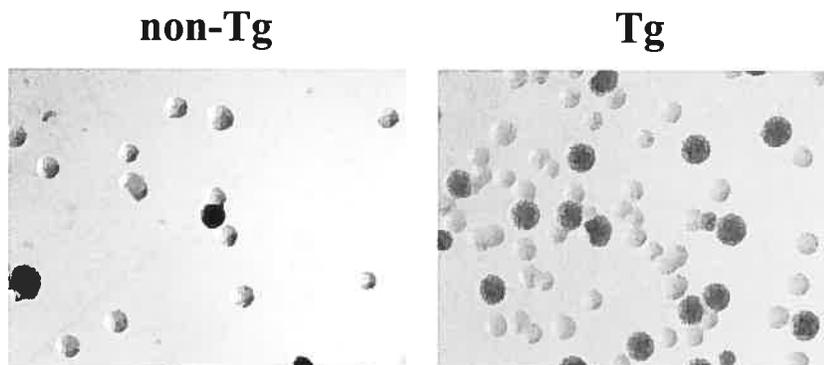


Figure 4 (Jovanovic et al)

A



B

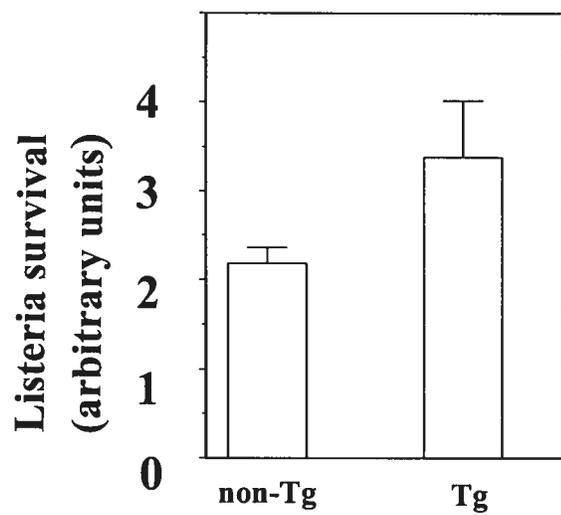
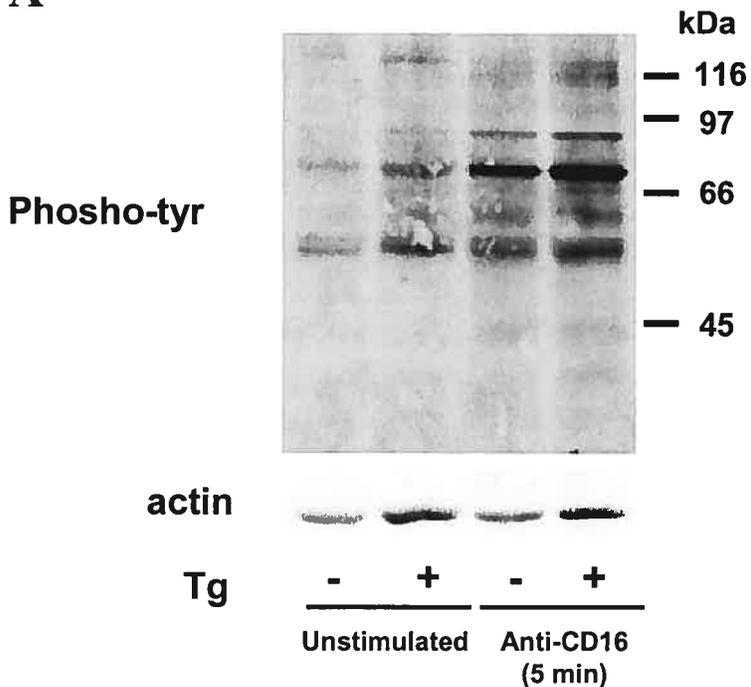


Figure 5 (Jovnovic et al)

A



B

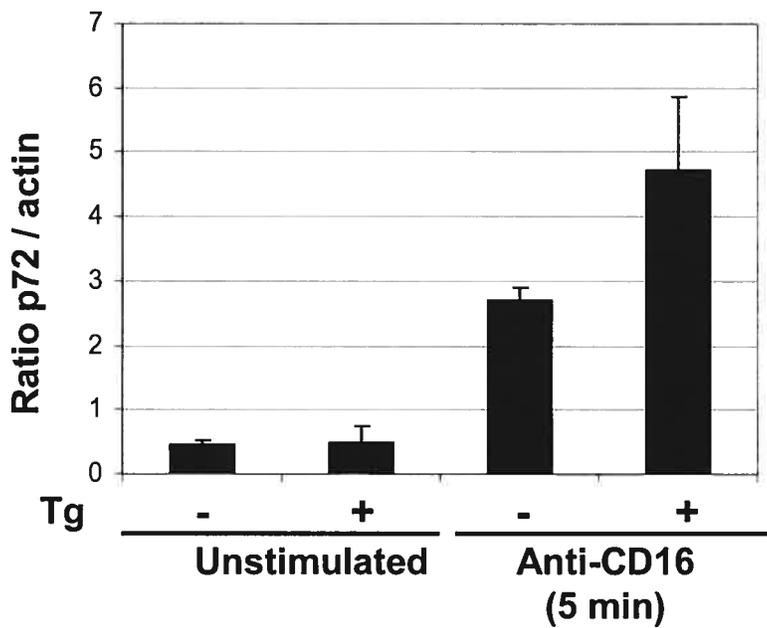


Figure 6 (Jovanovic et al)

APPENDICE II

Les résultats présentés dans cet appendice sont complémentaires au chapitre III. Nous avons poursuivi l'étude des différentes fonctions biologiques de Nef dans les macrophages. Nous avons déterminé le rôle de Nef au niveau de l'adhérence des macrophages ainsi que son rôle dans l'altération du signal intracellulaire des GTPases dans certaines cellules primaires provenant des souris Tg et non-Tg.

Les macrophages péritonéaux provenant des souris Tg où Nef interagit avec NAK démontrent un retard dans la formation de filipodes.

L'enrichissement des macrophages péritonéaux présents dans la cavité abdominale des souris est obtenu suite à l'adhésion des cellules péritonéales dans les plats de Petri pendant une période de trois heures. Suite à cette incubation, seuls les macrophages resteront adhérents à la surface du Pétri. Comme nous l'avons démontré au chapitre III, les macrophages péritonéaux des souris Tg exprimant Nef^{WT} (Nef^{MutG}) possèdent une morphologie différente de celle des cellules non-Tg. Ces différences sont caractérisées par une diminution du nombre de prolongation cytoplasmique et une morphologie moins allongées chez les macrophages Tg. Afin d'étudier le rôle de l'interaction entre Nef et NAK dans l'altération de la morphologie des macrophages péritonéaux, nous avons observé et comparé les macrophages provenant des souris Tg CD4C/HIV-Nef, CD4C/HIV-Nef^{RD35AA}, CD4C/HIV-Nef^{D174K}, CD4C/HIV-Nef^{G2A}, CD4C/HIV-Nef^{RR105/106AA}, CD4C/HIV-Nef^{P69A} et non-Tg. Comme le démontre la figure 3-1, les macrophages provenant des souris Tg pouvant interagir avec NAK (CD4C/HIV-Nef^{WT}, CD4C/HIV-Nef^{RD35AA}, CD4C/HIV-Nef^{D174K}) possèdent une forme plus arrondies que leur témoin non-Tg. Les cellules non-Tg sont beaucoup plus effilées et allongées. Cependant, ce phénotype est apparent seulement lors des premières heures suivant l'adhésion des cellules. Lorsqu'ils sont observés sur une période de six heures, les macrophages Tg démontrent une forme et une taille similaire aux macrophages non-Tg. Par opposition, les cellules provenant des souris Tg ne démontrant aucune interaction et activation de PAK2 (CD4C/HIV-Nef^{G2A}, CD4C/HIV-Nef^{RR105/106AA} et CD4C/HIV-Nef^{P69A}) possèdent une morphologie similaire aux cellules non-Tg. La taille et le facteur d'élongation des macrophages provenant des différents mutants de Nef n'a pu être déterminé dû au nombre limité d'expérience effectuée.

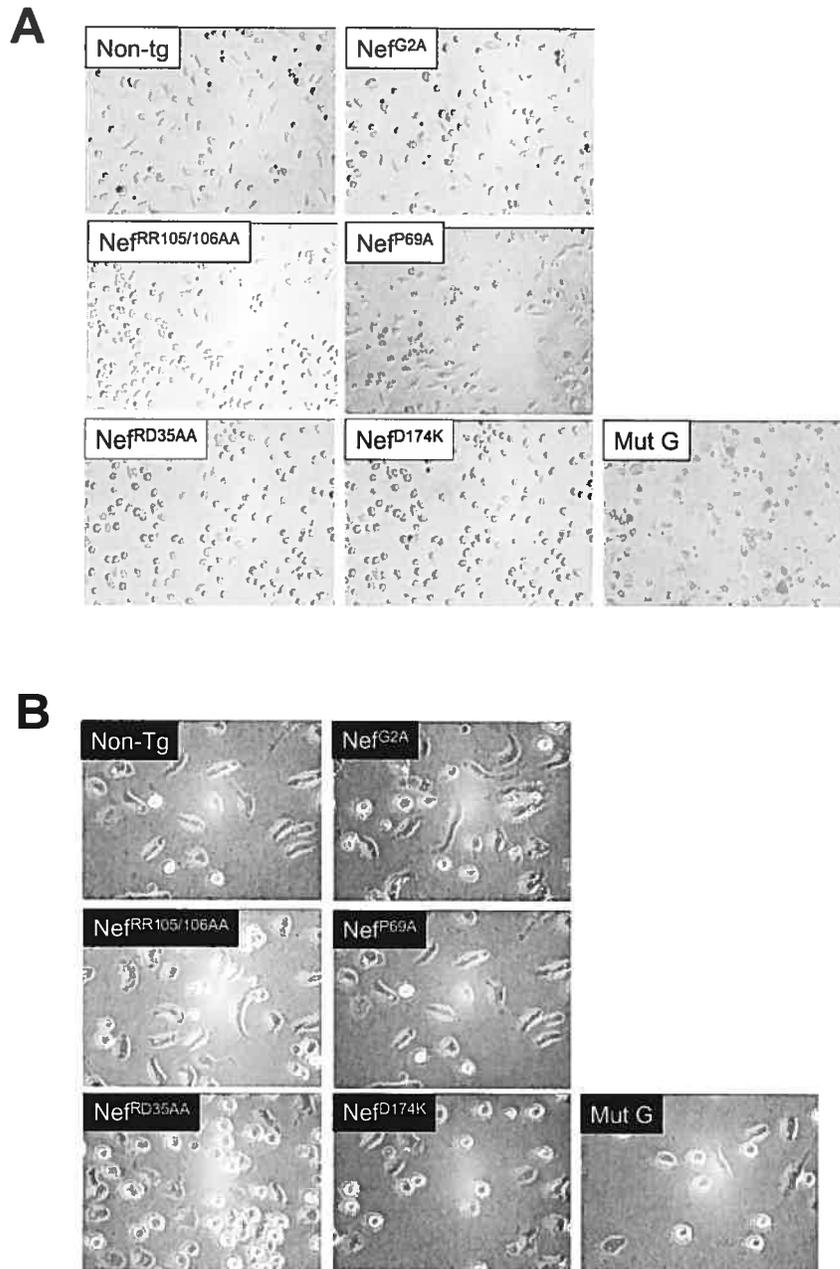


Figure 3-1: Nef retarde la formation de filipodes chez les macrophages péritonéaux provenant des souris Tg CD4C/HIV-Nef. Photographie de macrophages péritonéaux provenant de souris Tg CD4C/HIV-Nef^{WT}, CD4C/HIV-Nef^{RD35AA}, CD4C/HIV-Nef^{D174K}, CD4C/HIV-Nef^{P69A}, CD4C/HIV-Nef^{RR105/106AA}, CD4C/HIV-Nef^{G2A} et non-Tg ayant adhéré dans des chambres de cultures en plastique pour une durée de trois heures. Grossissement 20X (A) et 40X (B)

Nef provoque la désactivation de Rac chez les cellules provenant des souris Tg

Les membres de la famille PAK sont impliqués dans une grande panoplie d'activités biologiques dont la réorganisation du cytosquelette, l'apoptose et la signalisation de la voie MAPK (résumé dans Bokoch, 2003). Pour accomplir leur fonction, ces protéines doivent être activées par différents effecteurs. Les GTPases de la famille Rho, et en particulier les membres Rac, sont une famille de protéine impliquée dans l'activation des membres de la famille PAK (Knaus *et al*, 1998; Mira *et al*, 2000; Jakobi *et al*, 1996). Afin de vérifier l'implication de Rac dans l'activation de PAK2 observée chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef, nous avons déterminé le niveau d'activation de Rac dans les thymocytes, macrophages et cellules dendritiques provenant de souris Tg CD4C/HIV-Nef et non-Tg. Pour ce faire, nous avons utilisé la propriété des molécules Rac activé (RAC-GTP) à se lier sur une région précise de PAK (PBD (p21 binding domain), voir figure 1-5)). Une protéine de fusion GST-PBD est dans un premier temps incubée avec un lysat cellulaire. Par la suite, cette protéine de fusion est précipitée avec des billes d'agarose couplées à la glutathione (substrat de la GST (glutathione-S-transferase)). Le précipitat est alors chargé sur un gel de protéine suivi d'un Western blot en utilisant un anticorps anti-Rac qui reconnaît la forme activée et non-activée de Rac. La quantification des protéines Rac révélées par Western blot permettra de déterminer la portion de Rac activé dans chaque échantillon).

Suite à une précipitation de la forme activée de Rac avec la protéine de fusion GST-PBD, un western blot avec un anti-Rac permet de déterminer la quantité de Rac activé précipité. Par la suite, un western blot avec l'anti-Rac sur des extraits totaux des différentes cellules permet de normaliser la quantité de Rac activé précipité (Figure 3-2 A). La quantité de Rac activé présent dans chaque sous-population fut quantifié en faisant le ratio entre la quantité de Rac activé précipité et la quantité de Rac total présent dans l'échantillon (Figure 3-2 B). On peut observer que les thymocytes provenant des souris Tg possèdent environ deux fois moins de Rac activé lié au GTP comparativement à leur témoin. Ce résultat est hautement significatif malgré un large écart-type. Cette observation est également présente chez les macrophages et les cellules dendritiques provenant des souris Tg. Cependant, une analyse statistique n'a pu être effectuée due au faible nombre

d'expérience effectuée (n=2 pour les macrophage et n=1 pour les cellules dendritiques). On peut cependant noter une tendance similaire dans les trois types de cellules.

Dans le but de déterminer si PAK2 était impliqué dans la désactivation de Rac, nous avons vérifié le niveau de Rac activé chez les thymocytes provenant des souris Tg exprimant Nef^{RR105/106AA} et Nef^{G2A}, deux lignées de souris ne pouvant se lier avec PAK2, ainsi que chez leur témoin non-Tg. Suite à la quantification (comme énoncé précédemment), les résultats démontrent un niveau comparable de Rac activé lié au GTP chez les souris non-Tg et Tg suggérant une implication de PAK2 dans la désactivation de Rac.

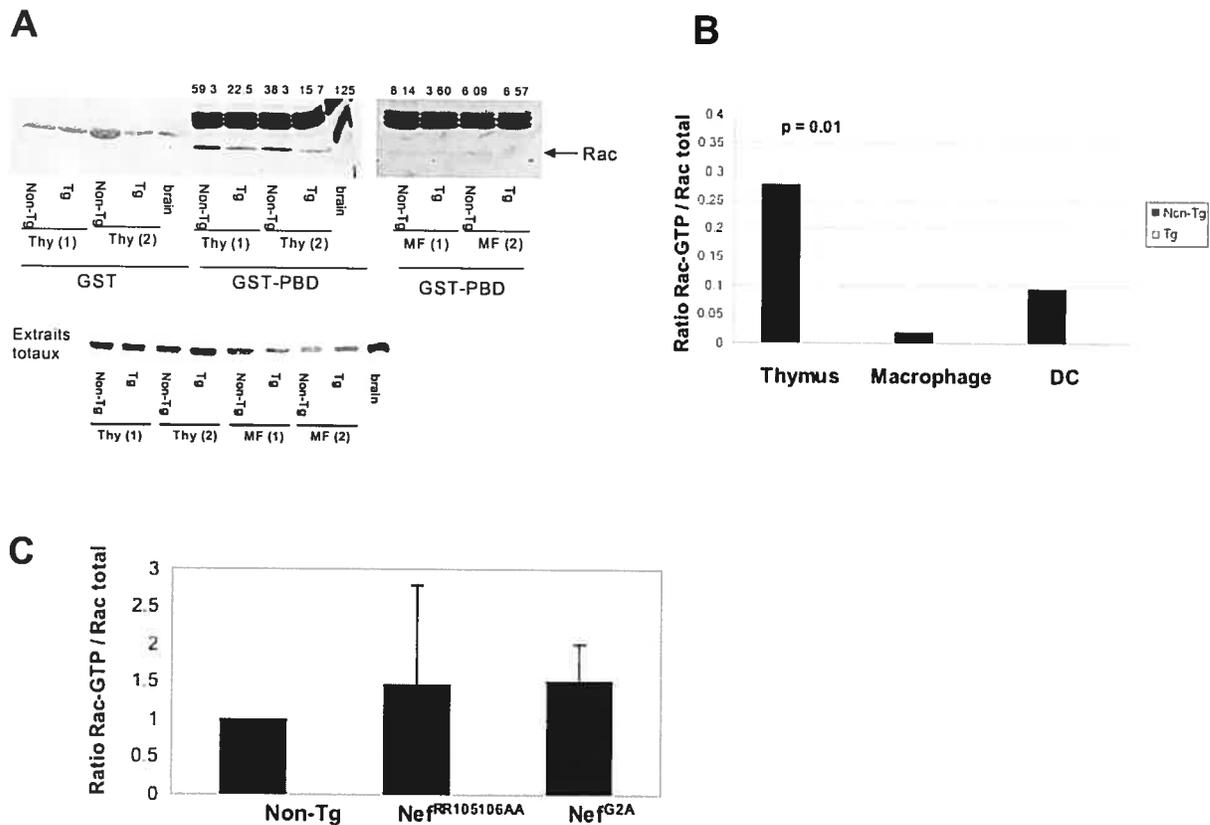


Figure 3-2: Nef inhibe l'activation de Rac dans les souris Tg CD4C/HIV-Nef

La protéine Rac activée fut précipitée à l'aide de la construction GST-PBD (40 μ g) dans 1mg d'extrait de thymocytes et 250 μ g d'extrait de macrophages provenant de souris Tg et non-Tg (A; figure du haut). La détection de la protéine Rac fut effectuée à l'aide d'un Western blot avec un anticorps anti-Rac (1:1000; clone 2.4G2 (Pharmingen)). La construction GST(40 μ g) précipitée également dans 1mg d'extrait de thymocytes et 250 μ g d'extrait de macrophages provenant de souris Tg et non-Tg est utilisée comme témoin négatif. Une normalisation est effectuée en comparant le niveau d'expression de la protéine Rac (A; figure du bas). (B) Représentation graphique du ratio entre la quantité de Rac activé et la quantité de Rac total dans le thymus, macrophages et cellules dendritiques des souris Tg CD4C/HIV-Nef et non-Tg. (C) Représentation graphique du ratio entre la quantité de Rac activé chez les thymocytes provenant des souris Tg CD4C/HIV^{RR105/106AA}, CD4C/HIV-Nef^{G2A} et non-Tg. Les résultats ont été normalisé aux souris non-Tg

CHAPITRE IV

CONCLUSIONS

4.1 HIV-1 Nef interagit avec PAK2 dans un complexe protéique incluant β -PIX et p95PKL chez les souris Tg CD4C/HIV^{mut}

L'un des objectifs de ce projet de recherche était de déterminer quels étaient les partenaires cellulaires associés à la protéine Nef du VIH-1 chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef. Nous avons démontré dans le chapitre 2, à l'aide d'un essai kinase suivant une immunoprécipitation avec un anti-Nef, trois principaux substrats phosphorylés associés avec Nef. Le substrat p62 est probablement la kinase elle-même et décrite comme étant PAK2 (Renkema *et al*, 1999). Par contre, dans la littérature scientifique, les deux autres substrats ne sont toujours pas bien déterminés. Brown *et al* (1999), avec une technique de ré-immunoprécipitation, ont démontré que le substrat p85 était β -PIX et suggèrent également que le substrat p95 représente p95PKL, reconnu pour interagir fortement avec PAK et PIX (Turner *et al*, 1999). Également, Renkema *et al* (2001) ont observé, lors d'un essai kinase avec un anti-Nef ou un anti-PAK, que la destruction du site de liaison entre PAK et β -PIX provoque la perte des substrats p85/p88 suggérant sa présence dans le complexe Nef/PAK2. Cependant, personne n'a pu démontrer clairement l'identité du substrat phosphorylé p95. Suite à nos expérimentations, nous avons démontré qu'une immunoprécipitation avec un anti- β -PIX suivi d'un essai kinase révèle la présence de substrats identiques à ceux retrouvés avec une immunoprécipitation par un anti-Nef. Bien qu'il s'agisse d'une preuve indirecte, ces résultats suggèrent que β -PIX, capable de se lier aux mêmes substrats que Nef, fait parti du complexe incluant Nef et PAK2. De plus, nous avons démontré avec un essai kinase suivant une immunoprécipitation avec un anti-p95PKL que les substrats obtenus étaient également identiques à ceux obtenus avec un anti-Nef (figure 2-1) suggérant également que p95PKL fait parti du complexe Nef/PAK2/ β -PIX. Cette observation, observée seulement dans les thymocytes des souris Tg, indique que p95PKL serait spécifique à certains tissus comme le thymus. Les substrats phosphorylés p85 et p95 obtenus suite à un essai kinase avec un anti-Nef semblent provenir de la même protéine ayant subi des modifications post-traductionnelles. En effet, les résultats provenant de la digestion protéolytique de ces

deux substrats appuient cette hypothèse. Le profil de digestion des substrats p85 et p95 avec la chymotrypsine démontrait des patrons de digestions identiques entre eux tandis que celui obtenu avec l'endopeptidase V8 était très similaire. Ces résultats suggèrent fortement que les substrats p85 et p95 proviennent de la même protéine ayant subi des changements post-traductionnels. Shin *et al* ont démontré par Western blot que la stimulation de cellules PC12FW avec le β FGF provoque une diminution de la mobilité de β -PIX (Shin *et al*, 2002). Ce résultat est caractérisé par un doublet protéique d'un poids moléculaire d'environ de 85 et 88 kDa et représente différents niveaux de phosphorylation de la protéine. Les substrats p85 et p95 que nous obtenons suite à l'essai kinase pourrait être caractérisés comme étant une diminution de mobilité de β -PIX causé par différents niveaux de phosphorylation comme observé par Shin *et al*.

4.1.1 VAV n'est pas présent dans le complexe Nef/NAK

Les partenaires cellulaires pouvant interagir avec Nef sont largement documenté dans des lignées de cellules humaines établies (résumé dans Geyer *et al*, 2001; Wei *et al*, 2003). Parmi ces candidats, VAV, une protéine de la famille GEF a retenu notre attention. Premièrement, sa masse moléculaire de 85 kDa correspondait avec celle d'un des substrats obtenus lors de l'essai kinase. Deuxièmement, Fackler *et al* (1999) ont démontré que Nef se lie et active VAV afin de promouvoir une réorganisation du cytosquelette, un phénotype également observé chez les macrophages provenant de souris Tg CD4C/HIV-Nef^{WT} (discuté lors d'un prochain chapitre). L'essai kinase effectué sur des thymocytes et macrophages provenant de souris Tg CD4C/HIV^{mutG} croisées avec une souris VAV K.O. nous a permis de démontrer que VAV n'est pas l'un des substrats associés à NAK (figure 2-2). Effectivement, nous pouvons toujours observer la présence des substrats p85 et p95 suite à l'essai kinase. De plus, en l'absence de VAV, le niveau de phosphorylation de la kinase elle-même ainsi que celui de ses substrats semble augmenter ce qui suggère que la présence de VAV dans les cellules inhibe la réaction enzymatique. Cependant, chez ces souris K.O., seulement le membre VAV1 n'est pas fonctionnel (Turner *et al*, 1997). Un mécanisme de compensation par les autres membres de la famille VAV pourrait expliquer l'augmentation de phosphorylation de PAK2 et de ses substrats. Une interaction entre Nef et VAV2 est également démontrée chez des

fibroblastes en culture (Fackler *et al*, 1999). Bien qu'on ne puisse exclure avec certitude l'implication de VAV dans la formation et l'activation du complexe Nef/PAK2, nos résultats renforcent l'identité du substrat p85 comme étant β -PIX, également une protéine membre de la famille GEF. Bien que plusieurs groupes aient démontré que VAV est une protéine importante dans la signalisation cellulaire des lymphocytes T (Tybulewicz *et al*, 2003; Hornstein *et al*, 2004), Nef préférerait un autre membre de la famille pour altérer la signalisation cellulaire chez les thymocytes et macrophages péritonéaux murins.

4.1.2 L'interaction entre Nef et NAK est également présente chez les souris Tg exprimant le mutant T71R

Les analyses mutationnelles de la protéine Nef ont démontré que le motif de polyproline proximal était indispensable pour l'interaction entre Nef et PAK2. Nous avons également démontré que la mutation T71R de Nef n'abolissait pas cette interaction mais permet de détecter de nouveaux substrats encore inconnus chez les macrophages et thymocytes de ces souris Tg (figure 2-3). La protéine Nef contenant une arginine en position 71 se retrouve chez les souches du VIH-1 dites naturelles et est retrouvée chez les patients infectés par le VIH-1 (Kirchhoff *et al*, 1999). La souche NL4-3 utilisée en laboratoire et contenant une thréonine en position 71 est souvent utilisée comme témoin positif pour étudier les effets de Nef sur l'augmentation de la réplication virale. Renkema *et al* (1999) ont observé que le mutant T71R ne possède aucune différence notable dans sa capacité d'interagir avec PAK2. Par contre, Fackler *et al* (1999) ont démontré que ce mutant permet une plus grande phosphorylation de PAK. Nos résultats confirment cette observation car nous observons également un plus haut niveau de phosphorylation de NAK et de ses substrats avec ce mutant de Nef comparativement à la protéine non mutée. De plus, nous pouvons observer l'apparition de nouveaux substrats avec le mutant T71R. Lorsqu'ils sont rassemblés, ces résultats suggèrent que le mutant Nef T71R active encore plus fortement NAK que la protéine non mutée. Cette augmentation de l'activité de NAK pourrait être provoquée par une plus forte liaison entre Nef et NAK. La mutation du résidu 71, situé immédiatement devant le site de polyproline, entraînerait un changement de conformation de la protéine favorisant ainsi une plus grande affinité entre Nef et ses partenaires cellulaires. Cependant, des expériences préliminaires n'ont pas permis de

démontrer en utilisant des méthodes d'immunoprécipitation suivi de Western Blot une interaction entre Nef et PAK2 ainsi qu'entre Nef et β -PIX (non illustré). L'essai kinase est une méthode très sensible qui favorise probablement la détection de substrats indétectables par des méthodes traditionnelles de biochimie.

4.1.3 La présence de Nef dans une seule sous population cellulaire est suffisante pour permettre son interaction avec NAK.

Chez les souris CD4C/HIV-Nef, le transgène est exprimé dans trois sous-populations principales : les lymphocytes T CD4+, les thymocytes double positif et les macrophages et les cellules dendritiques. L'une des hypothèses apportées à nos travaux fut que la présence de Nef dans une seule sous population cellulaire est suffisante pour permettre l'interaction Nef/NAK. Nous avons utilisé diverses lignées de souris Tg exprimant Nef sous le contrôle d'un promoteur spécifique ciblant la protéine à certaines sous-populations cellulaires. Les promoteurs mCD4, CD4E, hCD68, CD11c, E α et CD4F permettent l'expression de Nef respectivement dans les sous populations décrites à la figure 2-5.

L'absence d'interaction entre Nef et NAK chez les macrophages provenant des souris Tg exprimant le transgène sous le contrôle des promoteurs mCD4 et CD4E était attendue. Ces deux promoteurs sont spécifiques aux lymphocytes T. Il est donc normal de ne pas retrouver de substrats phosphorylés chez les macrophages péritonéaux suite à l'essai kinase. De plus, l'absence d'interaction entre Nef et NAK valide la technique de purification des macrophages péritonéaux où sont également présents, dans la cavité abdominale des souris, des lymphocytes T. Ces dernières cellules sont donc adéquatement éliminées lors de la préparation cellulaire. La présence de substrats de NAK dans les thymocytes des souris Tg CD11c/HIV^{mutG} et hCD68/HIV^{mutG} ayant des promoteurs spécifiques respectivement pour les cellules dendritiques et les macrophages ne sont pas surprenants. Effectivement, ces deux sous populations cellulaires sont retrouvées dans le thymus des souris. Bien que leur nombre soit en faible quantité, de l'ordre de 1 à 2 %, le niveau de phosphorylation des substrats est comparable à celui retrouvé chez les souris Tg qui expriment Nef uniquement dans les lymphocytes T. Cette observation démontre la très grande sensibilité de l'essai kinase et qu'un faible niveau

d'expression du transgène est suffisant pour permettre la détection de son interaction avec NAK. Suite à ces différentes analyses, on peut conclure que la présence du transgène dans une seule sous population cellulaire (thymocyte, macrophage ou cellule dendritique) est suffisante pour permettre l'interaction entre Nef et NAK.

4.1.4 L'interaction entre Nef et NAK est un phénomène conservé chez diverses souches du VIH-1

L'association entre Nef et PAK2 est l'une des fonctions biologiques de Nef largement étudiée. Cependant, les souches du VIH-1 utilisés lors de ces études furent relativement similaires. Avec l'aide de nouvelles souris Tg, nous avons donc augmenté le nombre de souche du VIH-1 à étudier. Parmi ces nouvelles souches, quelques-unes proviennent de patients infectés et dont la maladie du SIDA ne progresse pas (habituellement nommés Long Term Non-Progressor) et d'autres isolats utilisés sont reconnues pour induire le SIDA chez les patients infectés. Toutes les souches étudiées, à l'exception de JRCSF démontraient une interaction entre Nef et NAK (figure 2-4). Une explication possible pour cette exception serait que l'anti-Nef, généré à partir de la souche NL4-3, ne reconnaît pas ou reconnaît faiblement la protéine Nef provenant de la souche JRCSF. Foster *et al* (2001) n'ont également pu démontrer l'interaction entre NAK et Nef provenant de la souche JRCSF mais ils ont utilisé un anti-Nef généré à partir de l'isolat SF2. Peut-être ont-ils expérimenté le même problème que nous ou effectivement la protéine Nef provenant de la souche JRCSF n'interagit pas avec NAK. Une étude récente effectuée sur des chimpanzés a démontré que la capacité de SIV-Nef à interagir avec PAK2 est un phénomène conservé parmi différents groupes de lentivirus primates (Kirchhoff *et al*, 2004). Il n'est donc pas surprenant d'observer que la totalité des variants à l'exception d'un soit capable d'interagir avec NAK chez les souris Tg.

4.1.5 NAK est présent dans les thymocytes double négatifs des souris Tg CD4C/SHIV-*nef*^{SIV}

Simard *et al* ont démontré que les souris Tg CD4C/SHIV-*nef*^{SIV} possèdent une accumulation de thymocytes doubles négatifs et démontrent que l'expression du transgène procure un phénotype immature de ces cellules (Simard *et al*, 2002).

L'interaction entre Nef et NAK dans ces cellules doubles négatives pourrait jouer un rôle dans l'accumulation des cellules et ainsi perturber le développement des thymocytes. Cette interaction fut effectivement démontrée dans les thymocytes double négatifs provenant des souris Tg CD4C/SHIV-*nef*^{SIV} (figure 2-6). De plus, Stove *et al* (2003) ont démontré à l'aide d'un système de culture de thymus fœtal que les thymus infectés par un virus contenant la protéine Nef avec des mutations ne lui permettant plus d'interagir avec PAK2 (G2A, PPAA et R106A) possédaient un phénotype similaire à celui retrouvé chez des thymus non infectés. Leurs résultats suggéraient un rôle de PAK2 dans la thymopoïèse. L'interaction entre SIV Nef et NAK pourrait jouer un rôle important dans la perturbation du développement des thymocytes. Les mécanismes impliqués dans cette perturbation restent cependant à être élucidés. Manninen *et al* ont démontré que les mutants de Nef ne pouvant s'associer avec PAK2 (G2A, AXXA et R106A) ne peuvent induire l'activation de NFAT chez les cellules Jurkat (Manninen *et al*, 2001). Ce mécanisme pourrait être utilisé par Nef pour affecter la thymopoïèse.

4.1.6 NAK est absent dans les oligodendrocytes des souris Tg MBP/HIV^{Nef}

Parmi les principales cellules cibles du VIH-1, on retrouve les lymphocytes T CD4+, les macrophages et les cellules dendritiques. Également, lors de l'infection par le VIH-1, certaines cellules présentes dans le cerveau peuvent être infectées. Les astrocytes et les oligodendrocytes peuvent supporter la réplication du VIH-1. Nous avons donc utilisé les souris Tg MBP/HIV^{Nef} afin de vérifier si Nef interagit avec NAK dans les oligodendrocytes et nous avons démontré que Nef n'interagissait pas avec NAK dans la moelle épinière des souris Tg MBP/HIV^{Nef} (figure 2-7). De plus, PAK2 n'est pas activé par la présence de Nef dans ces cellules comme le démontre le niveau de phosphorylation similaire des substrats p62, p85 et p95 chez les souris Tg et non-Tg suite à un essai kinase avec un anti-PAK2. Cette observation est contraire avec celle retrouvée chez les thymocytes, macrophages et cellules dendritiques provenant des souris Tg CD4C/HIV^{mutG} où PAK2 est fortement activé par le transgène. Radja *et al* (2003) ont montré que ces souris Tg MBP/HIV^{Nef} développaient une myélopathie vacuolaire. Nos résultats confirment que le développement cette maladie et l'altération de la signalisation intracellulaire qui lui est caractéristique ne sont pas causées par l'augmentation de

l'activation de PAK2 par Nef ni par l'interaction entre Nef et NAK dans la moelle épinière des souris Tg MBP/HIV^{mutG}. La protéine NG2, un marqueur de plusieurs types de cellules précurseurs non différenciées, incluant les oligodendrocytes progénitrices dans le système nerveux central, est impliquée dans la motilité cellulaire menant à la transduction des signaux et au réarrangement du cytosquelette (Stallcup, 2002). Majumdar *et al*, ont aussi démontré que la transduction des signaux de NG2 passe par la voie Rac-p130CAS (Majumdar *et al*, 2003). De plus, Stallcup suggère que PAK puisse être impliqué suite à l'activation de Rac dans la transduction des signaux suite à la liaison de NG2 et son ligand (Stallcup, 2002). Suite à ces diverses observations, la vérification de l'implication de PAK2 dans le développement des oligodendrocytes provenant des souris Tg MBP/HIV^{Nef} s'imposait car ils démontrent un phénotype immature et une altération des certaines voies de signalisation. L'interaction entre Nef et PAK2 dans la moelle épinière de ces souris Tg aurait pu être la cause de cette altération de la transduction des signaux et ainsi provoquer le phénotype immature des oligodendrocytes.

4.1.7 L'interaction entre Nef et PAK2 n'est pas suffisante pour induire la maladie

Avec l'aide de souris Tg exprimant différentes mutations de la protéine Nef du VIH-1, nous avons démontré dans le chapitre II que l'interaction entre Nef et NAK n'est pas suffisante pour induire la maladie similaire au SIDA retrouvé chez la souris CD4C/HIV-Nef^{WT}. Nous avons premièrement tenté de corrélérer cette interaction avec la régulation négative du CD4 de la surface cellulaire. Aucune corrélation positive n'a pu être établie car une régulation négative du CD4 peut être observée en absence ou en présence d'une interaction avec NAK (Vincent *et al*, 2006 table 4, article soumis pour publication). De plus, chez les mutants reconnus pour abolir la régulation négative du CD4 (RD³⁵AA et D¹⁷⁴K) la présence d'une association entre Nef et NAK est observée. Ces même mutants ont partiellement conservé la capacité à activer les cellules T CD4⁺ retrouvées dans le système immunitaire périphérique. Également, ils possèdent une diminution de leur réponse *in vitro* suite à une stimulation via le TcR (Hanna *et al*, 2006). L'interaction entre Nef et NAK dans ces mutants pourrait être impliquée dans ces deux phénotypes décrits par Hanna *et al*. Il a été clairement démontré que les membres de la famille PAK joue un rôle important dans l'activation la prolifération cellulaire (résumé

dans Bokoch, 2003). L'augmentation de l'activité de PAK2 suite à son interaction avec Nef pourrait expliquer l'activation cellulaire observée dans les cellules T CD4⁺ dans les mutants CD4C/HIV-Nef^{RD35AA} et CD4C/HIV-Nef^{D174K}

Par la suite, nous avons tenté de corréler l'association entre Nef et NAK avec la déplétion des cellules T CD4⁺. Également, aucune corrélation n'a pu être obtenue. Effectivement, une déplétion des cellules T CD4⁺ peut être observée chez les souris Tg démontrant une association entre Nef et NAK (RD³⁵AA, D¹⁷⁴K, Δ8–17, Δ25–35) ainsi que celles ne pouvant s'associer avec NAK (G²A, P⁷²AxxP⁷⁵A, P⁶⁹A et RR^{105/106}AA). De plus, cette association induit la phosphorylation de Bad ce qui l'inactive et augmente la survie cellulaire (Wolf *et al*, 2001). Chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef, ce mécanisme ne semble pas impliqué dans la survie des cellules car les thymocytes provenant du mutant P⁶⁹A, ne pouvant s'associer ni activer PAK2, démontrent un niveau d'apoptose élevé comparativement aux cellules témoins. Ces résultats démontrent clairement que l'association entre Nef et NAK n'est pas indispensable pour provoquer une maladie chez les souris Tg.

La seule corrélation positive pouvant être faite est celle entre l'absence d'interaction Nef/NAK et l'absence de maladie liée aux organes non lymphoïdes. En effet, aucune des souris Tg où Nef ne peut s'associer à NAK ne démontre des signes de pathologie au niveau de ces organes. Cette observation suggère que l'interaction Nef/NAK puisse jouer un rôle dans le développement de pathologies liées aux organes non-lymphoïdes comme le rein, les poumons et le coeur. L'interprétation de ces résultats est cependant plus difficile car certaines de ces mutations affectent également d'autres fonctions biologiques caractéristiques à Nef comme l'abolition de l'interaction entre Nef à Hck chez le mutant P⁷²AxxP⁷⁵ ou l'abolition de toutes les fonctions biologiques de Nef chez le mutant G²A.

4.2 Les macrophages exprimant la protéine Nef du VIH-1 possèdent un phénotype activé

Un deuxième objectif spécifique de ce projet de recherche était de caractériser diverses fonctions biologiques des macrophages provenant des souris Tg CD4C/HIV-Nef. Les macrophages péritonéaux représentent une sous-population de macrophages faciles à récolter et à purifier. Une simple adhésion de ces cellules sur la surface d'une boîte de Pétri permet de les isoler facilement des autres cellules présentes dans la cavité abdominale des souris. Nous aurions également pu étudier les macrophages dérivés de la moelle osseuse mais l'obtention d'une population pure est laborieuse et requiert une longue période d'incubation avec des facteurs de différenciation.

4.2.1 Nef provoque des changements au niveau de la structure du cytosquelette des macrophages

Comme nous l'avons démontré au chapitre 3, les macrophages péritonéaux exprimant Nef prennent plus de temps à former des filipodes. Sans stimulation avec le LPS, les cellules Tg possèdent une forme beaucoup plus arrondie que leur témoin non-Tg. De plus, ils possèdent une taille ainsi qu'un diamètre plus faible que leurs témoins. Ces observations pourraient être expliquées par trois différents mécanismes. Un premier serait l'interaction entre Nef et les protéines du cytosquelette, le deuxième est l'activation de PAK2 par Nef et le troisième serait la désactivation de Rac chez les cellules transgéniques. Différents groupes de recherche ont montré l'association entre PAK2 et la chaîne régulatrice de la myosine de type II (RMLC). De plus, l'interaction entre ces deux protéines mène à leur inhibition et à une rétraction cellulaire et un réarrangement du cytosquelette (Zeng *et al*, 2000; Goeckeler *et al*, 2000; Chew *et al*, 1998). Nous avons démontré que l'interaction entre Nef et PAK2 induit une augmentation de l'activité enzymatique de PAK2. Étant suractivé, PAK2 pourrait par la suite interagir avec les substrats du cytosquelette cellulaire ce qui mènerait à leur inactivation et causerait l'incapacité des macrophages péritonéaux Tg à former des filipodes. Goeckeler *et al* (2000) ont observé un phénotype similaire des cellules *in vitro* et ont montré que PAK2 est capable de phosphoryler MLCK et inhiber sa fonction ce qui résulte en une diminution de la formation de fibre de tension. Pour corroborer ces observations, nous

avons démontré que les macrophages péritonéaux provenant des souris Tg exprimant des mutants de Nef ne pouvant s'associer et activer PAK2 (G^{2A} , P^{69A} et $RR^{105/106AA}$) possèdent une morphologie semblable aux macrophages non-Tg (figure 3-1). De plus, la morphologie des macrophages péritonéaux provenant des souris Tg exprimant des mutants de Nef capable d'interagir et d'activer PAK2 (RD^{35AA} , D^{174K}) est similaire à celle des souris Tg CD4C/HIV-Nef^{WT}. Cette observation indique que l'activation de PAK2 par Nef est impliquée dans l'altération de la morphologie des macrophages.

D'autre part, Nef est une protéine capable d'interagir directement avec l'actine (Fackler *et al*, 1997). Cette association pourrait provoquer un encombrement stérique et empêcher l'association entre l'actine et ses effecteurs la rendant du coup non fonctionnelle. Ce phénomène pourrait alors provoquer les phénotypes observés chez les macrophages exprimant Nef^{WT}. La désactivation de Rac chez les macrophages Tg exprimant Nef^{WT} pourrait également provoquer l'absence ou le retard dans la formation de filipodes (figure 3-2). En effet, la formation de filipodes et la réorganisation du cytosquelette sont des mécanismes nécessitant une fonction normale des GTPases de la famille Rho et en particulier les membres Rac (Williams *et al*, 2000; Gu *et al*, 2003; Wells *et al*, 2003). De plus, nous avons également démontré une augmentation de podosomes chez les macrophages Tg exprimant Nef^{WT}. Les podosomes sont des structures transitoires se produisant spécifiquement dans les monocytes dérivés des cellules hématopoïétiques incluant les macrophages et les ostéoclastes et dont la fonction est de permettre aux cellules d'adhérer à une surface via leur intégrines (Mizutani *et al*, 2002). La formation des podosomes est largement dépendante de l'activité des protéines tyrosine kinase de la famille de Src (Bruzzaniti *et al*, 2005; Gatesman *et al*, 2004; Berdeaux *et al*, 2004). L'augmentation de leur nombre chez les macrophages péritonéaux Tg suggère une activité accrue des protéines Src causée par Nef. Dans ce sens, Nef possède la capacité de se lier à ces protéines et d'augmenter leur activité. Quelle serait la conséquence de l'augmentation des podosomes chez les macrophages Tg ? Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a essayé de répondre à cette question. Une hypothèse serait que Nef, par l'augmentation du nombre de podosomes chez les cellules Tg, augmente le

niveau d'adhésion des cellules ce qui les empêchent de se mouvoir et ainsi limite leur capacité capter les pathogènes circulant dans la souris Tg.

4.2.2 Les macrophages péritonéaux Tg démontrent une déficience dans leurs activités d'endocytose et de phagocytose.

L'endocytose et la phagocytose sont deux activités biologiques essentielles des macrophages. Nous avons déterminé *in vitro* la capacité des macrophages péritonéaux à accomplir ces deux activités biologiques. Dans le chapitre III, nous avons démontré que l'endocytose et la phagocytose est augmentée dans les macrophages péritonéaux Tg comparativement aux cellules non-Tg stimulées par le LPS. Cependant, on observe une augmentation de ces deux activités suite à la stimulation, des cellules non-Tg mais pas pour les cellules Tg. L'incapacité des cellules Tg à répondre au stimulus suggère que ces dernières possèdent un niveau d'activation plus élevé à l'état basal que leurs témoins non-Tg. La phagocytose est un mécanisme dépendant des kinases de la famille Src. L'interaction entre Nef et l'un des membres de cette famille, reconnue pour accroître l'activité kinase des membres de la famille Src, pourrait expliquer l'augmentation de la phagocytose sans la présence d'un stimulus chez les cellules Tg. L'augmentation de l'activité de PAK2 par Nef pourrait également jouer un rôle dans cette augmentation de la phagocytose et de l'endocytose. Pour appuyer cette hypothèse, l'implication de PAK2 dans l'activation des lymphocytes T suite à l'engagement du TcR est un mécanisme caractérisé chez des cellules en culture (Chu *et al*, 2004).

4.2.3 Nef augmente la phosphorylation des résidus de tyrosines des macrophages péritonéaux stimulés par le Fc γ récepteur

Suite à la stimulation des macrophages via le Fc γ R, on observe chez les macrophages péritonéaux Tg un niveau de phosphorylation plus élevé d'une protéine ayant un poids moléculaire d'environ 72 kDa (chapitre III). Cette observation démontre que Nef altère la transduction des signaux dans les macrophages Tg tout comme chez les thymocytes (Hanna *et al*, 1998) et les lymphocytes T CD4⁺ provenant des ganglions périphériques (Weng *et al*, 2004). L'identité de cette protéine, bien qu'elle n'ait pas fait l'objet d'études approfondies, est probablement Syk, une protéine tyrosine kinase. Suite à

la stimulation de macrophages avec un anti-Fc γ R, la protéine Syk devient hautement phosphorylée sur des résidus de tyrosine (Crowley *et al*, 1997; Fitzer-Attas *et al*, 2000). De plus, Crowley et collaborateur ont démontré que les macrophages provenant de souris « knock-out » pour le gène Syk possèdent une déficience dans la phagocytose démontrant ainsi un lien direct entre la protéine Syk et la phagocytose. Nef semble donc perturber la phagocytose des macrophages en augmentant la phosphorylation de la protéine Syk par un mécanisme encore inconnu. Suite à l'activation du Fc γ R qui devient phosphorylé sur les motifs ITAM par la protéine Lyn de la famille Src (Ghazizadeh *et al*, 1994; Fitzer-Attas *et al*, 2000), Syk se lie aux motifs ITAM phosphorylés via ses motifs de type SH2. Par la suite, il phosphoryle ses divers substrats dont la PI3K (Crowley *et al*, 1997) et la phospholipase C (Aderem et Underhill, 1999). Un mécanisme par lequel Nef pourrait altérer cette voie de signalisation serait son interaction avec Lyn ce qui provoquerait son activation et l'activation de la cascade de phosphorylation. Une telle interaction entre Nef et Lyn a été déjà observée *in vitro* (Cheng *et al*, 1999; Saksela *et al*, 1995). Kedzierska *et al* (2002) démontrent que l'infection de macrophages dérivés de la moelle osseuse humaine par le VIH-1 diminue la signalisation de la voie du Fc γ R des macrophages. Ils ont observé un niveau de phosphorylation des résidus de tyrosine inférieur chez les cellules infectées que chez les cellules non-infectées. De plus, ce même groupe observe une diminution du niveau de phosphorylation des protéines Syk, Hck et paxillin. Nos résultats sont à l'opposé de ceux obtenus par ce groupe. Nous observons une augmentation du niveau de phosphorylation des résidus de tyrosine et une augmentation de la phosphorylation de la protéine d'environ 72kDa qui est probablement Syk. La divergence pourrait être expliquée par l'infection des macrophages par le VIH-1 où tous les gènes sont exprimés contrairement aux souris Tg CD4C/HIV-Nef qui expriment seulement la protéine Nef. L'effet des autres gènes du VIH-1 lors de l'infection pourrait jouer un rôle dans la diminution du niveau de phosphorylation des protéines. En effet, les protéines gp120 et Vpr du VIH-1 sont reconnues pour altérer les fonctions immunologiques des cellules de lignées monocytiques (Muthuman *et al*, 2005; Williams *et al*, 2002). À l'opposé, Suzu *et al* ont montré dans une lignée de cellule myéloïde humaine que seule la présence de Nef sans autre stimulus procure une augmentation du niveau phosphorylation de la protéine Hck (Suzu *et al*, 2005). Cette observation vient

appuyer nos résultats qui démontrent également que seule la présence de Nef dans les macrophages des souris Tg, sans autre stimulus, induit une augmentation du niveau de phosphorylation de la protéine p72.

4.3 Nef provoque une diminution de l'activité de Rac

Dans le chapitre II, nous avons démontré que Nef interagit et active PAK2. Les GTPases de la famille Rho dont Cdc42 et Rac sont deux effecteurs directs des membres de la famille PAK. L'activation de ces protéines entraîne une augmentation de l'activité des divers PAK (Knaus *et al*, 1998; Mira *et al*, 2000; Jakobi *et al*, 1996). Afin de déterminer si l'augmentation de l'activité enzymatique de PAK2 par Nef est reliée à une hausse de l'activité de son effecteur situé en amont, les GTPases de la famille Rho, nous avons vérifié la quantité de Rac activé lié au GTP dans les cellules exprimant le transgène. Les résultats démontrent clairement, et de façon statistiquement significative pour les thymocytes, que les cellules transgéniques possèdent une plus faible quantité de Rac activé lié au GTP. Nous démontrons ainsi que PAK2 n'est pas activé via la GTPase Rac dans les cellules Tg. En fait, nous montrons que Nef favorise la désactivation de cette protéine ce qui est un phénomène inverse à celui décrit dans la littérature (Manser *et al*, 1994; Bagrodia *et al*, 1995b; Martin *et al*, 1995). Suite à l'observation que PAK2 possède une plus grande activité enzymatique dans les cellules Tg, nous envisageons plutôt une augmentation de la quantité de Rac activé. Cette différence entre nos résultats et ceux retrouvés dans la littérature est surprenante. Selon nos connaissances, il n'existe aucune publication démontrant une corrélation directe entre la désactivation de Rac et l'activation de l'un des membres de la famille PAK. De plus, l'observation que Nef influence négativement l'activation de Rac va à l'encontre de ce qui est retrouvé dans la littérature. En effet, il a été démontré que la présence de Nef augmente la quantité de Rac activé lié au GTP dans une lignée cellulaire microgliale (Vilhardt *et al* (2002)), dans les cellules dendritiques dérivées de PBMC (Quaranta *et al*, (2003)) et dans les lymphocytes primaires (Janardhan *et al* (2004)). La différence observée entre ces résultats et les nôtres pourrait être expliquée par les différents systèmes expérimentaux utilisés. Nous utilisons des cellules primaires récoltées chez les souris comparativement à l'utilisation de lignées cellulaires ou la dérivation de cellules à partir de PBMC. Également, selon le type

cellulaire, les niveaux de Rac endogène peuvent varier énormément et ainsi expliquer les différences de résultats obtenus.

Bien que cette observation soit contraire à ce qui est démontré dans la littérature, elle pourrait expliquer plusieurs phénotypes observés chez nos souris Tg CD4C/HIV-Nef. Premièrement, dans le chapitre III, nous avons démontré que les macrophages Tg ont une morphologie différente des cellules non-Tg. Chez ces macrophages Tg le processus d'adhésion cellulaire est retardé. Il est clairement démontré que les GTPases Rac jouent un rôle important dans la réorganisation du cytosquelette et de l'actine (Ridley *et al*, 1992; Nobes et Hall, 1995; Allen *et al*, 1997). Allen *et al* (1997) ont démontré en microinjectant une forme dominant négatif de Rac1 (N17Rac1) dans une lignée cellulaire de macrophage l'implication de Rac1 dans la formation de lamellipode et de filipode. Ils ont observé que les cellules exprimant N17Rac1 possèdent une forme arrondie et qu'un délai était observé avant l'apparition de filipodes. Ces deux derniers phénotypes sont similaires à ceux retrouvés chez les macrophages péritonéaux exprimant Nef^{WT}. On retrouve également chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef une déficience au niveau de la maturité des cellules dendritiques ainsi qu'une diminution de leur capacité à présenter des antigènes (Poudrier *et al*, 2003). La désactivation de Rac chez les souris Tg pourrait expliquer ces phénotypes. Benvenuti *et al* (2004) ont démontré que les cellules dendritiques provenant de souris déficiente en Rac1/2 possédaient un phénotype immature et une incapacité à activer une cellule T naïve. Ces phénotypes, provoqués par l'absence de Rac1 et/ou Rac2, sont très similaires à ceux retrouvés chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef. Les résultats préliminaires obtenus lors de la quantification du niveau de Rac lié au GTP suggèrent que ces phénotypes observés chez les cellules dendritiques exprimant Nef puissent être causés par la désactivation des molécules Rac1 et/ou Rac2 induite par Nef. Il serait intéressant de vérifier le niveau de Rac activé lié au GTP chez les souris Tg exprimant Nef sous le contrôle de promoteurs spécifique à certaines populations cellulaires ciblées (macrophages; hCD4/HIV, cellules dendritique; CD11c/HIV, cellules T; mCD4/HIV). Avec cette information, nous pourrions déterminer si Nef joue un rôle direct dans la désactivation de Rac. Dans le cas contraire, aucune différence de Rac lié au GTP entre les souris Tg et témoin ne serait observée.

Afin d'approfondir les mécanismes de la désactivation de Rac et plus particulièrement l'implication de PAK2 chez les macrophages péritonéaux, nous avons déterminé le niveau de Rac activé lié au GTP chez les souris Tg ne possédant plus la capacité de se lier à PAK2. Les souris Tg utilisées, décrites dans le chapitre II, expriment les mutants Nef^{RR105/106AA} et Nef^{P72AxxP75A}. Chez ces deux lignées Tg, le niveau de Rac activé lié au GTP est similaire à celui retrouvé chez les souris non-Tg de la même portée (n=3 pour chaque lignée). Cette observation suggère que l'interaction et l'activation de PAK2 par Nef soit importante dans le processus de la désactivation de Rac. De quelle façon PAK2 joue-t-il un rôle sur la désactivation de Rac? Tous les groupes de recherche montrent que l'activation de Rac situé en amont de PAK mène à l'activation de PAK. Cependant, une exception existe. Elle provient d'Obermeier *et al* (1998) qui ont démontré que PAK agit en amont de la GTPase Rac et non en aval comme l'indiquent les autres groupes. La possibilité que PAK puisse agir en amont de Rac permet de croire que l'activation de PAK2 par Nef pourrait inhiber la fonction de Rac en le désactivant. Cependant, cette hypothèse ne peut s'appuyer sur aucune preuve littéraire. Comme mentionné précédemment, selon nos connaissances, il n'existe aucune publication démontrant que l'activation de PAK mène à l'inactivation de Rac.

Un autre mécanisme pouvant expliquer la désactivation de Rac chez les souris Tg serait l'interaction entre Nef et β -PIX. Les GTPases sont régulées positivement par les protéines de la famille GEF dont β -PIX est membre (Takai *et al*, 2001). Nous avons démontré que β -PIX, en plus de faire parti du complexe incluant Nef/PAK2/p95PKL possède un niveau de phosphorylation supérieur chez les cellules exprimant le Tg. L'activation de PAK2 par Nef pourrait alors provoquer une inhibition de la fonction de β -PIX ce qui provoquerait une augmentation de Rac inactivé. Cependant, le niveau de phosphorylation de PIX ne possède aucun effet sur son activité GEF (Koh *et al*, 2001). Les protéines GAP et GDI peuvent quant à elles réguler négativement les GTPases (Takai *et al*, 2001). Une autre hypothèse serait que Nef, par une façon encore indéterminée, activerait ces deux familles de protéines ce qui provoquerait la désactivation de Rac. Cependant, l'hypothèse la plus plausible, celle qui est soutenu par

tous nos résultats, serait la suivante. Nef via sa liaison avec PAK2 et son partenaire β -PIX qui lui-même interagit avec p95PKL amène le complexe protéique à la membrane plasmique via son domaine myristyl. Les molécules Rac inactivées liées au GDP ne peuvent alors interagir avec leurs effecteurs β -PIX car ces derniers sont séquestrés par Nef à la membrane plasmique. Lorsque la cellule reçoit un stimulus, elle ne peut alors plus répondre efficacement.

4.4 L'interaction entre Nef et PAK2 joue-t-elle un rôle dans l'activation des cellules Tg ?

Jusqu'à maintenant, il n'existe aucune étude chez les macrophages péritonéaux ou chez les macrophages dérivés de la moelle osseuse pour répondre aux questions concernant le rôle de l'interaction entre Nef et PAK2 dans l'altération de la morphologie des cellules Tg. Les seuls résultats préliminaires obtenus proviennent des macrophages péritonéaux des souris Tg exprimant Nef^{G2A}, Nef^{P69A} et Nef^{RR105/106AA}. Les résultats montrent que les cellules provenant de ces souris Tg possèdent une morphologie plus allongée que celle retrouvée chez les souris exprimant Nef^{WT} mais pas parfaitement identique aux cellules non-Tg témoins. Le phénotype observé se situerait entre les cellules non-Tg et Tg provenant des souris Nef^{WT} ce qui suggère un rôle de PAK2 dans l'altération de la morphologie. Il est connu que les membres de la famille PAK sont impliqués dans la restructuration du cytosquelette (Manser *et al*, 1997, Frost *et al*, 1998, Sells *et al*, 2000). L'implication de PAK2 ainsi que le plus grand niveau de Rac désactivé sont deux mécanismes probablement impliqués dans le changement de morphologie des macrophages péritonéaux. Nous avons également démontré que les macrophages péritonéaux provenant des souris Tg CD4C/HIV-Nef possèdent un phénotype activé. Les cellules possèdent un niveau d'endocytose et de phagocytose plus élevé que leur témoin lorsqu'elles ne sont pas stimulées. L'augmentation de l'activité de PAK2 induite par Nef pourrait également être impliquée dans cet état d'activation des macrophages.

Concernant le rôle de l'interaction Nef/PAK2 dans l'altération des signaux de transduction dans les cellules Tg, Hanna *et al* (1998) ont démontré que les thymocytes provenant de souris Tg CD4C/HIV possédaient une hyperphosphorylation des résidus de

tyrosine et en particulier pour les protéines LAT et ERK1/2. Nous avons également démontré que le niveau de phosphorylation des résidus de tyrosine des macrophages péritonéaux des souris CD4C/HIV-Nef^{WT} est plus élevé que leurs témoins négatifs et en particulier pour une protéine d'environ 72 kDa. La protéine PAK2, activée par Nef, pourrait jouer un rôle dans cet augmentation de phosphorylation en interagissant avec différents partenaires cellulaires. Comme mentionné précédemment, Chu *et al* (2004) ont démontré un nouveau rôle pour PAK2 dans l'activation des cellules T. Ils ont observé, suite à l'engagement du TcR, une augmentation de l'activité de PAK2 qui corrèle parfaitement avec l'augmentation du niveau de phosphorylation des protéines LAT et ERK1/2. Suite à ces observations, on pourrait établir une relation entre l'augmentation du niveau de phosphorylation et l'activation de PAK2 par Nef. Il serait maintenant intéressant d'étudier le niveau de phosphorylation chez les lignées Tg où Nef n'interagit pas avec PAK2.

Différentes approches pourraient également être utilisées afin de déterminer le rôle de Nef et PAK2 dans l'induction des différents phénotypes observés chez les cellules exprimant le transgène. La première approche serait de croiser des souris CD4C/HIV avec des souris PAK2 knock-out. Cependant, Le groupe de Manser a éprouvé de la difficulté à produire les souris PAK2 knock-out. Hoffman *et al* (2004) ont mentionné que les souris PAK2 knock-out décèdent au niveau embryonnaire. Cette approche génétique demeure donc une alternative. Par la technique d'ARN d'interférence (RNAi), nous avons également tenté avec un autre type d'approche génétique d'inhiber la production de PAK2. Cependant, nous n'avons observé aucune inhibition de la protéine PAK2 par Western Blot (non illustré). Les amorces choisies pour interférer avec le transcrit n'était peut-être pas les plus performantes. Un essai à grande échelle avec différentes amorces pourrait être préconisé afin de mettre au point un système où PAK2 serait inhibé.

4.5 Quel est le rôle de Rac dans les phénotypes observés chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef ?

Comme mentionné précédemment, plusieurs phénotypes retrouvés chez les souris Rac KO sont similaires chez souris Tg CD4C/HIV-Nef. Selon nos résultats préliminaires, nous ne pouvons déterminer quel membre de la famille Rac est désactivé par Nef. L'anticorps utilisé lors de la détection par Western Blot réagit contre Rac1 et Rac2. Nous avons également utilisé un anticorps spécifique à Rac2 mais aucun signal n'a pu être détecté par Western blot. Afin de contourner ce problème, une approche génétique pourrait être envisagée et serait un croisement entre les souris Tg CD4C/HIV-Nef et une souris Tg exprimant une forme constitutivement activée de Rac1 (Gomez *et al*, 2000) ou Rac2. Ce croisement permettrait de rétablir le niveau de Rac lié au GTP comparable à celui des souris non-Tg. Également, ce nouveau modèle d'étude permettrait de vérifier si Rac est impliqué dans certains phénotypes observés chez les souris Tg comme le changement de morphologie des macrophages ou l'immaturité des cellules dendritiques. À l'opposé, le croisement entre nos souris Tg CD4C/HIV-Nef et les souris Rac knock-out ne permettrait de vérifier qu'en partie si Rac est impliqué dans les phénotypes retrouvés chez les souris Tg. Nous observons déjà une diminution de l'activité de Rac chez les souris Tg, ce croisement permettrait tout au plus d'accentuer le phénotype observé, c'est-à-dire une abolition totale de l'activité de l'un des membres de la famille Rac. Cependant, si l'effet de Nef sur Rac est à un niveau plateau, nous ne pourrions observer une accentuation des phénotypes mentionnés plus haut. Également, un effet de redondance pourrait se produire parmi les différents membres de la famille Rac et les phénotypes attendus ne seraient pas observés.

En conclusion, nous avons démontré dans le deuxième chapitre que Nef est capable d'interagir avec PAK2 chez trois sous-populations distinctes présentes chez les souris Tg CD4C/HIV-Nef^{WT}. De plus, cette interaction mène à l'activation de PAK2 et à la formation d'un complexe protéique incluant β -PIX et p95PKL. Les motifs de polyprolines proximaux, le motif di-arginine ainsi que le motif de ciblage membranaire de Nef sont indispensables pour permettre l'interaction Nef/PAK2. Cependant, cette interaction n'est pas suffisante pour induire une maladie chez les souris Tg CD4C/HIV-

Nef^{WT}. Nous avons également démontré dans l'appendice I que la protéine VAV ne semble pas impliquée dans la formation du complexe et que l'expression de Nef dans une seule sous-population cellulaire est suffisante pour favoriser cette formation du complexe. Dans le troisième chapitre, nous avons démontré que les macrophages péritonéaux provenant des souris Tg CD4C/HIV-Nef^{WT} sont activés. Plus précisément, ils possèdent une morphologie différente ainsi qu'un niveau d'endocytose et de phagocytose plus élevée que leur témoin. Cependant, lorsqu'elles sont stimulées, les différents phénotypes observés entre les cellules Tg et non-Tg ne sont plus visibles. Également, le niveau de phosphorylation des résidus de tyrosines des protéines provenant des macrophages Tg est plus élevé que leur témoin. Nous avons également démontré dans l'appendice II que PAK2 semble impliqué dans l'altération de la morphologie des macrophages Tg. De plus, Nef provoque la désactivation de Rac chez les thymocytes, macrophages et cellules dendritiques. Cette désactivation de Rac semble également être relié à PAK2 chez les cellules Tg

BIBLIOGRAPHIE

- Adam, L., Vadlamudi, R., Kondapaka, S.B., Chernoff, J., Mendelsohn, J. et Kumar, R. 1998. Heregulin regulates cytoskeletal reorganization and cell migration through the p21-activated kinase-1 via phosphatidylinositol-3 kinase. *J. Biol. Chem.* **273**(43):28238-46
- Aderem, A. et Underhill, D.M. 1999 Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.*; **17**:593-23.
- Aldrovandi, G.M., Gao, L., Bristol, G. et Zack, J.A. 1998. Regions of human immunodeficiency virus type 1 nef required for function in vivo. *J. Virol.* **72**(9):7032-39.
- Aldrovandi, G.M. et Zack, J.A. 1996. Replication and pathogenicity of human immunodeficiency virus type 1 accessory gene mutants in SCID-hu mice. *J. Virol.* **70**(3):1505-11.
- Alexander, L., Du, Z., Howe, A.Y., Czajak, S. et Desrosiers, R.C. 1999. Induction of AIDS in rhesus monkeys by a recombinant simian immunodeficiency virus expressing nef of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* **73**(7):5814-25.
- Allen, K.M., Gleeson, J.G., Bagrodia, S., Partington, M.W., MacMillan, J.C., Cerione, R.A., Mulley, J.C. et Walsh, C.A. 1998. PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. *Nat. Genet.* **20**(1):25-30
- An, S.F., Groves, M., Giometto, B., Beckett, A.A. et Scaravilli, F. 1999. Detection and localisation of HIV-1 DNA and RNA in fixed adult AIDS brain by polymerase chain reaction/in situ hybridisation technique. *Acta Neuropathol (Berl).* **98**(5):481-87.
- Anderson, S., Shugars, D.C., Swanstrom, R. et Garcia, J.V. 1993, Nef from primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 suppresses surface CD4 expression in human and mouse T cells. *J. Virol.* **67**(8):4923-31.
- Arold, S.T. et Baur, A.S. 2001. Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein. *Trends Biochem. Sci.* **26**(6):356-63.
- Arora, V.K., Molina, R.P., Foster, J.L., Blakemore, J.L., Chernoff, J., Fredericksen, B.L. et Garcia, J.V. 2000. Lentivirus Nef specifically activates Pak2. *J Virol.* **74**(23):11081-87.
- Bagheri-Yarmand, R., Mandal, M., Taludker, A.H., Wang, R.A., Vadlamudi, R.K., Kung, H.J. et Kumar, R. 2001. Etk/Bmx tyrosine kinase activates Pak1 and regulates tumorigenicity of breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **276**(31):29403-09

- Bagrodia, S., Bailey, D., Lenard, Z., Hart, M., Guan, J.L., Premont, R.T., Taylor, S.J., et Cerione, R.A. 1999. A tyrosine-phosphorylated protein that binds to an important regulatory region on the cool family of p21-activated kinase-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **274**(32):22393-400
- Bagrodia, S., Taylor, S.J., Jordon, K.A., Van Aelst, L. et Cerione, R.A. 1998. A novel regulator of p21-activated kinases. *J. Biol. Chem.* **273**(37):23633-36.
- Bagrodia, S., Derijard, B., Davis, R.J. et Cerione, R.A. 1995a. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation *J. Biol. Chem.* **270**(47):27995-98
- Bagrodia, S., Taylor, S.J., Creasy, C.L., Chernoff, J., and Cerione, R.A. 1995b. Identification of a mouse p21Cdc42/Rac activated kinase. *J. Biol. Chem.* **270**(47) : 22731-37
- Bamburg, J.R. 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **15**:185-230.
- Baur, A.S., Sass, G., Laffert, B., Willbold, D., Cheng-Mayer, C. et Peterlin, B.M. 1997. The N-terminus of Nef from HIV-1/SIV associates with a protein complex containing Lck and a serine kinase. *Immunity.* **6**(3):283-91.
- Baur, A.S., Sawai, E.T., Dazin, P., Fantl, W.J., Cheng-Mayer, C. et Peterlin, B.M. 1994. HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization *Immunity.* **1**(5):373-84.
- Bandres, J.C. et Ratner, L. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein down-regulates transcription factors NF-kappa B and AP-1 in human T cells in vitro after T-cell receptor stimulation. *J. Virol.* **68**(5):3243-49.
- Bell, I., Schaefer, T.M., Tribble, R.P., Amedee, A. et Reinhart, T.A. 2001. Down-modulation of the costimulatory molecule, CD28, is a conserved activity of multiple SIV Nefs and is dependent on histidine 196 of Nef. *Virology.* **283**(1):148-58.
- Bell, I., Ashman, C., Maughan, J., Hooker, E., Cook, F. et Reinhart, T.A. 1998. Association of simian immunodeficiency virus Nef with the T-cell receptor (TCR) zeta chain leads to TCR down-modulation. *J Gen. Virol.* **79** (11):2717-27.
- Benichou, S., Bomsel, M., Bodeus, M., Durand, H., Doute, M., Letourneur, F., Camonis, J. et Benarous, R. 1994. Physical interaction of the HIV-1 Nef protein with beta-COP, a component of non-clathrin-coated vesicles essential for membrane traffic. *J Biol. Chem.* **269**(48):30073-86.
- Benson, R.E., Sanfridson, A., Ottinger, J.S., Doyle, C. et Cullen, B.R. 1993 Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J Exp. Med.* **177**(6):1561-66.

- Benvenuti, F., Hugues, S., Walmsley, M., Ruf, S., Fetler, L., Popoff, M., Tybulewicz, V.L. et Amigorena, S. 2004. Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic cells for T cell priming. *Science*. **305**(5687):1150-53.
- Berdeaux, R.L, Diaz, B., Kim, L. et Martin, G.S. 2004 Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. *J. Cell. Biol.* **166**(3):317-23.
- Berkhout, B., Silverman, R.H. et Jeang, K.T. 1989. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell*. **59**(2):273-82.
- Bienvenu, T., des Portes, V., McDonnell, N., Carrie, A., Zemni, R., Couvert, P., Ropers, H.H., Moraine, C., van Bokhoven, H., Fryns, J.P., Allen, K., Walsh, C.A., Boue, J., Kahn, A., Chelly, J. et Beldjord, C. 2000. Missense mutation in PAK3, R67C, causes X-linked nonspecific mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* **93**(4):294-98.
- Biggs, T.E., Cooke, S.J., Barton, C.H., Harris, M.P., Saksela, K. et Mann, D.A. 1999. Induction of activator protein 1 (AP-1) in macrophages by human immunodeficiency virus type-1 NEF is a cell-type-specific response that requires both hck and MAPK signaling events. *J. Mol. Biol.* **290**(1):21-35.
- Birch, M.R., Learmont, J.C., Dyer, W.B., Deacon, N.J., Zaunders, J.J., Saksena, N., Cunningham, A.L., Mills, J. et Sullivan, J.S. 2001. An examination of signs of disease progression in survivors of the Sydney Blood Bank Cohort (SBBC). *J. Clin. Virol.* **22**(3):263-70.
- Bishop, A.L. et Hall, A. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* **348**(2):241-55.
- Blagoveshchenskaya, A.D., Thomas, L., Feliciangeli, S.F., Hung, C.H. et Thomas, G. 2002. HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. *Cell*. **111**(6):853-66
- Bokoch, G.M. 2003. Biology of the p21-activated kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **72**:743-81
- Bokoch, G.M., Reilly, A.M., Daniels, R.H., King, C.C., Olivera, A., Spiegel, S. et Knaus, U.G. 1998. A GTPase-independent mechanism of p21-activated kinase activation. Regulation by sphingosine and other biologically active lipids. *J. Biol. Chem.* **273**(14):8137-44.
- Bokoch, G.M., Wang, Y., Bohl, B.P, Sells, M.A., Quilliam, L.A. et Knaus, U.G. 1996. Interaction of the Nck adapter protein with p21-activated kinase (PAK1). *J. Biol. Chem.* **271**(42):25746-59.
- Brady, H.J., Pennington, D.J., Miles, C.G. et Dzierzak, E.A. 1993. CD4 cell surface downregulation in HIV-1 Nef transgenic mice is a consequence of intracellular sequestration. *EMBO J.* **12**(13):4923-32.

- Braga, V.M., Betson, M., Li, X. et Lamarche-Vane, N. 2000. Activation of the small GTPase Rac is sufficient to disrupt cadherin-dependent cell-cell adhesion in normal human keratinocytes. *Mol. Biol. Cell.* **11**(11):3703-21.
- Brenchley, J.M., T.W. Schacker, L.E. Ruff, D.A. Price, J.H. Taylor, G.J. Beilman, P.L. Nguyen, A. Khoruts, M. Larson, A.T. Haase, and D.C. Douek. 2004a. CD4⁺ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* **200**(6):749–59
- Brenchley, J.M., Hill, B.J., Ambrozak, D.R., Price, D.A., Guenaga, F.J., Casazza, J.P., Kuruppu, J., Yazdani, J., Migueles, S.A., Connors, M., Roederer, M., Douek, D.C. et Koup, R.A. 2004b. T-cell subsets that harbor human immunodeficiency virus (HIV) in vivo: implications for HIV pathogenesis. *J. Virol.* **78**(3):1160-8
- Bresnahan, P.A., Yonemoto, W. et Greene, W.C. 1999. Cutting edge: SIV Nef protein utilizes both leucine- and tyrosine-based protein sorting pathways for down-regulation of CD4. *J. Immunol.* **163**(6):2977-81.
- Briggs, S.D., Scholtz, B., Jacque, J.M., Swingler, S., Stevenson, M. et Smithgall, T.E. 2001. HIV-1 Nef promotes survival of myeloid cells by a Stat3-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **276**(27):25605-11.
- Briggs, S.D. et Smithgall, T.E. 1999. SH2-kinase linker mutations release Hck tyrosine kinase and transforming activities in Rat-2 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **274**(37):26579-83.
- Briggs, S.D., Sharkey, M., Stevenson, M. et Smithgall, T.E. 1997. SH3-mediated Hck tyrosine kinase activation and fibroblast transformation by the Nef protein of HIV-1. *J. Biol. Chem.* **272**(29):17899-902.
- Brown, A., Wang, X., Sawai, E. et Cheng-Mayer, C. 1999. Activation of the PAK-related kinase by human immunodeficiency virus type 1 Nef in primary human peripheral blood lymphocytes and macrophages leads to phosphorylation of a PIX-p95 complex. *J. Virol.* **73**(12):9899-907.
- Brown, M.C., West, K.A. et Turner, C.E. 2002. Paxillin-dependent paxillin kinase linker and p21-activated kinase localization to focal adhesions involves a multistep activation pathway. *Mol. Biol. Cell.* **13**(5):1550-65.
- Bruzzaniti, A., Neff, L., Sanjay, A., Horne, W.C., De Camilli, P. et Baron, R. 2005, Dynamin Forms a Src-Kinase-sensitive Complex with Cbl and Regulates Podosomes and Osteoclast Activity. *Mol. Biol. Cell.* **16**(7):3301-13.
- Buchbinder, S.P., Katz, M.H., Hessel, N.A., O'Malley, P.M. et Holmberg, S.D. 1994. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS.* **8**(8):1123-28.

- Buchwald, G., Hostinova, E., Rudolph, M.G., Kraemer, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., Scheffzek, K. et Wittinghofer, A. 2001. Conformational switch and role of phosphorylation in PAK activation. *Mol. Cell. Biol.* **21**(15):5179-89
- Bukrinskaya, A.G., Ghorpade, A., Heinzinger, N.K., Smithgall, T.E., Lewis, R.E. et Stevenson, M. 1996. Phosphorylation-dependent human immunodeficiency virus type 1 infection and nuclear targeting of viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **93**(1):367-71.
- Bukrinsky, M.I., Sharova, N., McDonald, T.L., Pushkarskaya, T. Tarpley, W.G. et Stevenson, M. 1993a. Association of integrase, matrix and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**(13):625-29
- Bukrinsky, M.I., Haggerty, S., Dempsey, M.P., Sharova, N. Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. et Stevenson, M. 1993b. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**(6447): 666-70
- Cameron, C.E., Ghosh, M., Le Grice, S.F. et Benkovic, S.J. 1997. Mutations in HIV reverse transcriptase which alter RNase H activity and decrease strand transfer efficiency are suppressed by HIV nucleocapsid protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(13):6700-05
- Campbell, E.M., Nunez, R. et Hope, T.J. 2004. Disruption of the actin cytoskeleton can complement the ability of Nef to enhance human immunodeficiency virus type 1 infectivity *J. Virol.* **78**(11):5745-55.
- Carl, S., Iafrate, A.J., Lang, S.M., Stolte, N., Stahl-Hennig, C., Matz-Rensing, K., Fuchs, D., Skowronski, J. et Kirchhoff, F. 2000. Simian immunodeficiency virus containing mutations in N-terminal tyrosine residues and in the PxxP motif in Nef replicates efficiently in rhesus macaques. *J. Virol.* **74**(9):4155-64.
- Carteau, S., Batson, S.C., Poljak, L., Mouscadet, J.-F., DeRockquigny, H. Darlix J.L., Roques B.P., Kas E. et Auclair, C. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein specifically stimulates Mg²⁺-dependent DNA integration *in vitro* *J. Virol.* **71**(8):771-77
- Chan, W.H., Yu, J.S. et Yang, S.D. 2000. Apoptotic signalling cascade in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3 and p21-activated kinase 2. *Biochem. J.* **351**(1):221-32.
- Chan, W.H., Yu, J.S. et Yang, S.D. 1998. Heat shock stress induces cleavage and activation of PAK2 in apoptotic cells. *J. protein. Chem.* **17**(5):485-93
- Cheingsong-Popov, R., Panagiotidi, C., Bowcock, S., Aronstam, A., Wadsworth, J. et Weber, J. 1991. Relation between humoral responses to HIV gag and env proteins at seroconversion and clinical outcome of HIV infection. *B.M.J.* **302**(6767):23-26.

- Chen, F., Ma, L., Parrini, M.C., Mao, X., Lopez, M., Wu, C., Marks, P.W., Davidson, L., Kwiatkowski, D.J., Kirchhausen, T., Orkin, S.H., Rosen, F.S., Mayer, B.J., Kirschner, M.W. et Alt, F.W. 2000. Cdc42 is required for PIP(2)-induced actin polymerization and early development but not for cell viability. *Curr. Biol.* **10**(13):758-65.
- Chen, Y.L., Trono, D. et Camaur, D. 1998. The proteolytic cleavage of human immunodeficiency virus type 1 Nef does not correlate with its ability to stimulate virion infectivity. *J. Virol.* **72**(4):3178-84.
- Chen, W., Chen, S., Yap, S.F. et Lim, L. 1996. The *Caenorhabditis elegans* p21-activated kinase (CePAK) colocalizes with CeRac1 and CDC42Ce at hypodermal cell boundaries during embryo elongation. *J. Biol. Chem.* **271**(42):26362-68.
- Cheng, H., Hoxie, J.P. et Parks, W.P. 1999. The conserved core of human immunodeficiency virus type 1 Nef is essential for association with Lck and for enhanced viral replication in T-lymphocytes. *Virology.* **264**(1):5-15.
- Chew, T.L., Masaracchia, R.A., Goekeler, Z.M. et Wysolmerski, R.B. 1998. Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK). *J Muscle Res Cell Motil.* **19**(8):839-54.
- Choe, E.Y., Schoenberger, E.S., Gropman, J.E. et Park, I.W. 2002. HIV Nef inhibits T cell migration. *J. Biol. Chem.* **277**(48):46079-84
- Choi, H.J. et Smithgall, T.E. 2004. HIV-1 Nef promotes survival of TF-1 macrophages by inducing Bcl-XL expression in an extracellular signal-regulated kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **279**(49):51688-96
- Chong, C., Tan, L., Lim, L. et Manser, E. 2001. The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J. Biol. Chem.* **276**(20):17347-53.
- Chowers, M.Y., Spina, C.A., Kwoh, T.J., Fitch, N.J., Richman, D.D. et Guatelli, J.C. 1994. Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *J. Virol.* **68**(5):2906-14.
- Chu, P.C., Wu, J., Liao, X.C., Pardo, J., Zhao, H., Li, C., Mendenhall, M.K., Pali, E., Shen, M., Yu, S., Taylor, V.C., Aversa, G., Molineaux, S., Payan, D.G. et Masuda, E.S. 2004. A novel role for p21-activated protein kinase 2 in T cell activation. *J Immunol.* **172**(12):7324-34.
- Chung, C.Y. et Firtel, R.A. 1999. PAKa, a putative PAK family member, is required for cytokinesis and the regulation of the cytoskeleton in *Dictyostelium discoideum* cells during chemotaxis. *J. Cell. Biol.* **147**(3):559-76.
- Cleverley, S.C., Costello, P.S., Henning, S.W. et Cantrell, D.A. 2000. Loss of Rho function in the thymus is accompanied by the development of thymic lymphoma. *Oncogene.* **19**(1):13-20.

- Coates, K., Cooke, S.J., Mann, D.A. et Harris, M.P. 1997. Protein kinase C-mediated phosphorylation of HIV-1 nef in human cell lines. *J. Biol. Chem.* **272**(19):12289-94.
- Coffin, J.M., Hughes, S.H et Varmus, H.E eds. 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor Laboratory Press publications. New-York.
- Collins, K.L., Chen, B.K., Kalams, S.A., Walker, B.D. et Baltimore, D. 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes *Nature*.**391**(6665):397-401
- Cohen, G.B., Gandhi, R.T., Davis, D.M., Mandelboim, O., Chen, B.K., Strominger, J.L. et Baltimore, D. 1999. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity*. **10**(6):661-71.
- Collette, Y., Dutartre, H., Benziene, A., Ramos-Morales, Benarous. R., Harris, M., Olive D. Physical and functional interaction of Nef with Lck. 1996. HIV-1 Nef-induced T-cell signaling defects. *J. Biol. Chem.* **271**(11):6333-41.
- Collins, K.L., Chen, B.K., Kalams, S.A., Walker, B.D. et Baltimore, D. 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. **391**(6665):397-401.
- Connolly, J.O., Simpson, N., Hewlett, L. et Hall, A. 2002. Rac regulates endothelial morphogenesis and capillary assembly. *Mol. Biol. Cell.* **13**(7):2474-85.
- Cullen, B.R. 1998, HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell*. **93**(5):685-92.
- Craig, H.M., Pandori, M.W. et Guatelli, J.C. 1998. Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**(19):11229-34.
- Cox, D., Chang, P., Zhang, Q., Reddy, P.G., Bokoch, G.M. et Greenberg, S. 1997. Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J. Exp. Med.* **186**(9):1487-94.
- Crowley, M.T., Costello, P.S., Fitzer-Attas, C.J., Turner, M., Meng, F., Lowell, C., Tybulewicz, V.L. et DeFranco, A.L. 1997. A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fc γ receptors on macrophages. *J. Exp. Med.* **186**(7):1027-39.
- Dalgleish, A.G., Beverley, P.C. Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F. et Weiss, R.A. 1985. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. **312**(5996):763-67.
- Dan, I., Watanabe, N.M. et Kusumi, A. 2001. The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends. Cell. Biol.* **11**(5):220-30

- Daniel, M.D., Kirchhoff, F., Czajak, S.C., Sehgal, P.K. et Desrosiers, R.C. 1992. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science*. **258**(5090):1938-41.
- Daniels, R.H., Zenke, F.T. et Bokoch, G.M. 1999. alphaPix stimulates p21-activated kinase activity through exchange factor-dependent and -independent mechanisms. *J. Biol. Chem.* **274**(10):6047-50.
- Deacon, N.J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D.J., McPhee, D.A., Greenway, A.L., Ellett, A., Chatfield, C., et al. 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science*. **270**(5238):988-91.
- Ding, J., Knaus, U.G., Lian, J.P., Bokoch, G.M. et Badwey, J.A. 1996. The renaturable 69- and 63-kDa protein kinases that undergo rapid activation in chemoattractant-stimulated guinea pig neutrophils are p21-activated kinases. *J. Biol. Chem.* **271**(40):24869-73.
- Dharmawardhane, S., Schurmann, A., Sells, M.A., Chernoff, J., Schmid, S.L. et Bokoch, G.M. 2000. Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Mol. Biol. Cell.* **11**(10):3341-52.
- Dharmawardhane, S., Sanders, L.C., Martin, S.S., Daniels, R.H. et Bokoch, G.M. 1997. Localization of p21-activated kinase 1 (PAK1) to pinocytic vesicles and cortical actin structures in stimulated cells. *J. Cell. Biol.* **138**(6):1265-78.
- Didsbury, J., Weber, R.F., Bokoch, G.M., Evans, T. et Snyderman, R. 1989. Rac, a novel ras-related family of proteins that are botulinum toxin substrates *J. Biol. Chem.* **264**(28):16378-82.
- Du, Z., Lang, S.M., Sasseville, V.G., Lackner, A.A., Ilyinskii, P.O., Daniel, M.D., Jung, J.U. et Desrosiers, R.C. 1995. Identification of a nef allele that causes lymphocyte activation and acute disease in macaque monkeys. *Cell*. **82**(4):665-74
- Duus, K.M., Miller, E.D., Smith, J.A., Kovalev, G.I. et Su, L. 2001. Separation of human immunodeficiency virus type 1 replication from nef-mediated pathogenesis in the human thymus. *J. Virol.* **75**(8):3916-24.
- Fackler, O.T et Baur, A.S. 2002. Live and let die : Nef functions beyond HIV replication *Immunity*. **16**(4):493-97
- Fackler, O.T., Wolf, D., Weber, H.O., Laffert, B., D'Aloja, P., Schuler-Thurner, B., Geffin, R., Saksela, K., Geyer, M., Peterlin, B.M., Schuler, G. et Baur, A.S. 2001. A natural variability in the proline-rich motif of Nef modulates HIV-1 replication in primary T cells. *Curr. Biol.* **11**(16):1294-99.

- Fackler, O.T., Lu, X., Frost, J.A., Geyer, M., Jiang, B., Luo, W., Abo, A., Alberts, A.S. et Peterlin, B.M. 2000. p21-activated kinase 1 plays a critical role in cellular activation by Nef. *Mol. Cell. Biol.* **20**(7):2619-27.
- Fackler, O.T., Luo, W., Geyer, M., Alberts, A.S. et Peterlin, B.M. 1999. Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions. *Mol. Cell.* **3**(6):729-39.
- Fackler, O.T., Kienzle, N., Kremmer, E., Boese, A., Schramm, B., Klimkait, T., Kucherer, C. et Mueller-Lantzsch, N. 1997. Association of human immunodeficiency virus Nef protein with actin is myristoylation dependent and influences its subcellular localization. *Eur. J. Biochem.* **247**(3):843-51.
- Feng, Q., Albeck, J.G., Cerione, R.A. et Yang, W. 2002. Regulation of the Cool/Pix proteins: key binding partners of the Cdc42/Rac targets, the p21-activated kinases. *J. Biol. Chem.* **277**(7):5644-50
- Fisher, A.G., Feinberg, M.B., Josephs, S.F., Harper, M.E., Marselle, L.M., Reyes, G., Gonda, M.A., Aldovini, A., Debouk, C. et Gallo, R.C. et al 1986. The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature.* **320**(6060):367-71.
- Fitzer-Attas, C.J., Lowry, M., Crowley, M.T., Finn, A.J., Meng, F., DeFranco, A.L. et Lowell, C.A. 2000. Fcγ receptor-mediated phagocytosis in macrophages lacking the Src family tyrosine kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.* **191**(4):669-82.
- Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M., Racaniello, V.R. et Skalka, A.M. 2000. Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control. ASM Press, Library of Congress. pp:199-234.
- Foster, J.L., Molina, R.P., Luo, T., Arora, V.K., Huang, Y., Ho, D.D. et Garcia, J.V. 2001. Genetic and functional diversity of human immunodeficiency virus type 1 subtype B Nef primary isolates. **75**(4):1672-80.
- Foti, M., Cartier, L., Piguet, V., Lew, D.P., Carpentier, J.L., Trono, D. et Krause, K.H. 1999. The HIV Nef protein alters Ca²⁺ signaling in myelomonocytic cells through SH3-mediated protein-protein interactions. *J. Biol. Chem.* **274**(49):34765-72.
- Frankel, A.D. et Young J.A. 1998. HIV-1 : fifteen proteins and an RNA. *Ann. Rev. Biochem.* **67**:1-25
- Freed, E.O. 2001. HIV-1 replication. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **26**(1-6):13-33.
- Freed, E.O. 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology.* **251**(1):1-15.
- Freed, E.O. Englund, G., et Martin, M.A. 1995. Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *J. Virol.* **69**(6):3949-54

- Frost, J.A., Khokhlatchev, A., Stippec, S., White, M.A. et Cobb, M.H. 1998. Differential effects of PAK1-activating mutations reveal activity-dependent and -independent effects on cytoskeletal regulation. *J. Biol. Chem.* **273**(43):28191-98.
- Galisteo ML, Chernoff J, Su YC, Skolnik EY, Schlessinger J. 1996. The adaptor protein Nck links receptor tyrosine kinases with the serine-threonine kinase Pak1. *J. Biol. Chem.* **271**(35):20997-1000.
- Gallina, A., Rossi, F. et Milanese, G. 2001. Rack1 binds HIV-1 Nef and can act as a Nef-protein kinase C adaptor. *Virology.* **283**(1):7-18.
- Gamble, T.R., Yoo, S., Vajdos, F.F., Von Schwedler, U.F. et Worthylake, D.K. 1997. Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein *Science* **278** (5339):849-53
- Garcia, J.V. et Miller, A.D. 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature.* **350**(6318):508-11.
- Gatesman, A., Walker, V.G., Baisden, J.M., Weed, S.A. et Flynn, D.C. 2004, Protein kinase Calpha activates c-Src and induces podosome formation via AFAP-110. *Mol. Cell Biol.* **24**(17):7578-97.
- Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., Figdor, C.G. et van Kooyk, Y. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.* **100**(5):587-97.
- Geleziunas, R., Xu, W., Takeda, K., Ichijo, H. et Greene, W.C. 2001. HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature.* **410**(6830):834-38
- Geyer, M., Yu, H., Mandic, R., Linnemann, T., Zheng, Y.H., Fackler, O.T. et Peterlin, B.M. 2002. Subunit H of the V-ATPase binds to the medium chain of adaptor protein complex 2 and connects Nef to the endocytic machinery. *J. Biol. Chem.* **277**(32):28521-29
- Geyer, M., Fackler, O.T. et Peterlin, B.M. 2001. Structure--function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Rep.* **2**(7):580-85.
- Ghazizadeh, S., Bolen, J.B. et Fleit, H.B. 1994. Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *J. Biol. Chem.* **269**(12):8878-84.
- Goeckeler, Z.M., Masaracchia, R.A., Zeng, Q., Chew, T.L., Gallagher, P. et Wysolmerski, R.B. 2000. Phosphorylation of myosin light chain kinase by p21-activated kinase PAK2. *J. Biol. Chem.* **275**(24):18366-74.

- Goldsmith, M.A., Warmerdam, M.T., Atchison, R.E., Miller, M.D. et Greene, W.C. 1995. Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement functions of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J. Virol.* **69**(7):4112-21.
- Gomez, M., Kioussis, D. et Cantrell, D.A. 2001. The GTPase Rac-1 controls cell fate in the thymus by diverting thymocytes from positive to negative selection. *Immunity.* **15**(5):703-13.
- Gomez, M., Tybulewicz, V. et Cantrell, D.A. 2000. Control of pre-T cell proliferation and differentiation by the GTPase Rac-1. *Nat. Immunol.* **1**(4):348-52.
- Gottlinger, H.G., Dorfman, T., Sodroski, J.G. et Haseltine, W.A. 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**(8):3195-99.
- Greenberg, M., DeTulleo, L., Rapoport, I., Skowronski, J. et Kirchhausen, T. 1998a. A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr. Biol.* **8**(22):1239-42.
- Greenberg, M.E., Iafrate, A.J. et Skowronski, J. 1998b. The SH3 domain-binding surface and an acidic motif in HIV-1 Nef regulate trafficking of class I MHC complexes. *EMBO J.* **17**(10):2777-89
- Greenberg, M.E., Bronson, S., Lock, M., Neumann, M., Pavlakis, G.N. et Skowronski, J. 1997. Co-localization of HIV-1 Nef with the AP-2 adaptor protein complex correlates with Nef-induced CD4 down-regulation. *EMBO J.* **16**(23):6964-76.
- Greenway, A.L., McPhee, D.A., Allen, K., Johnstone, R., Holloway, G., Mills, J., Azad, A., Sankovich, S. et Lambert, P. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis. *J. Virol.* **76**(6):2692-702
- Greenway, A.L., Dutartre, H., Allen, K., McPhee, D.A., Olive, D. et Collette, Y. 1999. Simian immunodeficiency virus and human immunodeficiency virus type 1 nef proteins show distinct patterns and mechanisms of Src kinase activation. *J. Virol.* **73**(7):6152-58
- Greenway, A., Azad, A., Mills, J. et McPhee, D. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds directly to Lck and mitogen-activated protein kinase, inhibiting kinase activity. *J. Virol.* **70**(10):6701-08
- Gu, Y., Filippi, M.D., Cancelas, J.A., Siefring, J.E., Williams, E.P., Jasti, A.C., Harris, C.E., Lee, A.W., Prabhakar, R., Atkinson, S.J., Kwiatkowski, D.J. et Williams, D.A. 2003. Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science.* **302**(5644):445-49.

- Gulizia, R.J., Collman, R.G., Levy, J.A., Trono, D. et Mosier, D.E. 1999. Deletion of nef slows but does not prevent CD4-positive T-cell depletion in human immunodeficiency virus type 1-infected human-PBL-SCID mice. *J. Virol.* **71**(5):4161-74.
- Guo, J.H. Henderson, L.E., Bess, J., Kane, B. et Levin, J.G., 1997. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein promotes efficient strand transfer and specific viral DNA synthesis by inhibiting TAR-dependent self-priming from minus-strand strong-stop DNA. *J. Virol.* **71**(7): 5178-88
- Guy, B., Kieny, M.P, Riviere, Y., Le Peuch, C., Dott, K., Girard, M., Montagnier, L. et Lecocq, J.P. 1987. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. *Nature.* **330**(6145):266-69.
- Gyorkey, F., Melnick, J.L. et Gyorkey, P. 1987. Human immunodeficiency virus in brain biopsies of patients with AIDS and progressive encephalopathy. *J. Infect. Dis.* **155**(5):870-76.
- Haataja, L., Groffen, J. et Heisterkamp, N. 1997. Characterization of RAC3, a novel member of the Rho family. *J. Bio.l Chem.* **272**(33):20384-98.
- Hanna, Z., Priceputu, E., Hu, C., Vincent, P. et Jolicoeur, P. 2006. HIV-1 Nef mutations abrogating downregulation of CD4 affect other Nef functions and show reduced pathogenicity in transgenic mice. *Virology.* **346**(1):40-52.
- Hanna, Z., Priceputu, E., Kay, D.G., Poudrier, J., Chrobak, P. et Jolicoeur, P. 2004. In vivo mutational analysis of the N-terminal region of HIV-1 Nef reveals critical motifs for the development of an AIDS-like disease in CD4C/HIV transgenic mice. *Virology.* **327**(2):273-86.
- Hanna, Z., Weng, X., Kay, D.G., Poudrier, J., Lowell, C. et Jolicoeur, P. 2001. The pathogenicity of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 Nef in CD4C/HIV transgenic mice is abolished by mutation of its SH3-binding domain, and disease development is delayed in the absence of Hck. *J. Virol.* **75**(19):9378-92.
- Hanna, Z., Kay, D.G., Cool, M., Jothy, S., Rebai, N. et Jolicoeur, P. 1998a Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease. *J. Virol.* **72**(1):121-32.
- Hanna, Z., Kay, D.G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S. et Jolicoeur, P. 1998b Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice *Cell.* **95**(2):163-75
- He, J.C., Husain, M., Sunamoto, M., D'Agati, V.D., Klotman, M.E., Iyengar R. et Klotman, P.E. 2004. Nef stimulates proliferation of glomerular podocytes through activation of Src-dependent Stat3 and MAPK1,2 pathways. *J. Clin. Invest.* **114**(5):643-51.

- Henning, S.W., Galandrini, R., Hall, A. et Cantrell, D.A. 1997. The GTPase Rho has a critical regulatory role in thymus development. *EMBO J.* **16**(9):2397-407.
- Hing, H., Xiao, J., Harden, N., Lim, L. et Zipursky, S.L. 1999. Pak functions downstream of Dock to regulate photoreceptor axon guidance in *Drosophila*. *Cell.* **97**(7):853-63.
- Hodge, D.R., Dunn, K.J., Pei, G.K., Chakrabarty, M.K., Heidecker, G., Lautenberger, J.A. et Samuel, K.P. 1998. Binding of c-Raf1 kinase to a conserved acidic sequence within the carboxyl-terminal region of the HIV-1 Nef protein. *J. Biol. Chem.* **273**(25):15727-33.
- Hofmann, C., Shepelev, M. et Chernoff, J. 2004. The genetics of Pak. *J. Cell. Sci.* **117**(19):4343-54.
- Hornstein, I., Alcover, A. et Katzav, S. 2004, Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization. *Cell Signal.* **16**(1):1-11
- Horwitz, R. et Webb, D. 2003. Cell migration. *Curr. Biol.* **13**(19):R756-9.
- Huang, M., Orenstein, J.M., Martin, M.A. et Freed, E.O. 1995. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J. Virol.* **69**(11):6810-18
- Iafrate, A.J., Carl, S., Bronson, S., Stahl-Hennig, C., Swigut, T., Skowronski, J. et Kirchhoff, F. 2000. Disrupting surfaces of nef required for downregulation of CD4 and for enhancement of virion infectivity attenuates simian immunodeficiency virus replication in vivo. *J. Virol.* **74**(21):9836-44.
- Iafrate, A.J., Bronson, S. et Skowronski, J. 1997. Separable functions of Nef disrupt two aspects of T cell receptor machinery: CD4 expression and CD3 signaling. *EMBO J.* **16**(4):673-84.
- ICTV International committee on taxonomy of viruses. 2005. <http://www.ncbi.nih.gov/ICTV>
- Igarashi, T., Shibata, R., Hasebe, F., Ami, Y., Shinohara, K., Komatsu, T., Stahl-Hennig, C., Petry, H., Hunsmann, G., Kuwata, T., et al. 1994. Persistent infection with SIVmac chimeric virus having tat, rev, vpu, env and nef of HIV type 1 in macaque monkeys. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **10**(8):1021-29.
- Jakobi, R., McCarthy, C.C., Koeppel, M.A. et Stringer, D.K. 2003. Caspase-activated PAK-2 is regulated by subcellular targeting and proteasomal degradation. *J. Biol. Chem.* **278**(40):38675-85
- Jakobi, R., Moertl, E. et Koeppel, M.A. 2001. p21-activated protein kinase gamma-PAK suppresses programmed cell death of BALB3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **276**(20):16624-34

- Jakobi, R., Chen, C.J., Tuazon, P.T. et Traugh, J.A. 1996. Molecular cloning and sequencing of the cytosolic G protein-activated protein kinase PAK I. *Biol. Chem.* **271**(11):6206-11
- Jamieson, B.D., Aldrovandi, G.M. et Zack, J.A. 1996. The SCID-hu mouse: an in-vivo model for HIV-1 pathogenesis and stem cell gene therapy for AIDS. *Semin. Immunol.* **8**(4):215-21.
- Janardhan, A., Swigut, T., Hill, B. Myers, M.P. et Skowronski, J. 2004. HIV-1 Nef binds the DOCK2-ELMO1 complex to activate rac and inhibit lymphocyte chemotaxis. *PLoS Biol.* **2**(1):E6.
- Jones, K.A., et Peterlin, B.M. 1994. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter *Annu. Rev. Biochem.* **63**:717-43
- Katzmann, D.J., Odorizzi, G. et Emr, S.D. 2002, Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**(12):893-905.
- Kay, D.G., Yue, P., Hanna, Z., Jothy, S., Tremblay, E. et Jolicoeur, P. 2002. Cardiac disease in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus-1 nef in cells of the immune system. *Am. J. Pathol.* **161**(1):321-35.
- Kawano, Y., Tanaka, Y., Misawa, N., Tanaka, R., Kira, J.I., Kimura, T., Fukushi, M., Sano, K., Goto, T., Nakai, M., Kobayashi, T., Yamamoto, N. et Koyanagi, Y. 1997. Mutational analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) accessory genes: requirement of a site in the nef gene for HIV-1 replication in activated CD4+ T cells in vitro and in vivo. *J. Virol.* **71**(11):8456-66.
- Kedzierska, K., Ellery, P., Mak, J. Lewin, S.R., Crowe, S.M. et Jaworowski, A. 2002. HIV-1 down-modulates gamma signaling chain of Fc gamma R in human macrophages: a possible mechanism for inhibition of phagocytosis. *J. Immunol.* **168**(6):2895-903.
- Kestler, H.W. 3rd, Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, M.D. et Desrosiers, R.C. 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell.* **65**(4):651-62.
- Khan, I.H., Sawai, E.T., Antonio, E., Weber, C.J., Mandell, C.P., Montbriand, P. et Luciw, P.A. 1998. Role of the SH3-ligand domain of simian immunodeficiency virus Nef in interaction with Nef-associated kinase and simian AIDS in rhesus macaques. *J. Virol.* **72**(7):5820-30.
- Kiosses, W.B., Daniels, R.H., Otey, C., Bokoch, G.M. et Schwartz, M.A. 1999. A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration. *J. Cell. Biol.* **147**(4):831-44.
- Kiosses, W.B, Hood, J., Yang, S., Gerritsen, M.E., Cheresch, D.A., Alderson, N. et Schwartz, M.A. 2002. A dominant-negative p65 PAK peptide inhibits angiogenesis. *Circ. Res.* **90**(6):697-702.

- Kirchhoff, F., Schindler, M., Bailer, N., Renkema, G.H., Saksela, K., Knoop, V., Muller-Trutwin, M.C., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Dittmar, M.T., Heeney, J.L., Hahn, B.H. et Munch, J. 2004. Nef proteins from simian immunodeficiency virus-infected chimpanzees interact with p21-activated kinase 2 and modulate cell surface expression of various human receptors. *J Virol.* **78**(13):6864-74
- Kirchhoff, F. P. J. Easterbrook, N. Douglas, M. Troop, T. C. Greenough, J. Weber, S. Carl, J. L. Sullivan, et R. D. Daniels. 1999. Sequence variations in human immunodeficiency virus type 1 Nef are associated with different stages of disease. *J. Virol.* **73**(10):5497-508.
- Kirchhoff, F., Greenough, T.C., Brettler, D.B., Sullivan, J.L. et Desrosiers, R.C. 1995. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N. Engl. J. Med.* **332**(4):228-32.
- Klotman, M.E., Kim, S., Buchbinder, A., DeRossi, A., Baltimore, D. et Wong-Staal, F. 1991. Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**(11):5011-15.
- Knaus, U.G., Wang, Y., Reilly, A.M., Warnock, D. et Jackson, J.H. 1998. Structural requirements for PAK activation by Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* **273**(34):21512-8.
- Koedel, U., Kohleisen, B., Sporer, B., Lahrtz, F., Ovod, V., Fontana, A., Erfle, V. et Pfister, H.W. 1999. HIV type 1 Nef protein is a viral factor for leukocyte recruitment into the central nervous system. *J. Immunol.* **163**(3):1237-45.
- Koh, C.G., Tan, E.J., Manser, E. et Lim, L. 2002. The p21-activated kinase PAK is negatively regulated by POPX1 and POPX2, a pair of serine/threonine phosphatases of the PP2C family. *Curr. Biol.* **12**(4):317-21
- Koh, C.G., Manser, E., Zhao, Z.S., Ng, C.P. et Lim, L. 2001. β 1PIX, the PAK-interacting exchange factor, requires localization via a coiled-coil region to promote microvillus-like structures and membrane ruffles. *J. Cell. Science.* **114**(23):4239-51
- Krautkramer, E., Giese, S.I., Gasteier, J.E., Muranyi, W. et Fackler, O.T. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 Nef activates p21-activated kinase via recruitment into lipid rafts. *J. Virol.* **78**(8):4085-97.
- Lama, J., Mangasarian, A. et Trono, D. 1999. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr. Biol.* **9**(12):622-31.
- Lang, S.M., Iafrate, A.J., Stahl-Hennig, C., Kuhn, E.M., Nisslein, T., Kaup, F.J., Haupt, M., Hunsmann, G., Skowronski, J. et Kirchhoff, F. 1997. Association of simian immunodeficiency virus Nef with cellular serine/threonine kinases is dispensable for the development of AIDS in rhesus macaques. *Nat. Med.* **3**(8):860-65.

- Learmont, J.C., Geczy, A.F., Mills, J., Ashton, L.J., Raynes-Greenow, C.H., Garsia, R.J., Dyer, W.B., McIntyre, L., Oelrichs, R.B., Rhodes, D.I., Deacon, N.J. et Sullivan, J.S. 1999. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N. Engl. J. Med.* **340**(22):1715-22.
- Lee, C.H., Saksela, K., Mirza, U.A., Chait, B.T. et Kuriyan, J. 1996. Crystal structure of the conserved core of HIV-1 Nef complexed with a Src family SH3 domain. *Cell.* **85**(6):931-42.
- Lee, C.H., Leung, B., Lemmon, M.A., Zheng, J., Cowburn, D., Kuriyan, J. et Saksela, K. 1995. A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein *EMBO J.* **14**(20):5006-15
- Lee N, MacDonald H, Reinhard C, Halenbeck R, Roulston A, Shi T, Williams LT. 1997. Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**(25):13642-47.
- Lee, S.H., Eom, M., Lee, S.J., Kim, S., Park, H.J. et Park, D. 2001. BetaPix-enhanced p38 activation by Cdc42/Rac/PAK/MKK3/6-mediated pathway. Implication in the regulation of membrane ruffling. *J. Biol. Chem.* **276**(27):25066-72
- Le Gall, S., Buseyne, F., Trocha, A., Walker, B.D., Heard, J.M. et Schwartz, O. 2000. Distinct trafficking pathways mediate Nef-induced and clathrin-dependent major histocompatibility complex class I down-regulation. *J. Virol.* **74**(19):9256-66.
- Le Gall, S., Erdtmann, L., Benichou, S., Berlioz-Torrent, C., Liu, L., Benarous, R., Heard, J.M. et Schwartz, O. 1998. Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity.* **8**(4):483-95.
- Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M.C., Eck, M.J., Mayer, B.J. et Harrison, S.C. 2000. Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell.* **102**(3):387-97
- Li, P.L., Wang, T., Buckley, K.A., Chenine, A.L., Popov, S. et Ruprecht, R.M. 2005. Phosphorylation of HIV Nef by cAMP-dependent protein kinase. *Virology.* **331**(2):367-74.
- Li, X. et Minden, A.. 2003. Targeted disruption of the gene for the PAK5 kinase in mice. *Mol. Cell. Biol.* **23**(20):7134-42.
- Li, X., Multon, M.C., Henin, Y., Schweighoffer, F., Venot, C., LaVecchio, J., Josef, J., Stuckert, P., Mhashilkar, A., Tocque, B. et Marasco, W.A. 2000. Upregulation of the apoptosis-associated protein Grb3-3 in HIV-1-infected human CD4(+) lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**(1):362-70.

- Linnemann, T., Zheng, Y.H., Mandic, R. et Peterlin, B.M. 2002. Interaction between Nef and phosphatidylinositol-3-kinase leads to activation of p21-activated kinase and increased production of HIV. *Virology*. **294**(2):246-55.
- Lindemann, D., Wilhelm, R., Renard, P., Althage, A., Zinkernage, R. et Mous, J. 1994. Severe immunodeficiency associated with a human immunodeficiency virus 1 NEF/3'-long terminal repeat transgene. *J. Exp. Med.* **179**(3):797-807.
- Lores, P., Morin, L., Luna, R. et Gacon, G. 1997. Enhanced apoptosis in the thymus of transgenic mice expressing constitutively activated forms of human Rac2GTPase. *Oncogene*. **15**(5):601-15.
- Lu, X., Yu, H., Liu, S.H., Brodsky, F.M. et Peterlin, B.M. 1998. Interactions between HIV1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4. *Immunity*. **8**(5):647-56.
- Lu, X., Wu, X., Plemenitas, A., Yu, H., Sawai, E.T., Abo, A. et Peterlin, B.M. 1996. CDC42 and Rac1 are implicated in the activation of the Nef-associated kinase and replication of HIV-1. *Curr. Biol.* **6**(12):1677-84.
- Luban, J. 1996. Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-Gag interaction in HIV-1 virions *Cell* **87**(7):1157-59.
- Lundquist, C.A., Zhou, J. et Aiken, C. 2004, Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 replication in primary T cells by enhancing virion-associated gp120 levels: coreceptor-dependent requirement for Nef in viral replication. *J. Virol.* **78**(12):6287-96.
- Lundquist, C.A., Tobiume, M., Zhou, J., Unutmaz, D. et Aiken, C. 2002. Nef-mediated downregulation of CD4 enhances human immunodeficiency virus type 1 replication in primary T lymphocytes. *J. Virol.* **76**(9):4625-33
- Luo, T., Fredericksen, B.L., Hasumi, K., Endo, A. et Garcia, J.V. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced CD4 cell surface downregulation is inhibited by ikarugamycin. *J. Virol.* **75**(5):2488-92
- Luo, T., Livingston, R.A. et Garcia, J.V. 1997. Infectivity enhancement by human immunodeficiency virus type 1 Nef is independent of its association with a cellular serine/threonine kinase. *J. Virol.* **71**(12):9524-30.
- Luo, T. et Garcia, J.V. 1996. The association of Nef with a cellular serine/threonine kinase and its enhancement of infectivity are viral isolate dependent. *J. Virol.* **70**(9):6493-6.
- Maerz, A.L, Drummer, H.E., Wilson, K.A. et Pombourios, P. 2001, Functional analysis of the disulfide-bonded loop/chain reversal region of human immunodeficiency virus type 1 gp41 reveals a critical role in gp120-gp41 association. *J. Virol.* **75**(14):6635-44.
- Majumdar, M., Vuori, K. et Stallcup, W.B. 2003. Engagement of the NG2 proteoglycan triggers cell spreading via rac and p130cas. *Cell Signal.* **15**(1):79-84.

- Mammano, F., Donlo, E., Sodoski, J., Bukovsky, A et Gottlinger, H.G. 1995. Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoproteins with short cytoplasmic domains. *J. Virol.* **69**(6):3824-30.
- Manabe, Ri. R, Kovalenko, M., Webb, D.J. et Horwitz, A.R. 2002. GIT1 functions in a motile, multi-molecular signaling complex that regulates protrusive activity and cell migration. *J. Cell. Sci.* **115**(7):1497-510.
- Mandell, C.P., Reyes, R.A., Cho, K., Sawai, E.T., Fang, A.L., Schmidt, K.A. et Luciw, P.A. 1999. SIV/HIV Nef recombinant virus (SHIVnef) produces simian AIDS in rhesus macaques. *Virology.* **265**(2):235-51.
- Mangasarian, A., Piguet, V., Wang, J.K., Chen, Y.L. et Trono, D. 1999. Nef-induced CD4 and major histocompatibility complex class I (MHC-I) down-regulation are governed by distinct determinants: N-terminal alpha helix and proline repeat of Nef selectively regulate MHC-I trafficking. *J. Virol.* **73**(3):1964-73.
- Mangasarian, A., Foti, M., Aiken, C., Chin, D., Carpentier, J.L. et Trono, D. 1997. The HIV-1 Nef protein acts as a connector with sorting pathways in the Golgi and at the plasma membrane. *Immunity.* **6**(1):67-77.
- Manninen, A., Huotari, P., Hiipakka, M., Renkema, G.H. et Saksela K. 2001. Activation of NFAT-dependent gene expression by Nef: conservation among divergent Nef alleles, dependence on SH3 binding and membrane association, and cooperation with protein kinase C-theta. *J. Virol.* 2001 **75**(6):3034-47
- Manninen, A., Renkema, G.H. et Saksela, K. 2000. Synergistic activation of NFAT by HIV-1 nef and the Ras/MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* **275**(22):16513-7.
- Manninen, A., Hiipakka, M., Vihinen, M., Lu, W., Mayer, B.J. et Saksela, K. 1998. SH3-Domain binding function of HIV-1 Nef is required for association with a PAK-related kinase. *Virology.* **250**(2):273-82
- Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao ZS, Lim L. 1994. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* **367**(6458):40-46.
- Manser, E., Huang, H.Y., Loo, T.H., Chen, X.Q., Dong, J.M., Leung, T. et Lim, L. 1997. Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol. Cell. Biol.* **17**(3):1129-43
- Manser, E., Loo, T.H., Koh, C.G., Zhao, Z.S., Chen, X.Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T. et Lim, L. 1998. PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol. Cell.* **1**(2):183-92.

- Margottin, F., Bour, S., Durand, H., Selig, L., Benichou, S., Richard, V., Thomas, D., Strebel, K., et Benarous, R. 1998. A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol Cell.*1(4):565-74.
- Martin, G.A., Bollag, G., McCormick, F., and Abo, A. 1995. A novel serine kinase activated by rac1/CDC42Hs-dependent autophosphorylation is related to PAK65 and STE20. *EMBO. J.* 14(9):1970-18
- Mascola, J.R., Frankel, S.S. et Broliden, K. 2000. HIV-1 entry at the mucosal surface: role of antibodies in protection. *AIDS.* 14 (Suppl 3):S167-74.
- Mazaki, Y., Hashimoto, S., Okawa, K., Tsubouchi, A., Nakamura, K., Yagi, R., Yano, H., Kondo, A., Iwamatsu, A., Mizoguchi, A. et Sabe, H. 2001. An ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Git2-short/KIAA0148 is involved in subcellular localization of paxillin and actin cytoskeletal organization. *Mol. Biol. Cell.* 12(3):645-62.
- McCune, J.M. 1996. Development and applications of the SCID-hu mouse model. *Semin. Immunol.* 8(4):187-96.
- McCune, J.M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L.D., Lieberman, M. et Weissman, I.L. 1988. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science.* 241(4873):1632-39.
- Mehandru, S., M.A. Poles, K. Tenner-Racz, A. Horowitz, A. Hurley, C. Hogan, D. Boden, P. Racz, and M. Markowitz. 2004. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 200(6):761-70
- Meusser, B. et Sommer, T. 2004. Vpu-mediated degradation of CD4 reconstituted in yeast reveals mechanistic differences to cellular ER-associated protein degradation. *Mol. Cell.* 14(2):247-58.
- Migueles, S.A., Sabbaghian, M.S., Shupert, W.L., Bettinotti, M.P., Marincola, F.M., Martino, L., *et al.* 2000. HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97(6):2709-14.
- Miller, M.D., Warmerdam, M.T., Ferrell, S.S., Benitez, R. et Greene, W.C. 1997. Intravirion generation of the C-terminal core domain of HIV-1 Nef by the HIV-1 protease is insufficient to enhance viral infectivity. *Virology.* 234(2):215-25
- Miller, M.D., Warmerdam, M.T., Page, K.A., Feinberg, M.B. et Greene, W.C. 1995. Expression of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nef gene during HIV-1 production increases progeny particle infectivity independently of gp160 or viral entry. *J. Virol.* 69(1):579-84

- Miller, M.D., Warmerdam, M.T., Gaston, I., Greene, W.C. et Feinberg, M.B. 1994. The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* **179**(1):101-13.
- Mira JP, Benard V, Groffen J, Sanders LC, Knaus UG. 2000. Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(1):185-9.
- Mizutani, K., Miki, H., He, H., Maruta, H. et Takenawa, T. 2002. Essential role of Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein in podosome formation and degradation of extracellular matrix in src-transformed fibroblast. *Cancer Research* **62**:669-674
- Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C.H., Kuriyan, J. et Miller, W.T. 1997. Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature.* **385**(6617):650-3.
- Munch, J., Janardhan, A., Stolte, N., Stahl-Hennig, C., Ten Haaf, P., Heeney, J.L., Swigut, T., Kirchhoff, F. et Skowronski, J. 2002. T-cell receptor:CD3 down-regulation is a selected in vivo function of simian immunodeficiency virus Nef but is not sufficient for effective viral replication in rhesus macaques. *J. Virol.* **76**(23):12360-74.
- Munch, J., Stolte, N., Fuchs, D., Stahl-Hennig, C. et Kirchhoff, F. 2001. Efficient class I major histocompatibility complex down-regulation by simian immunodeficiency virus Nef is associated with a strong selective advantage in infected rhesus macaques. *J. Virol.* **75**(21):10532-46.
- Muthumani, K., Hwang, D.S., Choo, A.Y., Mayilvahanan, S., Dayes, N.S., Thieu, K.P. et Weiner, D.B. 2005. HIV-1 Vpr inhibits the maturation and activation of macrophages and dendritic cells in vitro. *Int. Immunol.* **17**(2):103-16
- Niederman, T.M., Hastings, W.R. et Ratner, L. 1993. Myristoylation-enhanced binding of the HIV-1 Nef protein to T cell skeletal matrix. *Virology.* **197**(1):420-35.
- Nunn, M. et Marsh, J.W. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a member of the p21-activated kinase family. *J Virol.* **70**(9):6157-61.
- Obemeier, A., Ahmed, S. Manser, E., Chin Yen, S., Hall, C. et Lim, L. 1998. Pak promotes morphological changes by acting upstream of Rac. *EMBO* **17**(15):4328-39.
- Piguet, V., Wan, L., Borel, C., Mangasarian, A., Demaurex, N. Thomas, G. et Trono, D. 2000. HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes. *Nat. Cell Biol.* **2**(3):163-67.
- Piguet, V., Gu, F., Foti, M., Demaurex, N., Gruenberg, J., Carpentier, J.L. et Trono, D. 1999. Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. *Cell.* **97**(1):63-73.

- Pollard, V.W. et Malim, M.H. 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:491-532.
- Poudrier, J., Weng, X., Kay, D.G., Hanna, Z. et Jolicoeur, P. 2003. The AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with accumulation of immature CD11bHi dendritic cells. *J. Virol.* **77**(21):11733-44.
- Poudrier, J., Weng, X., Kay, D.G., Pare, G., Calvo, E.L., Hanna, Z., Kosco-Vilbois, M.H. et Jolicoeur, P. 2001. The AIDS disease of CD4C/HIV transgenic mice shows impaired germinal centers and autoantibodies and develops in the absence of IFN-gamma and IL-6. *Immunity.* **15**(2):173-85.
- Premont, R.T., Claing, A., Vitale, N., Freeman, J.L., Pitcher, J.A., Patton, W.A., Moss, J., Vaughan, M. et Lefkowitz, R.J. 1998. beta2-Adrenergic receptor regulation by GIT1, a G protein-coupled receptor kinase-associated ADP ribosylation factor GTPase-activating protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**(24):14082-87.
- Premont, R.T., Claing, A., Vitale, N., Perry, S.J. Lefkowitz, R.J. 2000. The GIT family of ADP-ribosylation factor GTPase-activating proteins. Functional diversity of GIT2 through alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **275**(29):22373-80.
- Priceputu., E., Rodrigue, I., Chrobak, P., Poudrier, J., Mak, T.W., Hanna, Z., Hu, C., Kay, D.G. et Jolicoeur, P. 2005. The Nef-mediated AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with increased Fas/FasL expression on T cells and T-cell death but is not prevented in Fas-, FasL-, tumor necrosis factor receptor 1-, or interleukin-1beta-converting enzyme-deficient or Bcl2-expressing transgenic mice. *J. Virol.* **79**(10):6377-91.
- Pulkkinen, K., Renkema, G.H., Kirchhoff, F. et Saksela, K. 2004. Nef associates with p21-activated kinase 2 in a p21-GTPase-dependent dynamic activation complex within lipid rafts. *J Virol.* **78**(23):12773-80.
- Pumarola-Sune, T., Navia, B.A., Cordon-Cardo, C., Cho, E.S. et Price, R.W. 1987. HIV antigen in the brains of patients with the AIDS dementia complex. *Ann. Neurol.* **21**(5):490-96.
- Puto, L.A., Pestonjamas, K., King, C.C. et Bokoch, GM. 2003. p21-activated kinase 1 (PAK1) interacts with the Grb2 adapter protein to couple to growth factor signaling. *Biol. Chem.* **278**(11):9388-93
- Qu, J., Li, X., Novitch, B.G., Zheng, Y., Kohn, M., Xie, J.M., Kozinn, S., Bronson, R., Beg, A.A. et Minden, A. 2003. PAK4 kinase is essential for embryonic viability and for proper neuronal development. *Mol. Cell. Biol.* **23**(20):7122-33.
- Quaranta, M.G., Mattioli B, Spadaro F, Straface E, Giordani L, Ramoni C, Malorni W, Viora M. 2003. HIV-1 Nef triggers Vav-mediated signaling pathway leading to functional and morphological differentiation of dendritic cells. *FASEB. J.* **17**(14):2025-36.

- Radja, F., Kay, D.G., Albrecht, S. et Jolicoeur, P. 2003. Oligodendrocyte-specific expression of human immunodeficiency virus type 1 Nef in transgenic mice leads to vacuolar myelopathy and alters oligodendrocyte phenotype in vitro. *J. Virol.* **77**(21):11745-53.
- Rasola, A., Gramaglia, D., Boccaccio, C. et Comoglio, P.M. 2001. Apoptosis enhancement by the HIV-1 Nef protein. *J. Immunol.* **166**(1):81-88.
- Re, F., Braaten, D., Franke, EK et Luban, J. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *J. Virol.* **69**(11): 6859-6864.
- Renkema, G.H., Pulkkinen, K. et Saksela, K. 2002. Cdc42/Rac1-mediated activation primes PAK2 for superactivation by tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **22**(19):6719-25.
- Renkema, G.H., Manninen, A. et Saksela, K. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 Nef selectively associates with a catalytically active subpopulation of p21-activated kinase 2 (PAK2) independently of PAK2 binding to Nck or beta-PIX. *J. Virol***75**(5):2154-60.
- Renkema, G.H. et Saksela, K. 2000. Interactions of HIV-1 NEF with cellular signal transducing proteins. *Front. Biosci.* **5**:D268-83.
- Renkema, G.H., Manninen, A., Mann, D.A., Harris, M. et Saksela, K. 1999. Identification of the Nef-associated kinase as p21-activated kinase 2. *Curr. Biol.* **9**(23):1407-10.
- Rhodes, D.I., Ashton, L., Solomon, A., Carr, A., Cooper, D., Kaldor, J. et Deacon, N. 2000. Characterization of three nef-defective human immunodeficiency virus type 1 strains associated with long-term nonprogression. Australian Long-Term Nonprogressor Study Group. *J. Virol.* **74**(22):10581-88.
- Ridley, A.J. 2001. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell. Biol.* **11**(12):471-77.
- Ridley, J. 1996. Rho: Theme and variations. *Curr. Biol.***6**(10):1256-64
- Ridley, A.J. et Hall, A. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* **70**(3):389-99.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. et Hall, A. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* **70**(3):401-10.
- Riggs, N.L., Craig, H.M., Pandori, M.W. et Guatelli, J.C. 1999. The dileucine-based sorting motif in HIV-1 Nef is not required for down-regulation of class I MHC. *Virology.* **258**(2):203-07.

- Roig, J., Tuazon, P.T., Zipfel, P.A., Pendergast, A.M. et Traugh, J.A. 2000a. Functional interaction between c-Abl and the p21-activated protein kinase gamma-PAK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(26):14346-51.
- Roig, J., Huang, Z., Lytle, C. et Traugh, J.A. 2000b p21-activated protein kinase gamma-PAK is translocated and activated in response to hyperosmolarity. Implication of Cdc42 and phosphoinositide 3-kinase in a two-step mechanism for gamma-PAK activation. *J. Biol. Chem.* **275**(22):16933-40.
- Roig, J. et Traugh, J.A. 1999. p21-activated protein kinase gamma-PAK is activated by ionizing radiation and other DNA-damaging agents. Similarities and differences to alpha-PAK. *J. Biol. Chem.* **274**(44):31119-22.
- Ross, T.M., Oran, A.E. et Cullen, B.R. 1999. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr. Biol.* **9**(12):613-21.
- Rudel, T., Zenke, F.T., Chuang, T.H. et Bokoch, G.M. 1998. p21-activated kinase (PAK) is required for Fas-induced JNK activation in Jurkat cells. *J. Immunol.* **1**;160(1):7-11.
- Rudel, T. et Bokoch, G.M. 1997. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science.* **276**(5318):1571-74.
- Saksela, K., Cheng, G. et Baltimore, D. 1995. Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef⁺ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J.* **14**(3):484-91.
- Sawai, E.T., Khan, I.H., Montbriand, P.M., Peterlin, B.M., Cheng-Mayer, C. et Luciw, P.A. 1996. Activation of PAK by HIV and SIV Nef: importance for AIDS in rhesus macaques *Curr. Biol.* **6**(11):1519-27.
- Sawai, E.T., Baur, A.S., Peterlin, B.M., Levy, J.A. et Cheng-Mayer, C. 1995. A conserved domain and membrane targeting of Nef from HIV and SIV are required for association with a cellular serine kinase activity. *J. Biol. Chem.* **270**(25):15307-14.
- Sawai, E.T., Baur, A.S., Struble, H., Levy, J.A. et Cheng-Mayer, C. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a cellular serine kinase in T lymphocytes. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **91**(4):1539-43.
- Schaefer, T.M., Bell, I., Fallert, B.A. et Reinhart, T.A. 2000. The T-cell receptor zeta chain contains two homologous domains with which simian immunodeficiency virus Nef interacts and mediates down-modulation. *J. Virol.* **74**(7):3273-83.
- Schaeffer, E., Geleziunas, R. et Greene, W.C. 2001. Human immunodeficiency virus type 1 Nef functions at the level of virus entry by enhancing cytoplasmic delivery of virions. *J. Virol.* **75**(6):2993-3000.

- Schiavoni, I., Trapp, S., Santarcangelo, A.C., Piacentini, V., Pugliese, K., Baur, A. et Federico, M. 2004. HIV-1 Nef enhances both membrane expression and virion incorporation of Env products. A model for the Nef-dependent increase of HIV-1 infectivity. *J. Biol. Chem.* **279**(22):22996-3006.
- Schmidt, A. et Hall, A. 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* **16**(13):1587-609.
- Schnittman, S.M., Lane, H.C., Greenhouse, J., Justement, J.S., Baseler, M. et Fauci, A.S. 1990. Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**(16):6058-62.
- Schrager, J.A., Der Minassian, V. et Marsh, J.W. 2002. HIV Nef increases T cell ERK MAP kinase activity. *J. Biol. Chem.* **277**(8):6137-42
- Schrager, J.A. et Marsh, J.W. 1999. HIV-1 Nef increases T cell activation in a stimulus-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **96**(14):8167-72.
- Schurmann, A., Mooney, A.F., Sanders, L.C., Sells, M.A., Wang, H.G., Reed, J.C. et Bokoch, G.M. 2000. p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **20**(2):453-61.
- Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F. et Heard, J.M. 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.* **2**(3):338-42.
- Schwartz, O., Marechal, V., Danos, O. et Heard, J.M. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J. Virol.* **69**(7):4053-9.
- Sells, M.A., Knaus, U.G., Bagrodia, S., Ambrose, D.M., Bokoch, G.M. et Chernoff, J. 1997. Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr. Biol.* **7**(3):202-10.
- Sells, M.A., Boyd, J.T. et Chernoff, J. 1999. p21-activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts. *J. Cell. Biol.* **145**(4):837-49.
- Sells, M.A., Pfaff, A. et Chernoff, J. 2000. Temporal and spatial distribution of activated Pak1 in fibroblasts *J. Cell. Biol.* **151**(7):1449-58.
- Shibata, R., Maldarelli, F., Siemon, C., Matano, T., Parta, M., Miller, G., Fredrickson, T. et Martin, M.A. 1997. Infection and pathogenicity of chimeric simian-human immunodeficiency viruses in macaques: determinants of high virus loads and CD4 cell killing. *J. Infect. Dis.* **176**(2):362-73.

- Shin, E.Y., Shin, K.S., Lee, C.S., Woo, K.N., Quan, S.H., Soung, N.K., Kim, Y.G., Cha, C.I., Kim, S.R., Park, D., Bokoch, G.M. et Kim, E.G. 2002. Phosphorylation of p85 beta PIX, a Rac/Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factor, via the Ras/ERK/PAK2 pathway is required for basic fibroblast growth factor-induced neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* **277**(46):44417-30
- Simard, M.C., Chrobak, P., Kay, D.G., Hanna, Z., Jothy, S. et Jolicoeur, P. 2002. Expression of simian immunodeficiency virus nef in immune cells of transgenic mice leads to a severe AIDS-like disease. *J. Virol.* **76**(8):3981-95.
- Simon, J.H., Gaddis, N.C., Fouchier, R.A. et Malim, M.H. 1998. Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat. Med.* **4**(12):1397-400.
- Sinclair, E., Barbosa, P. et Feinberg, M.B. 1997. The nef gene products of both simian and human immunodeficiency viruses enhance virus infectivity and are functionally interchangeable. *J. Virol.* **71**(5):3641-51.
- Skowronski, J., Parks, D. et Mariani, R. 1993. Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene. *EMBO J.* **12**(2):703-13.
- Sol-Foulon, N., Moris, A., Nobile, C., Boccaccio, C., Engering, A., Abastado, J.P., Heard, J.M., van Kooyk, Y. et Schwartz, O. 2002. HIV-1 Nef-induced upregulation of DC-SIGN in dendritic cells promotes lymphocyte clustering and viral spread. *Immunity.* **16**(1):145-55.
- Stallcup, W.B. 2002. The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J Neurocytol.* **31**(6-7):423-35.
- Stewart, G.J., Ashton, L.J., Biti, R.A., French, R.A., Bennetts, B.H., Newcombe, N.R., *et al.* 1997. Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *AIDS* **11**(15):1833-38.
- Strasser, A., O'Connor, L. et Dixit, V.M. 2000. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **69**:217-45
- Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W. et Greene, W.C. 2003. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol. Cell.* **12**(3):591-601.
- Stove, V., Naessens, E., Stove, C., Swigut, T., Plum, J. et Verhasselt, B. 2003. Signaling but not trafficking function of HIV-1 protein Nef is essential for Nef-induced defects in human intrathymic T-cell development. *Blood.* **102**(8):2925-32
- Suzu, S., Harada, H., Matsumoto, T. et Okada, S. 2005. HIV-1 Nef interferes with M-CSF receptor signaling through Hck activation and inhibits M-CSF bioactivities. *Blood.* **105**(8):3230-37.

- Swigut, T., Shohdy, N. et Skowronski, J. 2001. Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef. *EMBO J.* **20**(7):1593-604.
- Swann, S.A., Williams, M., Story, C.M., Bobbitt, K.R., Fleis, R. et Collins, K.L. 2001. HIV-1 Nef blocks transport of MHC class I molecules to the cell surface via a PI 3-kinase-dependent pathway. *Virology.* **282**(2):267-77.
- Swingler, S., Mann, A., Jacque, J., Brichacek, B., Sasseville, V.G., Williams, K., Lackner, A.A., Janoff E.N., Wang, R., Fisher, D. et Stevenson, M. 1995. HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat. Med.* **5**(9):997-1003
- Swingler, S., Gallay, P., Camaur, D., Song, J., Abo, A. et Trono, D. 1997. The Nef protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances serine phosphorylation of the viral matrix. *J. Virol.* **71**(6):4372-77.
- Takai, Y., Sasaki, T. et Matozaki, T. 2001. Small GTP-binding proteins. *Physiol.* **81**(1):153-208.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H. et Takai, Y. 1997. Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **139**(4):1047-59.
- Tang, H., Kuhen, K. et Wong-Staal F. 1999. Lentivirus Replication and Regulation. *Ann. Rev. Genet.* **33**:133-70.
- Tang, Y., Zhou, H., Chen, A., Pittman, R.N. et Field, J. 2000. The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals. *J. Biol. Chem.* **275**(13):9106-19.
- Tang, Y., Chen, Z., Ambrose, D., Liu, J., Gibbs, J.B., Chernoff, J. et Field, J. 1997. Kinase-deficient Pak1 mutants inhibit Ras transformation of Rat-1 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **17**(8):4454-64.
- Tomiyama, H., Akari, H., Adachi, A. et Takiguchi, M. 2002. Different effects of Nef-mediated HLA class I down-regulation on human immunodeficiency virus type 1-specific CD8(+) T-cell cytolytic activity and cytokine production. *J. Virol.* **76**(15):7535-43.
- Turner, C.E., Brown, M.C., Perrotta, J.A., Riedy, M.C., Nikolopoulos, S.N., McDonald, A.R., Bagrodia, S., Thomas, S. et Leventhal, P.S. 1999. Paxillin LD4 motif binds PAK and PIX through a novel 95-kD ankyrin repeat, ARF-GAP protein: A role in cytoskeletal remodeling. *J. Cell Biol.* **145**(4):851-63.
- Turner, M., Mee, P.J., Walters, A.E., Quinn, M.E., Mellor, A.L., Zamoyska, R. et Tybulewicz, V.L. 1997. A requirement for the Rho-family GTP exchange factor Vav in positive and negative selection of thymocytes. *Immunity.* **7**(4):451-60.
- Tybulewicz, V.L., Ardouin, L., Prisco, A. et Reynolds, L.F. 2003. Vav1: a key signal transducer downstream of the TCR. *Immunol. Rev.* **192**:42-52.

- Vadlamudi, R.K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T.P. et Kumar, R. 2002. Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat. Cell Biol.* **4**(9):681-90.
- Vadlamudi, R.K., Adam, L., Wang, R.A., Mandal, M., Nguyen, D., Sahin, A., Chernoff, J., Hung, M.C. et Kumar, R. 2000. Regulatable expression of p21-activated kinase-1 promotes anchorage-independent growth and abnormal organization of mitotic spindles in human epithelial breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **275**(46):36238-44.
- Vilhardt, F., Plastre, O., Sawada, M., Suzuki, K., Wiznerowicz, M., Kiyokawa, E., Trono, D. et Krause, K.H. 2002. The HIV-1 Nef protein and phagocyte NADPH oxidase activation. *J. Biol. Chem.* **277**(44):42136-43.
- Vogt, V.M. 2000. Ubiquitin in retrovirus assembly: actor or bystander? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(24):12945-47.
- von Schwedler, U.K., Stuchell, M., Muller, B., Ward, D.M., Chung, H.Y., Morita, E., Wang, H.E., Davis, T., He, G.P., Cimborra, D.M., Scott, A., Krausslich, H.G., Kaplan, J., Morham, S.G. et Sundquist, W.I. 2003, The protein network of HIV budding. *Cell.* **114**(6):701-13.
- Walter, B.N., Huang, Z., Jakobi, R., Tuazon, P.T., Alnemri, E.S., Litwack, G. et Traugh, J.A. 1997 Cleavage and activation of p21-activated protein kinase gamma-PAK by CPP32 (caspase 3). Effects of autophosphorylation on activity. *J. Biol. Chem.* **273**(44):28733-39.
- Wang, J.K., Kiyokawa, E., Verdin, E. et Trono, D. 2000. The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(1):394-99.
- Wardenburg, J.B., Pappu, R., Bu, J.Y., Mayer, B., Chernoff, J., Straus, D. et Chan, A.C. 1998. Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76. *Immunity.* **9**(5):607-16
- Weber, J. 2001. The pathogenesis of HIV-1 infection. *Br. Med. Bull.* **58**:61-72.
- Weiss-Haljiti, C., Pasquali, C., Ji, H., Gillieron, C., Chabert, C., Curchod, M.L., Hirsch, E., Ridley, A.J., Hooft Van Huijsduijnen, R., Camps, M. et Rommel, C. 2004. Involvement of PI3Kgamma, Rac and PAK signaling in chemokine-induced macrophage migration. *J Biol Chem.* **279**(41):43273-84.
- Wei, B.L., Arora, V.K., Foster, J.L., Sodora, D.L. et Garcia, J.V. 2003. In vivo analysis of Nef function. *Curr. HIV Res.* **1**(1):41-50.
- Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fisher, W.M. et Jones, K.A. 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**(4):451-62.

- Welker, R., Kottler, H., Kalbitzer, H.R. et Krausslich, H.G. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology*. **219**(1):228-36.
- Wells, C.M., Walmsley, M., Ooi, S., Tybulewicz, V. et Ridley, A.J. 2004. Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *J. Cell Sci.* **117**(7):1259-68.
- Weng, X., Priceputu, E., Chrobak, P., Poudrier, J., Kay, D.G., Hanna, Z., Mak, T.W. et Jolicoeur, P. 2004. CD4+ T cells from CD4C/HIVNef transgenic mice show enhanced activation in vivo with impaired proliferation in vitro but are dispensable for the development of a severe AIDS-like organ disease. *J. Virol.* **78**(10):5244-57.
- West, M.A., Prescott, A.R., Eskelinen, E.L., Ridley, A.J. et Watts, C. 2000. Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr. Biol.* **10**(14):839-48.
- Westphal, R.S., Coffee, R.L. Jr, Marotta, A., Pelech, S.L. et Wadzinski, B.E. 1999. Identification of kinase-phosphatase signaling modules composed of p70 S6 kinase-protein phosphatase 2A (PP2A) and p21-activated kinase-PP2A. *J. Biol. Chem.* **274**(2):687-92.
- Whatmore, A.M., Cook, N., Hall, G.A., Sharpe, S., Rud, E.W. et Cranage, M.P. 1995. Repair and evolution of nef in vivo modulates simian immunodeficiency virus virulence. *J. Virol.* **69**(8):5117-23.
- Williams, D.A., Tao, W., Yang, F., Kim, C., Gu, Y., Mansfield, P., Levine, J.E., Petryniak, B., Derrow, C.W., Harris, C., Jia, B., Zheng, Y., Ambruso, D.R., Lowe, J.B., Atkinson, S.J., Dinauer, M.C. et Boxer, L. 2000. Dominant negative mutation of the hematopoietic-specific Rho GTPase, Rac2, is associated with a human phagocyte immunodeficiency. *Blood*. **96**(5):1646-54.
- Williams, K.C., Corey, S., Westmoreland, S.V., Pauley, D., Knight, H., deBakker, C., Alvarez, X. et Lackner, A.A. 2001. Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J. Exp. Med.* **193**(8):905-15
- Williams, M.A., Trout, R. et Spector, S.A. 2002. HIV-1 gp120 modulates the immunological function and expression of accessory and co-stimulatory molecules of monocyte-derived dendritic cells. *J. Hematother. Stem Cell. Res.* **11**(5):829-47.
- Wiskerchen, M. et Cheng-Mayer, C. 1996. HIV-1 Nef association with cellular serine kinase correlates with enhanced virion infectivity and efficient proviral DNA synthesis. *Virology*. **224**(1):292-301

- Wolf, D., Witte, V., Laffert, B., Blume, K., Stromer, E., Trapp, S., d'Aloja, P., Schurmann, A. et Baur, A.S. 2001. HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals. *Nat. Med.* **7**(11):1217-24.
- Xu, X.N., Laffert, B., Screaton, G.R., Kraft, M., Wolf, D., Kolanus, W., Mongkolsapay, J., McMichael, A.J. et Baur, A.S. 1999. Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J. Exp. Med.* **189**(9):1489-96.
- Yablonski, D., Kane, L.P., Qian, D. et Weiss, A. 1998. A Nck-Pak1 signaling module is required for T-cell receptor-mediated activation of NFAT, but not of JNK. *EMBO J.* **17**(19):5647-57.
- Yamauchi, A., Kim, C., Li, S., Marchal, C.C., Towe, J., Atkinson, S.J. et Dinauer, M.C. 2004. Rac2-deficient murine macrophages have selective defects in superoxide production and phagocytosis of opsonized particles. *J. Immunol.* **173**(10):5971-9.
- Yoon, K., Jeong, J.G. et Kim, S. 2001. Stable expression of human immunodeficiency virus type 1 Nef confers resistance against Fas-mediated apoptosis. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **17**(2):99-104.
- Yu, H., Leitenberg, D., Li, B. et Flavell, R.A. 2001. Deficiency of small GTPase Rac2 affects T cell activation. *J. Exp. Med.* **194**(7):915-26.
- Zeng, Q., Lagunoff, D., Masaracchia, R., Goeckeler, Z., Cote, G. et Wysolmerski, R. 2000. Endothelial cell retraction is induced by PAK2 monophosphorylation of myosin II. *J. Cell Sci.* **113** (3):471-82
- Zhao, Z.S., Manser, E., Loo, T.H. et Lim, L. 2000. Coupling of PAK-interacting exchange factor PIX to GIT1 promotes focal complex disassembly. *Mol. Cell. Biol.* **20**(17):6354-63.

Accord des coauteurs

Patrick Vincent [redacted]

Département de microbiologie et immunologie, Faculté de médecine

Ph.D. Virologie et immunologie

**ACTIVATION OF PAK2 AND ITS ASSOCIATION WITH NEF IS CONSERVED
IN MURINE CELLS, BUT IS NOT SUFFICIENT TO INDUCE AN AIDS-LIKE
DISEASE OF CD4C/HIV TRANSGENIC MICE**

Patrick Vincent¹, Elena Priceputu¹, Denis Kay¹, Kalle Saksele², Paul Jolicœur^{1,4,5}
and Zaher Hanna^{1,3,5}

article soumis pour publication à Journal of biological chemistry

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Patrick Vincent inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre, Étude du rôle de Nef dans l'altération de la transduction du signal chez les souris transgéniques CD4C/HIV¹.

[redacted]
Elena Priceputu
Coauteur

9-08-05

date

Denis Kay
Coauteur

15 August 2005

date

Kalle Saksele
Coauteur

10.8.2005

date

Paul Jolicœur
Coauteur

7-10-05

date

Zaher Hanna
Coauteur

[redacted]
Signature

Sept. 9/2005

date

Accord des coauteurs

Patrick Vincent [REDACTED]

Département de microbiologie et immunologie, Faculté de médecine

Ph.D. Virologie et immunologie

Functional characteristics of Nef-expressing peritoneal macrophages of CD4C/HIV^{MotG} transgenic mice with clinically no evident diseases

Dragan V. Jovanovic, Patrick Vincent, Élena Priceputu, Zaher Hanna, and Paul Jolicoeur

article soumis pour publication à Journal of immunology

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Patrick Vincent inclue cet article dans sa thèse de doctorat qui a pour titre, Étude du rôle de Nef dans l'altération de la transduction du signal chez les souris transgéniques CD4C/HIV^{Nef}

[REDACTED]
Dragan jovanovic
Coauteur

23/09/05
date

Priceputu Élena
Coauteur

9-09-05
date

Zaher Hanna
Coauteur

Sept. 9/2005
date

Paul Jolicoeur
Coauteur

7-10-05
date

[Handwritten signature]