

Université de Montréal

**Étude du mécanisme de transactivation de la protéine Vpr du virus
d'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)**

par
Janique Forget

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophia Doctor (pH.D.)
en biologie moléculaire

Décembre 1997

© Janique Forget, 1997



Cette thèse intitulée

**"Étude du mécanisme de transactivation de la
protéine Vpr du virus d'immunodéficience humaine
de type 1 (VIH-1)"**

présentée par:
Janique Forget

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

_____	président-rapporteur
Dr. Guy Lemay	
_____	directeur de recherche
Dr. Eric A. Cohen	
_____	membre du jury
Dr. Guy Boileau	
_____	examineur externe
Dr. Benoît Coulombe	

Thèse acceptée le 06.11.1998

Sommaire

La protéine Vpr fait partie du groupe des protéines accessoires du virus d'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Quatre fonctions biologiques principales ont été attribuées à cette protéine. La première, consiste en une augmentation des effets cytopathiques du virus causée par l'augmentation de la production virale. La seconde fonction de Vpr est de permettre le transport du complexe de préintégration (C.P.I.) au noyau des cellules infectées et ce, en absence de démantèlement de la membrane nucléaire. Ce phénomène associé également à la matrice et à l'intégrase est responsable de la capacité du VIH-1 à infecter les cellules quiescentes tels les macrophages. Les études indiquent cependant que Vpr augmente l'expression virale chez les macrophages par un mécanisme additionnel à celui du transport du C.P.I. La troisième fonction biologique de Vpr, récemment identifiée, est liée à la manipulation de l'environnement cellulaire causant ainsi un arrêt du cycle des cellules, des changements dans leur morphologie de même que leur mort par apoptose. Finalement, Vpr augmente l'expression de gènes rapporteurs sous le contrôle de différents promoteurs viraux dont celui du VIH-1. Le mécanisme par lequel Vpr augmente la production virale, de même que le lien entre chacune des fonctions biologiques de Vpr n'est toujours pas clair. Il est cependant possible que l'augmentation de l'expression de gènes rapporteurs en présence de Vpr reflète les phénomènes d'accélération et d'augmentation de la production virale observée chez les lymphocytes T CD4+ et les macrophages. Le lien entre chacune des fonctions biologiques reste à clarifier.

L'objectif de ce projet est de déterminer le mécanisme par lequel Vpr favorise l'expression virale. La première partie de ce projet consiste à préciser le mécanisme moléculaire d'augmentation de l'expression des gènes par Vpr et d'en déterminer l'importance pour l'expression du virus. Nous avons utilisé, pour ce faire, le modèle de transactivation de promoteurs, contrôlant l'expression d'un gène rapporteur, dans un système d'expression transitoire. Les résultats indiquent que la protéine Vpr augmente les niveaux d'ARN messager du gène rapporteur utilisé et que Vpr peut exercer sa fonction de transactivation seulement si les promoteurs possèdent un niveau élevé d'activité basale. La transactivation du LTR du VIH-1 par Vpr est observée même en présence du transactivateur majeur, la protéine Tat, reflétant ainsi l'effet positif de Vpr lors de l'infection. Par analyse mutagénique, nous avons pu établir, lors de cette étude, une corrélation entre la fonction de transactivation et celle d'arrêt du cycle cellulaire. La fonction de transactivation repose donc sur la capacité de Vpr à arrêter le cycle des cellules à l'étape G2/M. La localisation nucléaire de la

protéine Vpr n'est, cependant, pas requise pour cette fonction. Nous avons également identifié certains acides aminés de l'hélice- α centrale de même que de la région carboxy-terminale comme étant responsables de cette fonction. Ces domaines sont différents de ceux impliqués dans l'incorporation de la protéine à l'intérieur de la particule virale. L'étude présentée ici a donc permis de participer à l'identification du mécanisme par lequel Vpr augmente la production virale. Finalement, lors d'études préliminaires nous avons observé que l'arrêt du cycle cellulaire par Vpr chez les lymphocytes T infectés semble également être relié à l'augmentation de la production virale par Vpr. Cette augmentation de l'expression virale est causée par une stimulation de la transcription par Vpr. Certains résultats présentés dans cette thèse ont menés à d'autres études démontrant l'importance de Vpr dans la transcription des ARN viraux chez les lymphocytes T et chez les macrophages.

Dans la dernière partie de ce projet, nous avons évalué préliminairement l'effet de Vpr sur l'environnement cellulaire et la contribution de l'arrêt du cycle cellulaire à ce phénomène. Nous avons utilisé, à cette fin, le modèle des cellules musculaires soit les cellules de rhabdomyosarcome. Nous avons déterminé que Vpr semble causer un important changement morphologique chez les cellules de rhabdomyosarcome et perturber leur croissance en arrêtant le cycle des cellules à l'étape G2/M.

Vpr semble donc agir sur l'environnement cellulaire causant ainsi un arrêt du cycle des cellules à l'étape G2/M. Ce phénomène s'exerce chez différents types cellulaires dont les lymphocytes T et les rhabdomyosarcomes. Cet arrêt du cycle cellulaire favorise l'augmentation de l'expression des gènes viraux lorsque le LTR du VIH-1 possède un niveau élevé d'activité basale. La protéine Vpr favoriserait l'expression et la propagation du virus d'immunodéficience humaine de type 1 avant l'élimination des cellules infectées par le système immunitaire.

7. Facteurs influençant l'expression virale.....	24
7.1. Cycle cellulaire.....	24
7.1.1. Importance du cycle cellulaire dans l'infection par le VIH-1.....	27
7.2. Différenciation et maturation cellulaire.....	27
7.2.1. Importance de la différenciation des macrophages dans l'infection par le VIH-1.....	28
7.2.2. Importance de la maturation des cellules souches lymphocytaires dans l'infection par le VIH-1.....	28
8. La protéine Vpr.....	29
8.1. Structure prédite.....	30
8.2. Aspects cellulaires et biochimiques.....	30
8.2.1. Incorporation dans la particule virale.....	30
8.2.2. Localisation cellulaire.....	33
8.3. Fonctions biologiques.....	33
8.3.1. Augmentation des effets cytopathiques chez les lymphocytes T.....	33
8.3.2. Infection productive chez les macrophages.....	34
8.3.2.1. Rôle de Vpr dans le transport du complexe de pré-intégration.....	34
8.3.2.2. Rôle de Vpr dans l'expression virale.....	36
8.3.3. Modulation de l'environnement cellulaire par Vpr.....	37
8.3.3.1. Arrêt du cycle cellulaire à l'étape G2/M.....	37
8.3.3.2. Différenciation cellulaire.....	39
8.3.3.3. Induction de l'apoptose.....	42
8.3.4. Transactivation du LTR du VIH-1 et de promoteurs hétérologues.....	42
8.4. Interactions.....	44
8.4.1. Protéines virales.....	44
8.4.2. Protéines cellulaires.....	44
8.5. Autres caractéristiques.....	46
8.6. Relation structure-fonction.....	46
8.7. Importance de Vpr <i>in vivo</i>	49
9. Problématique.....	50

Chapitre 2

Matériel et méthodes.....	52
1. Génie génétique.....	53
2. Construction des vecteurs d'expression.....	53
2.1. Mutagénèse par PCR.....	55
2.2. Mutants de Vpr.....	57
2.3. Vecteurs d'expression possédant un promoteur SL3-3 muté.....	57
2.4. Clones moléculaires du VIH-1.....	58
2.5. Vecteurs d'expression du système inductible à la tétracycline.....	58
2.6. Autres vecteurs d'expression.....	61
2.7. Séquençage.....	61
3. Biologie cellulaire.....	62
3.1. Lignées cellulaires.....	62
3.2. Transfections.....	63
3.2.1. Précipité de phosphate de calcium.....	63
3.2.2. DEAE-dextran.....	63
3.3. Développement de lignées inductibles.....	64
3.3.1. Détermination des concentrations d'antibiotiques servant à la sélection.....	64
3.3.2. Isolation des clone de rhadomyosarcome exprimant Vpr.....	65
3.3.3. Induction de l'expression de Vpr.....	65
3.4. Analyse du cycle cellulaire par FACS.....	66
4. Analyse des protéines.....	66
4.1. Anticorps.....	66
4.2. Immunofluorescence indirecte.....	67
4.2.1. Vpr.....	67
4.3. Marquage métabolique.....	67
4.4. Immunoprécipitation.....	67
4.5. Chromatographie d'affinité.....	68
5. Essais enzymatiques.....	69
5.1. Essai de l'activité de la chloramphénicol acétyle transférase.....	69
6. Infections.....	70
6.1. Préparations virales.....	70

6.2. Titrage des préparations virales.....	70
6.3. Mesure de l'antigène p24.....	71
6.4. Essai de l'activité enzymatique de la Transcriptase Inverse.....	71
6.5. Infection des lymphocytes T CD4+.....	72
7. Quantification de l'ADN et l'ARN.....	72
7.1. Quantification de l'ADN.....	72
7.1.1. Isolation de l'ADN total des cellules de mammifère.....	72
7.1.2. PCR semi-quantitatif.....	72
7.2. Quantification de l'ARN.....	73
7.2.1. Isolation de l'ARN total.....	73
7.2.2. RT-PCR semi-quantitatif.....	74
7.3. Oligonucléotides servant au PCR et RT-PCR semi-quantitatif.....	75
7.4. Transfert de Southern et hybridation.....	75
7.5. Sondes.....	76
8. Réactifs utilisés.....	76

Chapitre 3

Identification du mécanisme et des domaines impliqués dans la fonction de transactivation de la protéine Vpr du virus d'immunodéficience humaine de type 1.....	78
1. Introduction.....	79
2. Objectif.....	79
3. Résultats.....	80
3.1. Les niveaux d'ARN messager du gène rapporteur CAT sont augmentés par Vpr.....	80
3.2. Un haut niveau d'activité basale du LTR du VIH-1 et du LTR SL3-3 du VLM permet la transactivation des promoteurs par Vpr.....	81
3.3. Régions de Vpr impliquées dans la fonction de transactivation.....	83
3.4. Association des protéines Vpr mutantes au facteur de transcription TFIIB.....	86
3.5. Vpr perturbe la croissance des cellules infectées et augmente la production virale chez les lymphocytes T CD4+.....	86

3.6. Vpr augmente la quantité d'ARN viral lors de l'infection des lymphocytes T CD4+	88
--------------------------------------------------------------------------------------	----

Chapitre 4

Influence de la protéine Vpr du virus d'immunodéficience humaine de type 1 sur la physiologie cellulaire	100
1. Introduction	101
2. Objectif	101
3. Résultats	102
3.1. Caractérisation des clones de rhabdomyosarcome inducibles pour l'expression de la protéine Vpr	102
3.2. Vpr semble induire un changement dans la morphologie des cellules du clone M2	102
3.3. Vpr semble perturber la croissance des cellules du clone M2	103
3.4. Vpr semble causer une accumulation des cellules du clone M2 à l'étape G2/M du cycle cellulaire	103

Chapitre 5

Discussion	114
------------	-----

Chapitre 6

Conclusions, perspectives et contributions	125
1. Conclusions et perspectives	126
2. Contribution	129

Chapitre 7

Bibliographie	130
---------------	-----

Chapitre 8

Annexe	170
--------	-----

Liste des tableaux

Chapitre 1

Tableau 1:	Différenciation des cellules du muscle squelettique du rat lors du développement.....	41
------------	---------------------------------------------------------------------------------------	----

Chapitre 3

Tableau 1:	Résumé des phénotypes et fonctions des protéines Vpr mutantes.....	97
Tableau 2:	Quantification de la production virale chez les lymphocytes T CD4+ infectés.....	98

Liste des figures

Chapitre 1

Figure 1:	Représentation schématique de la progression de l'infection par le VIH-1.....	5
Figure 2:	Le VIH-1: Organisation génomique et structure des virions.....	7
Figure 3:	Cycle de réplication du VIH-1.....	9
Figure 4:	La rétrotranscription.....	11
Figure 5:	Le LTR du VIH-1: Séquence et sites de liaison des facteurs de transcription.....	14
Figure 6:	Le cycle cellulaire.....	25
Figure 7:	Séquence et structure prédite de la protéine Vpr du VIH-1 (souche Bru/LAI).....	31
Figure 8:	Modèle du transport actif des protéines au noyau.....	35
Figure 9:	Représentation schématique des régions de Vpr responsables des différentes fonctions.....	49a

Chapitre 2

Figure 1:	Mutagenèse de <i>vpr</i>	54
Figure 2:	Expresseurs des gènes rapporteurs sous le contrôle du LTR SL3-3 virus de la leucémie murine.....	56
Figure 3:	Clones moléculaires du VIH-1.....	59

Figure 4:	Expresseurs du système inductible à la tétracycline.....	60
-----------	----------------------------------------------------------	----

Chapitre 3

Figure 1:	Transactivation du LTR du VIH-1 et du LTR SL3-3 du VLM par Vpr.....	90
Figure 2:	Analyse de l'implication du récepteur des glucocorticoides dans la fonction de transactivation de Vpr.....	91
Figure 3:	Un haut niveau d'activité basale du LTR SL3-3 du VLM permet la transactivation du promoteur par Vpr.....	92
Figure 4:	Importance du niveau basal du LTR du VIH-1 dans la fonction de transactivation de Vpr.....	93
Figure 5:	Identification des domaines de Vpr impliqués dans la fonction de transactivation.....	94
Figure 6:	Liaison des protéines Vpr mutantes à TFIIB.....	95
Figure 7:	Quantification des ARN viraux chez les lymphocytes T CD4+ infectés.....	96

Chapitre 4

Figure 1:	Analyse cinétique de l'expression de Vpr chez les clones M2 et C1.....	105
Figure 2:	Analyse de l'expression de Vpr par immunofluorescence indirecte chez le clone M2.....	106

Figure 3:	Analyse de l'expression de Vpr par immunofluorescence indirecte chez le clone C1.....	107
Figure 4:	Analyse de la morphologie cellulaire chez le clone M2	108
Figure 5:	Analyse de la morphologie cellulaire chez le clone C1	109
Figure 6:	Croissance des clones de rhabdomyosarcome.....	110
Figure 7:	Analyse du cycle cellulaire par FACS chez le clone M2	111
Figure 8:	Analyse du cycle cellulaire par FACS chez le clone C1	112

Liste des abréviations

aa	: acide aminé
ADN	: acide déoxyribonucléique
ADNc	: acide déoxyribonucléique complémentaire
Amp ^R	: gène de résistance à l'ampiciline
AP-1	: "activator protein-1"
ARN	: acide ribonucléique
ARN ^{tl} ys3	: acide ribonucléique de transfert de la lysine
α	: alpha
BSA	: "bovine serum albumin" ou albumine du sérum bovin
β	: beta
β2-AR	: sous type beta 2 du récepteur adrénergique
β-gal	: beta-galactosidase
°C	: degré celcius
¹⁴ C	: isotope 14 du carbone
CA	: protéine de la capside
CAT	: chloramphénicol acétyle transférase
CBP	: "CREB binding protein"
CDC ou cdc	: "cell division cycle"
CDK	: "cyclin dependant kinase" ou kinase dépendante des cyclines
Ci	: curie
CMV	: cytomégalovirus
CO ₂	: gaz carbonique
COUP	: "chicken ovalbumin upstream protein"
C.P.I.	: complexe de pré-intégration
cpm	: coup par minute
dATP	: déoxyadénosine triphosphate
dCTP	: déoxycytidine triphosphate
DEPC	: "diethyl pyrocarbonate"
dGTP	: déoxyguanosine triphosphate
DMEM	: "Dulbecco's modified eagle medium"
DMSO	: sulfoxyde de diméthyle
dNTP	: déoxynucléoside triphosphate
DOC	: sel de l'acide déoxycholique

DTT	: dithiotréitol
dTTP	: déoxythymidine triphosphate
DSM	: desmine
EDTA	: acide éthylène diamine tétra-acétique
EGTA	: "ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether N,N,N',N',-tetraacetic acid)"
Env	: enveloppe
FACS	: "fluorescence-activated cell sorter" (marque déposée de Becton Dickinson)
FITC	: isothiocyanate de fluorescéine
G1	: "gap 1"
GAPDH	: glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase
GDP	: guanosine diphosphate
GEF	: "guanosine exchange factor"
gp	: glycoprotéine
GR	: "glucocorticoid receptor" ou récepteur des glucocorticoïdes
GRE	: "glucocorticoid response element" ou élément de réponse aux glucocorticoïdes
GTP	: guanosine triphosphate
γ	: gamma
h.	: heure
HLH	: "helix-loop-helix" ou hélice-boucle-hélice
hyg ^R	: gène de résistance à l'hygromycine
Ig	: immunoglobuline
I- κ B	: inhibiteur de NF-kappaB
IN	: intégrase
INT	: initiateur
j.	: jour
kDa	: kiloDalton
KCl	: chlorure de potassium
κ	: kappa
LR	: "leucine/isoleucine rich region" ou région riche en leucines et isoleucines
LTR	: "long terminal repeat" ou longue terminaisons répétées
M	: molaire

M	: mitose
MA	: protéine de la matrice
MAGI	: "multinuclear activation of galactosidase indicator cells"
mg	: milligramme
MgCl ₂	: chlorure de magnésium
MgSO ₄	: sulfate de magnésium
ml	: millilitre
mm	: millimètre
mmol	: millimole
M.O.I.	: "multiplicity of infection" ou multiplicité d'infection
MOPS	: "3-(N-morpholino) propanesulfonic acid"
MPF	: "mitosis promoting factor"
μ	: micro
μCi	: microcurie
μg	: microgramme
μl	: microlitre
μM	: micromolaire
NaCl	: chlorure de sodium
NaH ₂ PO ₄	: phosphate de sodium monobasique
Na ₂ HPO ₄	: phosphate de sodium dibasique
NaOAc	: acétate d'ammonium
Nef	: "negative regulatory factor"
neo ^R	: gène de résistance à la néomycine
ng	: nanogramme
nm	: nanomètre
nM	: nanomolaire
NC	: protéine de la nucléocapside
NF-1	: "nuclear factor-1"
NFAT-1	: "nuclear factor of activated T cells-1"
NF-κB	: "nuclear factor-kappa B"
NRE	: "negative regulatory elements" ou région de régulation négative
NSI	: "non-syncitium inducing" ou non-inductrice de syncitium
nt	: nucleotides
O.M.S.	: Organisation mondiale de la santé

OriP	: origine de réplication bactérienne
³² P	: isotope 32 du phosphate
PAGE	: "polyacrylamide gel electrophoresis"
PCNA	: "proliferating cell nuclear antigen"
PBMC	: "peripheral blood mononuclear cells" ou cellules mononucléées du sang périphérique
P.B.S.	: "primer binding site" ou site de liaison de l'amorce
PBS	: "phosphate-buffered saline"
PCR	: "polymerase chain reaction" ou réaction de polymérisation en chaîne
pH	: constante d'acidité
Pi	: phosphate inorganique
PMA	: "phorbol myristate acetate" ou 12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate
pmol	: picomole
P.P.T.	: "polypurine track" ou région riche en purines
Pol	: polymérase
poly(rA)-oligo(dT)	: "polyadenylic acid pentadecathymidylic acid"
Pr	: précurseur
PR	: protéase
%	: pourcent
Rb	: rétinoblastome
Rev	: "regulator of expression of virion proteins"
RIP	: "R interacting protein"
RNase	: ribonucléase
rpm	: rotation par minute
RRE	: "Rev response element"
RSV	: "rous sarcoma virus" ou virus du sarcome de Rous
RT-PCR	: "reverse transcriptase polymerase chain reaction"
³⁵ S	: isotope 35 du soufre
SCID	: "severe combined immunodeficiency"
SDS	: sulfate dodécyle de sodium
SI	: "syncitium inducing" ou inductrice de syncitium
SIDA	: syndrome d'immunodéficience acquise

SL3-3	: promoteur lymphotropique du virus de la leucémie murine
SP1	: "stimulatory protein 1"
SU	: protéine de surface
TAR	: "trans-activation response element"
Tat	: "transactivator of transcription"
TBP	: "TATA binding protein"
TCA	: acide trichloro acétique
TCF-1 α	: "T-cell factor"
TE	: tris-EDTA
tét.	: tétracycline
tet ^R	: gène de résistance à la tétracycline
TFII	: "transcription factor II"
T.I.	: transcriptase inverse
TK	: thymidine kinase
TM	: protéine transmembranaire
TPCK	: "L-1-Tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone"
U	: unité
UBP-1	: untranslated binding protein
UNG	: "uracyl DNA glycosylase"
USF	: upstream stimulatory factor
UV	: ultraviolet
VIB	: virus d'immunodéficience bovine
Vif	: "viral infectivity factor"
VIF	: virus d'immunodéficience féline
VIH	: virus d'immunodéficience humaine
VIM	: vimentine
VIS	: virus d'immunodéficience simienne
VLM	: virus de la leucémie murine
Vpr	: "viral protein r"
Vpu	: "viral protein u"
Vpx	: "viral protein x"
VSV	: virus de la stomatite vésiculaire
VTMM	: virus de la tumeur mammaire murine
X	: facteur de dilution

Remerciements

J'aimerais remercier mon directeur de recherche, le Dr. Eric A. Cohen pour m'avoir accepté dans son laboratoire en juillet 1992. La formation que j'y ai reçue, durant ces cinq années, m'a permis d'apprendre beaucoup sur le plan scientifique mais aussi sur le plan personnel. Je remercie également le Dr. Cohen pour avoir mis à ma disposition le matériel et les réactifs nécessaires à la poursuite de mon projet.

Je remercie la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour m'avoir accepté dans le programme de doctorat en biologie moléculaire de même que pour le financement accordé de 1994 à 1997. Je remercie le Programme national de recherche et de développement en matière de santé (PNRDS) pour le financement de mes études de doctorat.

Je remercie tous les collègues de travail de jadis, pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont offert à mon arrivée. Je remercie également les collègues de travail actuels, pour leur humour et leur support moral. Un merci, tout particulier à Taoufik Mabrouk, Johanne Mercier, Josée Bergeron, Béatrice Allain, Xiao-Jian Yao, Ramu Subbramanian, Robert Lodge et Gary-Pignac Kobinger.

Mes remerciements s'adressent à tous ceux qui m'ont conseillé et qui ont participé de près ou de loin à ce projet.

Dédicace

à ma mère
à la mémoire de mon père et d'Alain

Chapitre 1
Revue de la littérature.

1. Le virus d'immunodéficience humaine.

Au début des années 1980, un nouvel agent infectieux se manifeste. Celui-ci cause une immunosuppression et dans certains cas, une dégénérescence du système nerveux central chez les individus infectés. La maladie complexe associée à l'infection par cet agent infectieux est alors nommée syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Le travail de plusieurs équipes permet de déterminer l'appartenance de ce nouvel agent infectieux au groupe des rétrovirus (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Gallo *et al.*, 1984; Levy *et al.*, 1984; Popovic *et al.*, 1984; Sarngadharan *et al.*, 1984; Schupbach *et al.*, 1984). En 1986, le nom de virus d'immunodéficience humaine (VIH) est attribué au virus responsable du SIDA par le Comité International de Taxonomie (Coffin *et al.*, 1986). Les analyses épidémiologiques de l'époque permirent de déterminer que la transmission du VIH s'effectue par contact avec les fluides séminaux ou sanguins.

Un second type de virus d'immunodéficience humaine est isolé vers 1986 soit le virus d'immunodéficience humaine de type 2 (VIH-2) (Clavel *et al.*, 1986). De semblables rétrovirus sont découverts par la suite chez le chat (virus de l'immunodéficience féline (VIF)), chez les bovins (virus de l'immunodéficience bovine (VIB)) et chez le singe (virus de l'immunodéficience simienne (VIS)).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.), en juillet 1996, environ vingt-deux millions de personnes à travers le monde étaient infectées par un des deux types de virus d'immunodéficience humaine. Plus d'un tiers de la population de l'Afrique Sub-Saharienne est infecté. L'O.M.S. prévoit qu'en l'an 2000, quarante millions d'individus auront été infectés par le VIH, dont 95%, dans les pays en voie de développement.

2. Classification.

Les membres du groupe des rétrovirus sont caractérisés par une composition structurale semblable de leur virion, par leur mode de réplication passant de l'ARN simple brin à l'ADN double brin, par la capacité du virus à s'intégrer dans le génome de la cellule hôte ainsi que par leur grande diversité génétique.

Le groupe des rétrovirus est divisé en trois sous-familles; les oncovirinae, les spumavirinae et les lentivirinae. Chacune de ces sous-familles possède des caractéristiques qui lui sont propres. L'infection par les oncovirinae cause la formation de tumeurs dû aux propriétés tumorigéniques de protéines codées par leur génome ou à l'intégration de leur génome à proximité de gènes importants à

l'équilibre cellulaire. Les pathologies associées à la sous-famille des spumavirinae sont mal connues. Une vacuolisation cellulaire est associée à l'infection mais ce phénomène ne semble pas être fatal. L'infection par le VIH cause une immunodéficience dont les symptômes ne se déclarent que plusieurs années suivant l'infection. Les membres de cette sous-famille possèdent un génome complexe codant pour plusieurs protéines responsables de la régulation de l'expression virale et de l'interaction avec l'hôte (Fields & Knipe, 1990).

3. Physiopathologie de l'infection par le VIH.

3.1. Récepteurs et co-récepteurs.

Le VIH infecte principalement les lymphocytes T et les macrophages. Ce tropisme cellulaire est causé par l'interaction entre la glycoprotéine de l'enveloppe du virus et la molécule CD4 qui est fortement exprimée chez ces cellules.

Certains types cellulaires ne possédant pas la molécule CD4 à leur surface sont tout de même infectables par le VIH. Parmi celles-ci on retrouve, les hépatocytes, les oligodendrocytes et les cellules épithéliales (Harouse *et al.*, 1989; Cao *et al.*, 1990; Cheng-Mayer *et al.*, 1990; Housset *et al.*, 1993; Tan *et al.*, 1993). L'infection des cellules du système nerveux central repose vraisemblablement sur la présence d'un glycolipide; le galactosyl céramide (Bhat *et al.*, 1991; Harouse *et al.*, 1991). Par contre, le récepteur utilisé pour la plupart des autres types cellulaires n'est pas connu.

La présence de la molécule CD4 n'est pas suffisante à l'entrée du virus dans les cellules. Par exemple, le virus ne peut infecter des cellules murines exprimant CD4 (Tersmette *et al.*, 1989). Des études récentes ont mis en évidence la présence de co-récepteurs essentiels à l'infection. Ces molécules agissent du point de vue physiologique, comme récepteur de chémokines- β (Alkhatib *et al.*, 1996; Berson *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996). Ces co-récepteurs sont différents chez les lymphocytes T et les macrophages et déterminent la capacité du virus à infecter préférentiellement un des deux types cellulaires. Ainsi, le récepteur CXCR4 (Lestr, fusine) est utilisé par le virus chez les lymphocytes T CD4+ et la molécule CCR5 est utilisée chez les macrophages. D'autres co-récepteurs ont également été identifiés (CCR2b, CCR3) (Doranz *et al.*, 1997; Moore, 1997).

3.2. Pathogénèse.

La progression de l'infection par le VIH est divisée en trois phases soit la phase aigüe, la phase asymptomatique et la phase symptomatique (SIDA) (figure 1).

La phase d'infection aigüe se caractérise par une faible chute du nombre de cellules T CD4+ ainsi que par l'apparition de symptômes s'apparentant à ceux de la mononucléose (Cooper *et al.*, 1985). Durant cette phase qui dure quelques semaines, l'individu infecté devient séropositif (Cooper *et al.*, 1985; Gaines *et al.*, 1988).

La seconde phase de l'infection est définie comme étant asymptomatique et dure une moyenne d'environ dix ans. Durant cette phase, l'individu ne montre aucun signe de maladie mais son nombre total de cellules T CD4+ diminue progressivement. Des études récentes ont démontré que bien que les individus infectés se portent bien, le virus se réplique de façon constante et les cellules T CD4+ infectées sont continuellement éliminées (Embretson *et al.*, 1993; Pantaleo *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995). La quantité totale de virus circulant a été évaluée à 1×10^{10} , dont 99% provient de cellules nouvellement infectées. La demi-vie de ces cellules n'est que de 1,6 jour (Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995; Perelson *et al.*, 1996). Les cellules éliminées sont toutefois renouvelées à partir du réservoir de cellules souches. Lorsque la fragile balance entre l'élimination des cellules T CD4+ infectées et la régénération des cellules par l'organisme est perturbée, l'individu passe alors à la phase symptomatique. Durant cette phase, apparaissent des maladies d'origine infectieuse de même que diverses tumeurs. Dans certains cas, une dégénérescence du système nerveux central est également observée. Il semble donc, qu'à toutes les phases de la maladie, y compris durant la phase définie comme asymptomatique, le virus se réplique à de hauts niveaux. Afin d'optimiser sa réplication, le virus doit donc échapper au système immunitaire et utiliser des stratégies permettant une réplication accrue avant l'élimination des cellules infectées.

L'infection des lymphocytes T CD4+ entraîne donc une diminution progressive de leur nombre et une atteinte de leurs fonctions ayant pour conséquence l'apparition d'un état d'immunosuppression. L'infection des macrophages, par contre, semble être responsable de la dissémination du virus au niveau du système nerveux central et responsable de l'apparition de souches résistantes aux inhibiteurs (Koenig *et al.*, 1986; Price *et al.*, 1988). Les macrophages pourraient également contribuer à la charge virale vers la phase symptomatique de la maladie puisque la co-infection de ces cellules par des pathogènes opportunistes augmente la production virale.

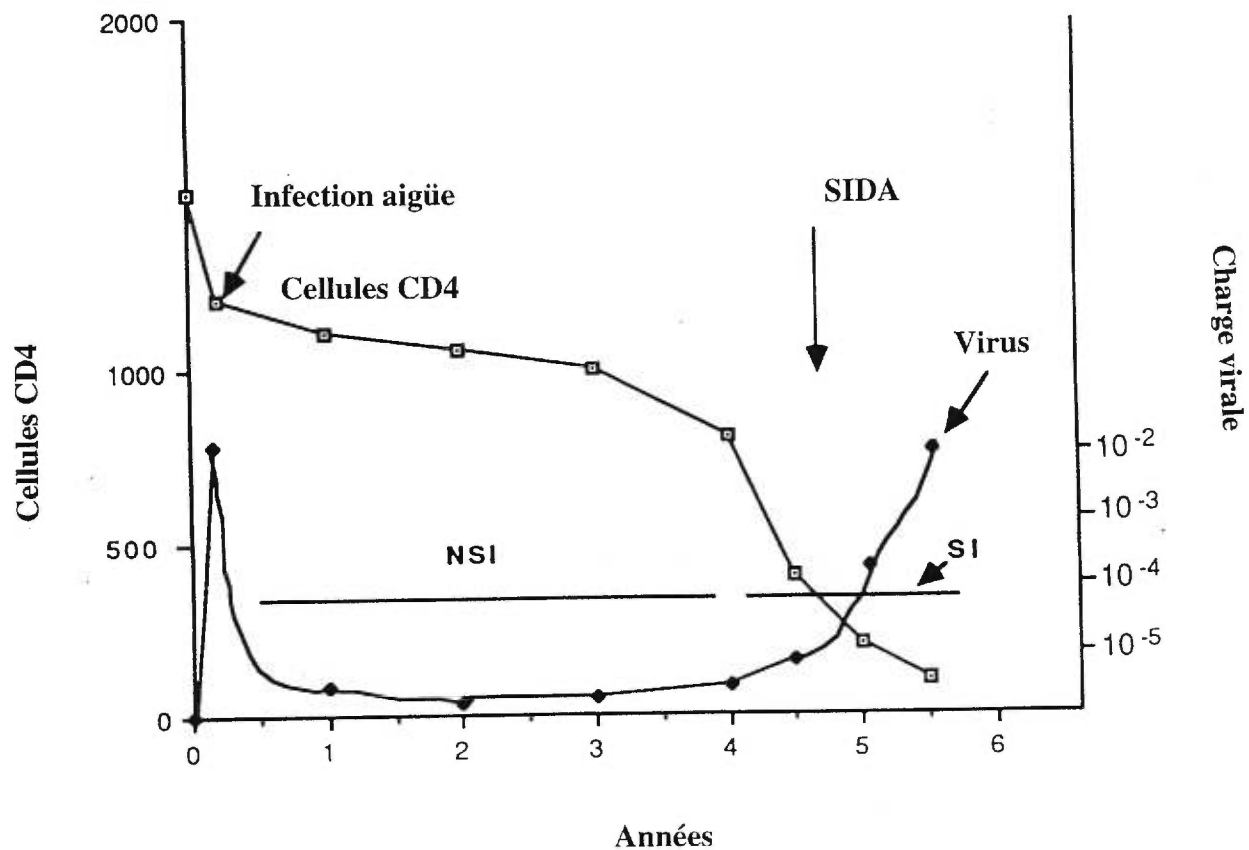


Figure 1. Représentation schématique de la progression de l'infection par le VIH-1. Durant les premières semaines de l'infection, le virus se réplique à de hauts niveaux. Cette phase appelée aiguë, correspond à la période où l'organisme monte une réponse immunitaire contre le virus. Une baisse du nombre de cellules T CD4+ est également observée. Durant la phase d'infection asymptomatique, il s'établit une balance entre la production de particules virales par les cellules infectées et leur élimination par le système immunitaire. La phase SIDA est associée à une diminution importante du nombre de cellules T CD4+ et est accompagnée par une augmentation de la charge virale. A cette phase de l'infection apparaissent plusieurs infections opportunistes et dans certains cas des cancers ou une dégénérescence du système nerveux central. La population virale retrouvée majoritairement lors des premières phases de l'infection n'induit pas la formation de syncytium (NSI). Il se produit, lors de l'apparition de la phase SIDA, un changement de cette population virale en une population pouvant maintenant induire la formation de syncytium (adapté de Antoni *et coll.* dans *Advances in Virus Research*, Vol. 43, page 55, 1994).

(Orenstein *et al.*, 1997). Les macrophages participent donc de façon significative à la pathogénèse du VIH-1.

Les études ont montré que la population virale majoritaire dans les premières phases de l'infection, démontre un tropisme pour les macrophages et les lymphocytes T CD4+ primaires (macrophage-tropique) et n'induit pas la formation de syncytium (NSI) (fusion de cellules) bien que ceci reste à confirmer. Lors de la phase symptomatique, les virus isolés de patients démontrent plutôt un tropisme pour les lymphocytes T CD4+ primaires et de lignées établies de lymphocytes T CD4+ (T-tropique) (Moore, 1997). Cette observation peut expliquer la déplétion progressive des lymphocytes T CD4+ qui s'effectue parallèlement à l'apparition des virus T-tropiques (Schuitemaker *et al.*, 1991; Schuitemaker *et al.*, 1992a; Zhu *et al.*, 1993). La capacité de l'enveloppe à utiliser un des corécepteurs plutôt que l'autre explique le tropisme préférentiel pour les macrophages ou les lymphocytes T CD4+.

4. Structure du virion et organisation génomique.

4.1. Structure du virion.

Le VIH est un virus enveloppé dont la membrane est dérivée de la couche bilipidique de la cellule hôte. En microscopie électronique, on distingue à la surface du virus, soixante-douze protubérances formées de trimères ou tétramères des glycoprotéines de l'enveloppe (Weiss *et al.*, 1984; Ozel *et al.*, 1988; Earl *et al.*, 1990). Adjacentes à la couche bilipidique, se trouvent les protéines de la matrice (MAp17) et de façon sous-jacente se trouvent les protéines de la capsid (CAp24) et de la nucléocapsid (NCp7) entourant les deux copies de l'ARN génomique. Ces deux types de protéines structurales forment la coque du virus qui est reconnaissable par sa structure conique, caractéristique des lentivirus (figure 2A). Vingt à cinquante copies des enzymes, transcriptase inverse (T.I.) , protéase (PR) et intégrase (IN) se retrouvent à l'intérieur de la coque (figure 2B). Un grand nombre de copies de la protéine Vpr se retrouve à l'intérieur de la particule virale mature (figure 2B). Quelques copies de Nef et Vif sont également présentes (figure 2B).

4.2. Organisation génomique.

Le génome du VIH-1 est fait de deux copies d'ARN monocaténaire de polarité positive, de 9.2 kilobases. Autant chez le VIH-1 que chez les autres rétrovirus, on retrouve séquentiellement sur le génome d'ARN, la région R, la région U5, la séquen-

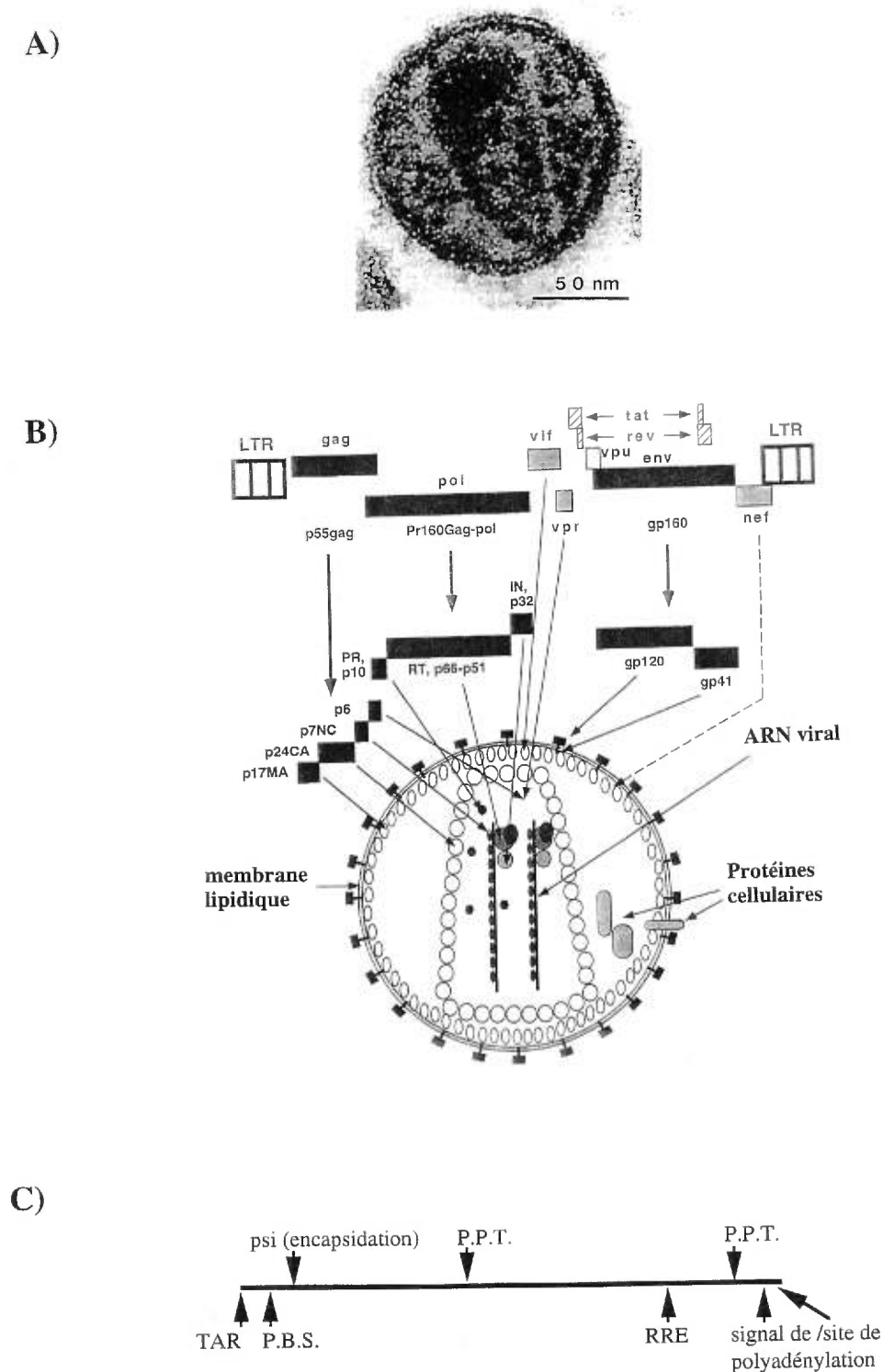


Figure 2. Le VIH-1: Organisation génomique et structure des virions. A) Morphologie de virions observée par microscopie électronique. (Nakai M. *et coll.* dans *Journal of Electron Microscopy*, Vol. 45, page 248, 1996) B) Séquence des gènes sur l'ADN proviral et organisation des protéines virales dans la particule virale. (adapté de *AIDS, Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention*, 4e édition, page 46, 1997) C) Organisation des structures secondaires de l'ARN génomique impliquées dans la rétrotranscription (P.B.S., P.P.T.), l'expression virale (TAR, RRE) et l'encapsulation.

ce des cadres de lectures, la région U3 et une seconde région R. L'ARN génomique possède donc, à ses extrémités, deux séquences identiques. L'ARN génomique contient également des structures secondaires ayant un rôle bien défini. Parmi celles-ci on retrouve, la séquence TAR (*trans*-Activation Responsive Region) située en 5' de tous les ARN viraux, les séquences d'encapsidation Psi (Ψ) situées dans la séquence de *gag* et la séquence RRE (Rev Response Element) située dans la séquence de *env* (figure 2C). Une des deux copies d'ARN génomique est transformée en ADN double brin. Ce génome d'ADN est appelé provirus.

Le génome du VIH-1 possède huit cadres de lecture ouverts (figure 2B). Le cadre de lecture de *gag* et *gag-pol* code pour les protéines structurales et les enzymes nécessaires à l'établissement de l'infection. Celles-ci sont synthétisées sous forme de précurseurs; Pr55Gag et Pr160Gag-pol dont l'initiation de la traduction débute au même ATG. Le clivage du précurseur Pr55Gag donne naissance aux protéines formant l'échaffaudage du virus soit; la matrice, la capsid, la nucléocapsid et la protéine p6 qui est unique aux lentivirus (figure 2B). Le précurseur Pr160Gag-Pol est également clivé pour donner naissance à un produit de 66kDa ou 51kDa (transcriptase inverse), un produit de 10kDa (Pr) et un produit de 32kDa (IN).

Le cadre de lecture *env* code pour des protéines structurales synthétisées sous forme de précurseur; gp160Env. Le précurseur gp160Env est clivé en deux sous-unités de 120kDa et 41kDa. La glycoprotéine de surface de 120kDa (SUgp120) et la glycoprotéine transmembranaire de 41kDa (TMgp41) s'associent de façon non-covalente.

Les six autres cadres de lecture codent pour des protéines dites auxiliaires qui sont séparées en deux groupes soit les protéines de régulation et les protéines accessoires. Les cadres de lecture *tat* et *rev* sont séparés en deux exons codant pour les protéines faisant partie du groupe des protéines de régulation; Tat et Rev. Les cadres de lecture *vif*, *vpr*, *vpu* et *nef* codent pour les protéines accessoires correspondantes; Vif, Vpr, Vpu et Nef (revues; Subbramanian & Cohen, 1994; Trono, 1995).

5. Cycle viral.

Le cycle viral du VIH est séparé en deux phases principales soit l'établissement de l'infection menant à l'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte (phases pré-intégration) et la production de particules virales infectieuses (phases post-intégration) (figure 3).

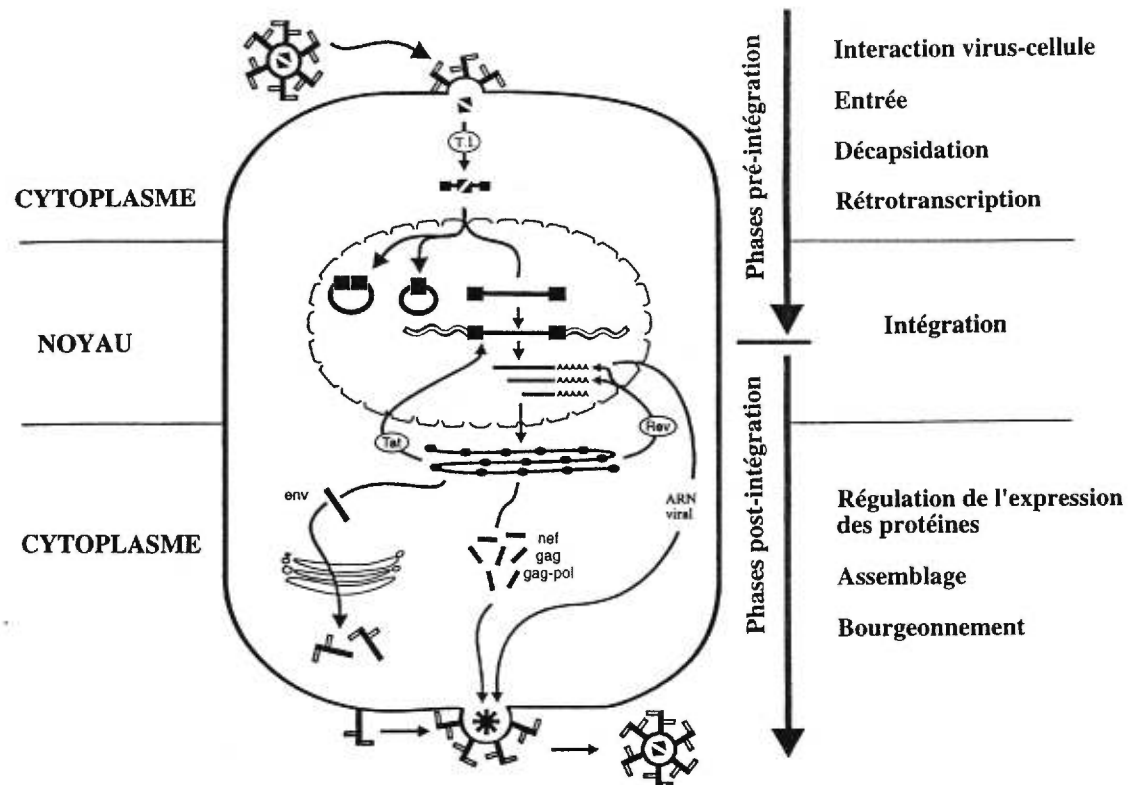


Figure 3. Cycle de réplication du VIH-1. Le cycle de réplication du VIH-1 est séparé en deux phases soit la phase pré-intégration et la phase post-intégration. L'association entre le virus et la cellule, l'entrée, la décapsidation et la rétrotranscription se produisent durant la phase pré-intégration. Pendant la phase post-intégration les protéines virales sont exprimées, assemblées et le virus est relâché suite au bourgeoisement à la membrane cytoplasmique de la cellule. (adapté de AIDS, Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention, 4e édition, page 31, 1997)

5.1. Phases pré-intégration.

L'établissement de l'infection repose sur l'accomplissement des étapes menant à l'intégration du génome viral soit, l'interaction entre le virus et la cellule, l'entrée du virus, la décapsidation, la rétrotranscription et l'intégration du génome dans la cellule hôte.

5.1.1. Interaction virus-cellule.

Suite au contact entre l'enveloppe (gp120) et le récepteur (CD4), un changement structural se produit au niveau de la glycoprotéine de surface. Ce changement entraîne la mise en évidence d'un peptide fusogénique hydrophobe présent sur la glycoprotéine transmembranaire (Gallaher, 1987; Gonzalez-Scarano *et al.*, 1987; Sattentau & Moore, 1991). Ce peptide interagirait avec une molécule distincte de CD4 (Wild *et al.*, 1992) permettant la fusion des membranes bilipidiques du virus et de la cellule. Le rôle des co-récepteurs semble lié à la fusion (Doranz *et al.*, 1997; Moore, 1997).

5.1.2. Entrée et décapsidation.

Suite à la fusion des membranes virales et cellulaires, le virus entre à l'intérieur du cytoplasme sans passer par l'intermédiaire des endosomes (Stein *et al.*, 1987). Les mécanismes régulant l'entrée du virus sont mal connus.

Les différentes étapes de la décapsidation sont également peu connues. La synthèse du provirus nécessite la présence de la transcriptase inverse. Certaines autres protéines virales restent également associées au provirus en formation (IN, MAp17, Vpr, p6) (Farnet & Haseltine, 1991; Bukrinsky *et al.*, 1993b; Heinzinger *et al.*, 1994; Gallay *et al.*, 1995). Ces protéines font partie du complexe de pré-intégration (C.P.I.).

5.1.3. Rétrotranscription.

Lors des étapes précoces de l'infection, l'ARN génomique est transformé en ADN double brin et est intégré dans le génome de la cellule hôte. Les étapes critiques menant à l'accomplissement de la rétrotranscription sont: la formation de l'ADN strong stop, le premier saut, l'élongation, l'initiation de la synthèse du brin positif et le second saut (figure 4).

Les séquences R de 97 paires de bases, répétées à chaque extrémités de l'ARN viral, jouent un rôle primordial dans la rétrotranscription. La séquence R en 5' est

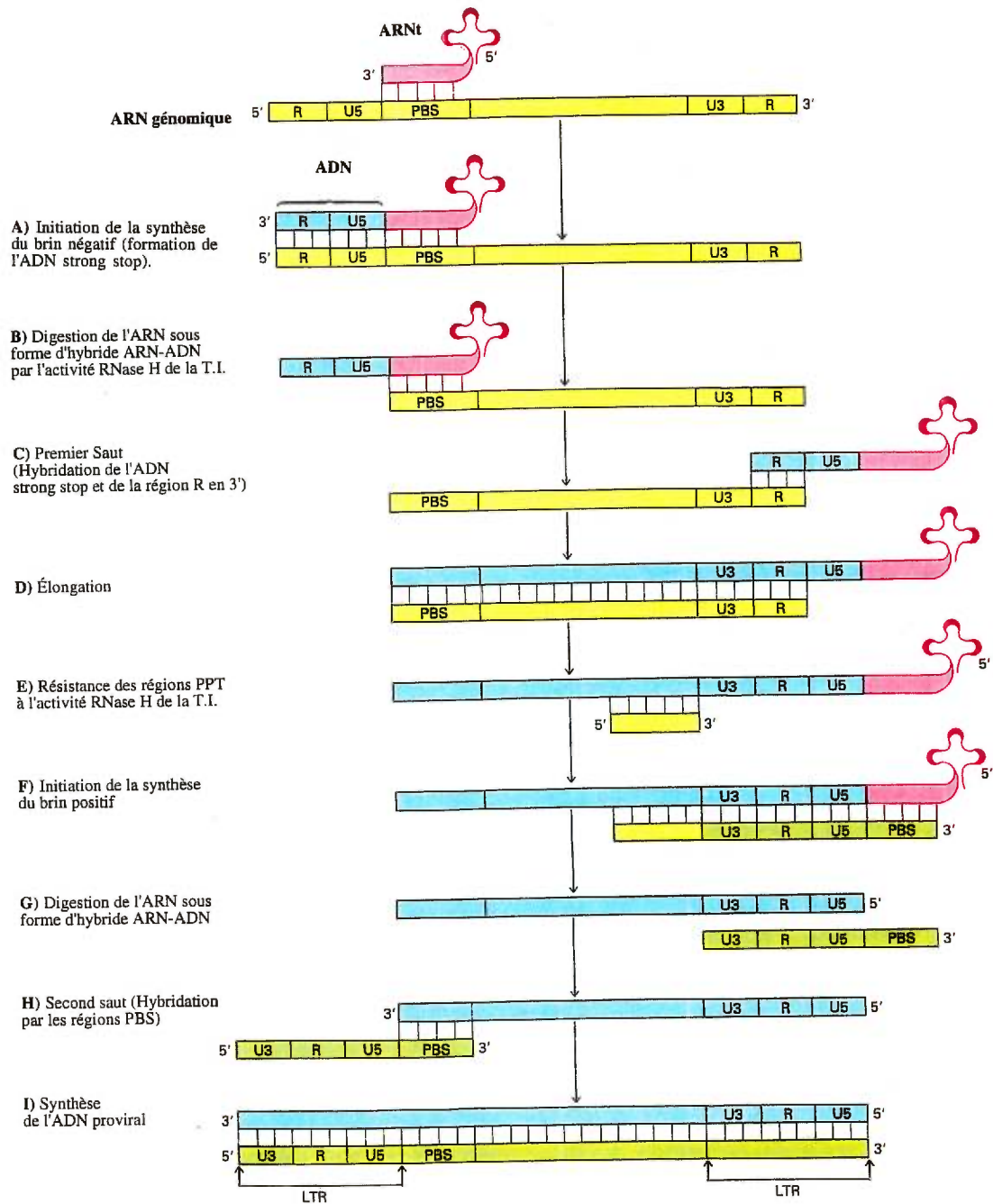


Figure 4. La rétrotranscription. L'ARN viral est transformé en ADN double brin à l'aide de l'enzyme Transcriptase Inverse (T.I.). Un ARN de transfert sert d'amorce lors de la synthèse du brin négatif. Des régions riches en purines (PPT) servent d'amorces à la synthèse du brin positif. Le produit final de la rétrotranscription possède deux extrémités répétées soit les LTR et est appelé ADN proviral. (adapté de Molecular Cell Biology, 2e édition, page 972,1990)

suivie d'une séquence de liaison à l'amorce (P.B.S) située à la frontière 3' de U5. Des régions riches en purines (P.P.T.) sont également critiques à la rétrotranscription.

L'enzyme impliqué dans la rétrotranscription est la transcriptase inverse. Celle-ci est active lorsqu'elle est sous forme d'hétérodimère (p66/p51). La transcriptase inverse peut, contrairement aux polymérases cellulaires, synthétiser de l'ADN à partir d'une matrice d'ARN (Baltimore, 1970). La transcriptase inverse possède également une activité RNaseH qui lui permet de dégrader l'ARN se trouvant sous forme d'hybride ARN-ADN ainsi qu'une activité ADN Polymérase dépendante de l'ADN.

La transcriptase inverse utilise l'ARN de transfert de la lysine (ARN^tlys³) comme amorce lors de la rétrotranscription. La rétrotranscription se produit donc vers l'extrémité 5' de l'ARN génomique formant ainsi l'ADN strong stop.

L'ADN strong stop, nouvellement synthétisé, est complémentaire à la région R en 3' de l'ARN génomique. L'ADN strong stop peut donc s'apparier avec la molécule d'ARN, cette fois, à son extrémité 3'. Cette étape, appelée premier saut est critique à l'élongation du brin négatif.

L'activité RNase H de la transcriptase inverse permet la dégradation de l'ARN ayant été rétrotranscrit. Certaines régions de l'ARN sont, par contre, moins sensibles à la dégradation. C'est le cas des régions riches en purine (P.P.T.) retrouvées dans *pol* (Charneau & Clavel, 1991) et au milieu du génome (Miller *et al.*, 1995). Ces régions servent de site d'initiation à la synthèse du brin positif. Le brin positif est synthétisé jusqu'à l'ARN de transfert qui est toujours attaché à l'ADN. Celui-ci est alors partiellement rétrotranscrit en ADN formant ainsi la séquence P.B.S.. Puisque la région complémentaire au P.B.S. a été rétrotranscrite avec le brin négatif, les deux séquences ont la possibilité de s'apparier et la rétrotranscription peut se poursuivre jusqu'à l'extrémité du génome. Cette étape est appelée; second saut. Lorsque complétée, la rétrotranscription génère donc deux régions répétées contenant la séquence U3 suivie de celle de R et de U5. Ces répétitions situées aux extrémités 5' et 3' de l'ADN proviral forment les longues terminaisons répétées (LTR). Il semble que la rétrotranscription peut débiter à l'intérieur même de la particule virale (Lori *et al.*, 1992; Trono, 1992).

5.1.4. Intégration.

L'intégration du génome viral est assurée par l'intégrase qui reconnaît et clive une séquence palindromique inversée retrouvée à chacune des extrémités du

génomique (AATG à l'extrémité de U3 et à CATT à l'extrémité de U5). Le clivage par l'intégrase entraîne la perte d'une déoxythymidine (T) sur les brins positifs et négatifs. Parallèlement, l'intégrase coupe le génome cellulaire au hasard, produisant des bouts cohésifs possédant quatre bases non-appariées. L'activité ligase de l'intégrase peut joindre les extrémités de l'ADN cellulaire et du provirus. Les nucléotides mal appariés ou non-appariés sont remplacés par la machinerie de réparation cellulaire. L'intégration cause donc la duplication de quatre paires de bases de l'ADN cellulaire et enlève une paire de bases de chaque côté du provirus (Myers *et al.*, 1989).

5.2. Phases post-intégration.

La production de particules virales infectieuses est dépendante de plusieurs facteurs, soit l'expression régulée des protéines virales, leur assemblage à la membrane et leur maturation pendant le bourgeonnement de la particule virale.

5.2.1. Expression des protéines virales.

Lors des étapes précoces, la transcription de l'ADN proviral est assurée par les protéines cellulaires. La transcription dépend donc principalement de la machinerie basale de transcription, de la présence du facteur de transcription SP1 (Stimulatory Protein 1) et de l'activation de NF- κ B. La transcription dans ces conditions est peu efficace mais assure tout de même un niveau d'expression suffisant des régulateurs importants de l'expression virale, soit Tat et Rev. Les ARN messagers issus de la transcription du génome sont de trois types. On retrouve des ARN messagers de 2 kilobases qui sont multi-épissés correspondant à la séquence de Tat, Rev et Nef, des ARN messagers de 4,3 kilobases qui sont mono-épissés correspondant principalement à Vif, Vpr, Vpu et gp160Env et des ARN messagers de 9,2 kilobases, non-épissés qui codent pour les protéines structurales et qui agissent également comme ARN génomiques.

5.2.1.1. Régulation de l'expression par les protéines cellulaires.

Le LTR contient, dans sa région U3 et R, plusieurs sites de liaison à des facteurs de transcription. La région U3 est divisée en quatre régions principales; la région TAR, la région proximale, la région distale (enhancer) et la région de régulation négative (NRE) (figure 5). Le rôle de plusieurs des facteurs de transcription liant ces régions n'est pas clairement défini (revue; Gaynor, 1992).

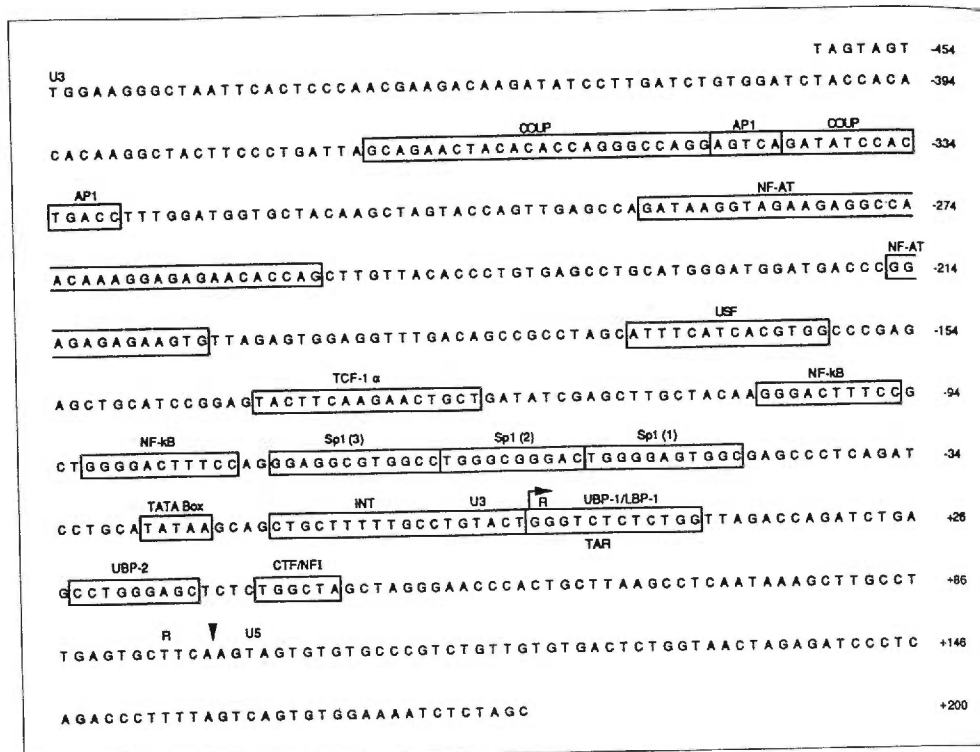
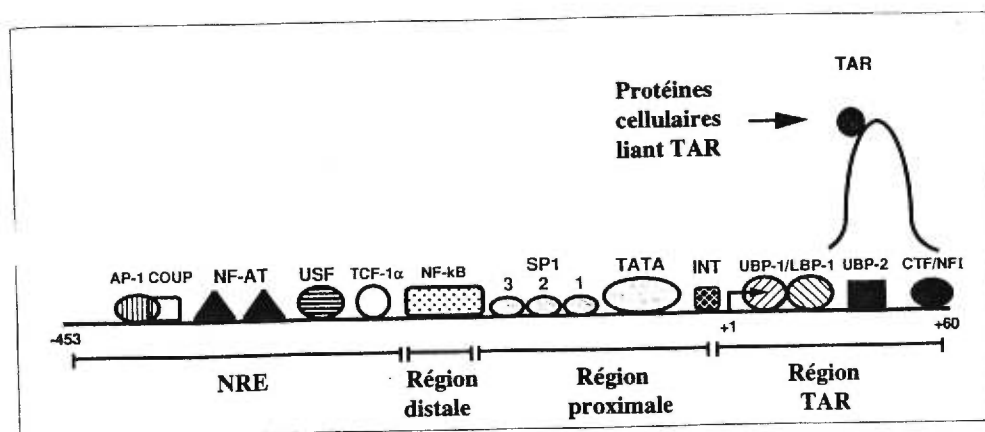


Figure 5. Le LTR du VIH-1. A) Représentation schématisée des différentes régions du LTR soit la région TAR, les régions proximales et distales et le NRE. Les facteurs de transcription impliqués dans la régulation de l'expression virale sont également représentés. B) Séquence du LTR et sites de liaison des différents facteurs de transcription. (adapté de Gaynor R., dans AIDS Vol. 6, page 352, 1992)

La séquence de liaison des protéines cellulaires est exprimée en fonction du site d'initiation de la transcription, désigné +1.

5.2.1.1.1. Région TAR.

La région d'ADN correspondant à TAR est délimitée par les séquences +1 à +60. La protéine UBP-1 possède un site de reconnaissance de haute affinité localisé dans la région -16 à +27 ainsi qu'un site de moindre affinité dans la région -38 à -16. On retrouve également, un site de liaison pour le facteur UBP-2 dans la région +28 à +36. La protéine CTF/NFI peut lier la région +41 à +46. Le rôle des protéines liant cette région est mal connu.

5.2.1.1.2. Région proximale du promoteur.

La région proximale du LTR est délimitée par les séquences -78 à -1. On retrouve, au niveau de cette région proximale, une boîte TATA ainsi que trois sites de liaison pour le facteur de transcription SP1. Cette région du promoteur est responsable de l'expression basale tel que démontré en culture cellulaire.

5.2.1.1.2.1. Machinerie basale de transcription.

La région proximale du promoteur contient une boîte TATA (TATAA) située à vingt-deux paires de bases du site d'initiation de la transcription, correspondant à une guanine. L'initiation de la transcription chez le VIH-1 se fait de manière comparable à celle des eucaryotes. La boîte TATA lie la machinerie basale de transcription par l'intermédiaire de la protéine TBP (TATA Binding Protein), une des composantes du facteur TFIID. Tout comme chez les eucaryotes, l'assemblage de la machinerie basale de transcription se fait de manière ordonnée, menant la liaison de l'ARN Polymérase II. Les facteurs TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF et TFIIH sont impliqués dans la liaison et l'activation de l'ARN Polymérase II (revues; Buratowski, 1994; Calkhoven & Ab, 1996; Fassler & Gussin, 1996).

5.2.1.1.2.2. Facteur de transcription SP1.

Plusieurs promoteurs eucaryotes contiennent une séquence riche en GC liant le facteur de transcription SP1. Ce facteur possède trois doigts de zinc, responsables de la liaison à l'ADN, ainsi que des domaines de multimérisation et d'activation de la transcription (Courey & Tjian, 1988; Pascal & Tjian, 1991). Le facteur SP1 est ubiquitaire chez les cellules eucaryotes.

La région proximale du promoteur contient une séquence riche en GC localisée entre -46 et -78. Cette séquence est capable de lier trois facteurs de transcription SP1 permettant ainsi l'activation de son expression. Ces sites identifiés 1, 2 et 3 (de 3' à 5'), ne sont pas tous équivalents. Le site 1 serait un site de faible affinité pour SP1 et ne semblerait pas requis pour l'activation du LTR (Leonard *et al.*, 1989; Parrott *et al.*, 1991; Ross *et al.*, 1991). La présence du facteur de transcription SP1 sur le LTR favoriserait la liaison d'autres facteurs de transcription (Harrich *et al.*, 1989). Les protéines SP1 et Tat peuvent agir en synergie pour la transactivation du LTR (Kamine *et al.*, 1991; Kamine & Chinnadurai, 1992). L'absence des trois sites de liaison, diminue fortement l'expression basale du virus ainsi que la transactivation par Tat (Harrich *et al.*, 1989).

5.2.1.1.2.3. Autres facteurs de transcription.

Le promoteur proximal contient également une région appelée initiateur (INT) (de -18 à +1) possédant des sites de reconnaissance pour les facteurs de transcription YY1 et TFII-I (revue; Gaynor, 1992). Par contre, aucune évidence n'implique ces facteurs dans l'initiation de la transcription du VIH.

5.2.1.1.3. Région distale du promoteur (enhancer).

La région distale (enhancer) du LTR contient deux sites de liaison au facteur de transcription NF- κ B, localisés entre les séquences -104 à -81, qui sont requis pour l'activation du LTR (revue; Gaynor, 1992).

5.2.1.1.3.1. Sites de liaison au facteur de transcription NF- κ B.

Le facteur de transcription NF- κ B est composé de deux sous-unités d'environ 50kDa (p50, p52) et de 65kDa (p65, Rel, RelB) faisant partie de la famille Rel (Baeuerle & Henkel, 1994; Siebenlist *et al.*, 1994; Thanos & Maniatis, 1995).

Sous forme inactive, le facteur NF- κ B est composé d'un homo- ou hétérodimère contenant le précurseur de la sous-unité p50, la sous-unité p65 ainsi qu'une protéine jouant le rôle d'inhibiteur; I κ B. L'activation de NF- κ B, se produit lorsque l'inhibiteur I κ B est dégradé et que le précurseur de p50 est clivé en sa forme active. Ce phénomène mettrait en évidence le signal de localisation nucléaire du complexe. Les mitogènes sont impliqués dans l'activation de la voie menant à la dégradation de I κ B et donc à l'activation de facteur de transcription.

Parmi les promoteurs cellulaires possédant des sites de liaison au facteur NF- κ B on retrouve celui de la chaîne α du récepteur de l'interleukine-2. L'activation de NF- κ B induit donc la production d'interleukine-2 et du récepteur de l'interleukine-2 impliqués dans l'activation et l'expansion clonale des lymphocytes T.

Deux sites de liaison au facteur de transcription NF- κ B se retrouvent au niveau du LTR du VIH-1. L'activation des cellules T par les mitogènes entraîne donc, par le fait même, la transcription des ARN viraux (Kaufman *et al.*, 1987; Nabel & Baltimore, 1987; Tong-Starksen *et al.*, 1987; Wu *et al.*, 1988). Le facteur NF- κ B est capable de lier le facteur SP1 favorisant ainsi l'initiation de la transcription (Perkins *et al.*, 1993).

5.2.1.1.4. Région de régulation négative (NRE).

La région du LTR en amont de la séquence -120 serait impliquée dans sa régulation négative. La délétion de cette région augmente l'expression basale ainsi que la transactivation du LTR par Tat (Demarchi *et al.*, 1993).

La région -203 à -292 possède la capacité de lier le facteur NF-AT (Crabtree, 1989). Ce facteur tout comme NF- κ B est dépendant de l'activation des lymphocytes T.

La région -235 à -276 contient un site de liaison au récepteur des glucocorticoides. Cette région est fonctionnelle dans la liaison au récepteur bien qu'elle ne contienne que la moitié de la séquence consensus de liaison (Ghosh, 1992; Kolesnitchenko & Snart, 1992).

La séquence -329 à -347 possède la capacité de lier le facteur de transcription AP-1 (dimère c-jun/c-fos). Le rôle de ce facteur de transcription dans la régulation de l'expression du virus n'est pas défini (revue; Gaynor, 1992).

Au niveau de la région négative de régulation on retrouve également des sites de liaison pour les facteurs; TCF-1 α , USF et COUP (revue; Gaynor, 1992).

5.2.1.2. Expression des protéines virales précoces.

Lors de la phase précoce de l'infection par le VIH, seul les ARN messagers ne contenant pas de RRE (multi-épissés) peuvent être traduits. Les protéines Tat, Rev et Nef sont principalement codées par ce type d'ARN messager et sont donc les premières protéines virales exprimées.

5.2.1.2.1. Nef.

La protéine Nef se trouve sous deux formes, dû à une initiation de la traduction à deux codons différents. Nef peut donc être sous forme d'une protéine de 25kDa ou de 27kDa. La protéine de 27kDa possède un domaine contenant un acide myristilique permettant l'association de la protéine à la membrane cellulaire. Des études *in vivo* ont démontré la nécessité de Nef dans l'apparition des symptômes chez les singes macaques Rhesus infectés par le virus d'immunodéficience simien; VISmac. L'absence de Nef ne semble pas, par contre, avoir d'effet restrictif sur l'apparition des symptômes ni sur la charge virale chez les singes nouveaux-nés (Baba *et al.*, 1995). La protéine Nef semble posséder trois fonctions principales. Premièrement, une fonction dans la synthèse de l'ADN proviral se reflétant sur l'infectivité du virus. Deuxièmement, une influence sur le niveau d'activation des lymphocytes T. Ce phénomène résulte de l'interaction entre Nef et des protéines agissant dans la transduction de signal (p56lck, MAPK, Lyn etc.) et par la régulation négative de l'interleukine-2. Troisièmement, un effet de régulation négative de la molécule CD4 à la surface des cellules (Geleziunas *et al.*, 1994; Ratner & Niederman, 1995; Collette *et al.*, 1997; Guatelli, 1997; Luo & Garcia, 1997).

Les protéines Tat et Rev agissent comme régulateurs de l'expression des autres protéines virales et sont essentielles à la réplication du virus (Haseltine, 1991; Wong-Staal & Haseltine, 1992; Gaynor, 1995).

5.2.1.3. Régulation de l'expression par Tat et Rev.

5.2.1.3.1. Tat.

Tat est une protéine de 16kDa qui agit comme transactivateur majeur de l'expression virale (Arya *et al.*, 1984; Sodroski *et al.*, 1985). Tat se lie à la structure en tige-boucle, TAR et permet la stimulation de la transcription (Rosen *et al.*, 1985; Muesing *et al.*, 1987; Jakobovits *et al.*, 1988). Des études de transfections transitoires ont permis de déterminer que cette stimulation résulte principalement d'une élongation des ARN messagers facilitée par la présence de Tat. Des études plus récentes ont démontré que Tat pourrait également agir comme un facteur de transcription conventionnel sur l'initiation de la transcription (Kamine *et al.*, 1991; Kamine & Chinnadurai, 1992). Le rôle de Tat dans l'infection par le VIH consiste donc en une augmentation de l'expression des protéines virales.

5.2.1.3.2. Rev.

Rev est une protéine de 19kDa contenant une région basique dans sa séquence qui est impliquée dans la liaison à l'ARN et la localisation nucléaire de la protéine (Daly *et al.*, 1989; Zapp & Green, 1989). Rev contient également un signal d'exportation nucléaire correspondant au domaine d'activation de la protéine (Fischer *et al.*, 1995; Wen *et al.*, 1995). Ce domaine est impliqué dans la liaison de Rev à une protéine associée aux pores nucléaires (Bogerd *et al.*, 1995; Stutz *et al.*, 1995). Rev lie la structure secondaire, soit le RRE qui est présent sur les ARN messagers viraux non-épissés (9,2 kilobases) et mono-épissés (4,3 kilobases) (Malim *et al.*, 1989; Zapp & Green, 1989). Grâce à son signal d'exportation nucléaire, Rev est capable d'induire la translocation vers le cytoplasme, de ces ARN messagers. La présence de Rev est donc primordiale dans la transition de la phase précoce vers la phase tardive de l'infection où les protéines structurales et les protéines accessoires sont exprimées. L'absence de RRE sur les ARN messagers multi-épissés codant pour Tat, Rev et Nef explique donc leur expression précoce.

5.2.1.4. Expression des protéines virales tardives.

Les protéines accessoires Vif, Vpu et Vpr (et/ou Vpx) sont principalement codées par des ARN messagers mono-épissés de 4,3 kilobases contenant un RRE. L'expression de ces protéines s'exerce donc tardivement d'une manière dépendante de Rev. Le rôle de la protéine Vpr dans l'infection sera analysé dans la section 8.

5.2.1.4.1. Vif.

Vif est une protéine de 23kDa qui est incorporée à faible niveau dans la particule virale (Karczewski & Strebel, 1996). La seule fonction connue de Vif est reliée principalement à l'infectivité du virus. La restriction de l'infection en absence de Vif repose sur la morphologie anormale des virion (Hoglund *et al.*, 1994; Borman *et al.*, 1995), nuisant à une des étapes menant à la synthèse de l'ADN proviral (von Schwedler *et al.*, 1993; Borman *et al.*, 1995). Certains types cellulaires peuvent produire des particules virales infectieuses en absence de Vif, indiquant qu'une ou plusieurs protéines cellulaires sont capables de compenser les fonctions de cette protéine (Volsky *et al.*, 1995).

5.2.1.4.2. Vpu.

Vpu est une protéine de 16kDa traduite à partir d'un ARN messenger bicistronique codant également pour l'enveloppe. Cette protéine est unique au VIH-1 et à la souche chimpanzé du VIS. Deux fonctions ont été attribuées à Vpu. Premièrement, Vpu augmente le relargage des particules virales diminuant ainsi la quantité d'enveloppe à la surface des cellules infectées et limitant ainsi la formation de syncytium (Klimkait *et al.*, 1990; Gottlinger *et al.*, 1993; Yao *et al.*, 1993). La présence de Vpu entraîne donc une réduction des effets cytopathiques du virus. Deuxièmement, Vpu diminue la quantité de molécules CD4 à la surface des cellules infectées en augmentant la dégradation de cette molécule au niveau du réticulum endoplasmique (Jabbar, 1995).

5.2.1.4.3. Vpx

Chez le VIH-2 et les VIS, une autre protéine est codée par le gène *vpx*. Cette protéine de 15kDa, soit Vpx, démontre une forte homologie à la protéine Vpr (Tristem *et al.*, 1990; Tristem *et al.*, 1992). Les fonctions assumées par la protéine Vpr du VIH-1 sont réparties entre Vpr et Vpx chez les souches virales où les deux cadres de lectures sont présents (Fletcher *et al.*, 1996b).

5.2.1.4.4. Protéines structurales.

Les protéines structurales Pr55Gag, Pr160Gag-pol et gp160Env sont codées à partir d'ARN messagers de pleine longueur (9,2 kilobases) et sont donc exprimées tardivement. Ces ARNm contiennent un RRE, rendant leur expression dépendante de la protéine Rev. La traduction du précurseur Pr160Gag-pol se produit grâce à un changement de cadre de lecture à l'extrémité 3' du transcrit de Gag. Ces protéines ont un rôle important dans la structure du virion et dans l'établissement de l'infection tel que décrit dans les sections précédentes.

5.2.2. Assemblage.

La traduction des précurseurs Pr55Gag et Pr160Gag-pol se produit entièrement au niveau du cytoplasme puisqu'aucun peptide signal n'est présent dans leur séquence. Ces protéines sont subséquemment ciblées à la membrane cellulaire par le domaine de la matrice contenant un acide myristilique. Les protéines précurseurs s'associent entre elles grâce au domaine de multimérisation de la capsid (Modrow *et al.*, 1994).

La traduction du précurseur gp160Env se fait par les ribosomes associés au réticulum endoplasmique. Le peptide signal du précurseur est responsable de la translocation de la polyprotéine vers le réticulum endoplasmique qui, suite à la glycosylation, est acheminée à la membrane cellulaire par la voie de sécrétion des protéines.

Afin que les composantes du virus puissent être assemblées en une particule virale complète, les glycoprotéines de l'enveloppe et les protéines précurseuses Gag doivent s'associer. Il semble que les déterminants responsables de cette reconnaissance entre Gag et l'enveloppe résident au niveau de la matrice et de la glycoprotéine transmembranaire (Cosson, 1996).

Lors de l'assemblage, deux copies de l'ARN viral sont encapsidées grâce à la séquence Psi (Ψ) située dans la séquence du gène *gag*. Les mécanismes régulant la quantité d'ARN encapsidé sont inconnus. Les protéines virales et cellulaires qui sont encapsidées de même que l'ARN génomique doivent également rejoindre le site d'assemblage à la membrane cellulaire. Cette fonction est prise en charge principalement par le précurseur Pr55Gag.

5.2.3. Bourgeonnement et maturation des particules virales.

Les mécanismes favorisant le bourgeonnement des virus sont peu connus. La maturation des protéines précurseuses Gag se produit, cependant, pendant le bourgeonnement. A cette étape les précurseurs Pr55Gag et Pr160Gag-pol se trouvent à proximité les uns des autres permettant ainsi la dimérisation de la protéase. Ce phénomène entraîne l'activation de l'enzyme qui permet le clivage des précurseurs. La protéolyse des précurseurs Pr55Gag et Pr160Gag-pol se fait de manière orchestrée par reconnaissance et coupure des sites de haute affinité avant ceux de moindre affinité.

Contrairement au précurseur Gag, la maturation du précurseur de l'enveloppe; gp160Env, s'effectue suite à sa synthèse au niveau du réticulum endoplasmique. Ce précurseur est clivé par une protéase cellulaire; la furine (Hallenberger *et al.*, 1992; Morikawa *et al.*, 1993).

La maturation des particules virales est un processus essentiel à l'infectivité.

6. Effets cytopathiques reliés au VIH-1.

La déplétion des lymphocytes T CD4+ est reliée à la cytotoxicité du virus et à leur élimination par le système immunitaire suite à l'infection. Le nombre de

lymphocytes T CD4+ éliminé est cependant plus important que le nombre de cellules infectées. Ce paradoxe tient toujours malgré les nouvelles données sur la charge virale (Ho *et al.*, 1995; Lai *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995). Une des hypothèses soulevées soutient que les cellules non-infectées peuvent être éliminées par apoptose. En plus de leur perte, il semble que la fonction des lymphocytes T CD4+ soit perturbée.

6.1. Mort des cellules infectées.

La mort des cellules infectées est causée par la présence des composantes du virus soit les protéines virales et/ou les intermédiaires de rétrotranscription qui sont soit cytotoxiques ou causent l'induction de l'apoptose. Ces affirmations découlent, cependant, d'études effectuées *in vitro* et restent à être confirmées. La reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire joue un rôle critique dans leur élimination. La mort des cellules est probablement reliée à la contribution de plusieurs de ces phénomènes.

6.1.1. Cytotoxicité et apoptose.

Deux mécanismes distincts de mort cellulaire ont été décrits. Le premier; la nécrose, est relié à des dommages tissulaires et cause le gonflement des cellules et leur éclatement. Le second mécanisme; la mort par apoptose, est une mort active de la cellule qui provoque l'activation d'endonucléases dépendantes du calcium responsables, entre autres, de la fragmentation de l'ADN génomique (Kerr *et al.*, 1972).

L'expression de l'enveloppe virale est une des causes de la mort des cellules infectées (Kornfeld *et al.*, 1988; Banda *et al.*, 1992). Ce phénomène a été observé par la mort des cellules lorsque mises en présence de gp120 soluble ainsi que par le potentiel cytotoxique du virus inactivé. Il semble que l'enveloppe cause l'induction de l'apoptose bien que cette observation soit un phénomène contesté (Horak *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1994). L'expression de la protéine Tat semble également induire l'apoptose dans un certain contexte (Purvis *et al.*, 1995). D'autres résultats indiquent cependant que Tat peut exercer un effet protecteur contre l'apoptose (Zauli *et al.*, 1993).

L'accumulation des intermédiaires d'intégration d'ADN est également toxique pour la cellule (Sonza *et al.*, 1994). Ce phénomène a été observé chez des individus démontrant des symptômes de démence associés au SIDA (Pang *et al.*, 1990).

L'accumulation de ces intermédiaires semble se faire principalement chez les cellules quiescentes (Tang *et al.*, 1992).

6.1.2. Réponse immunitaire.

Comme dans toute invasion de l'hôte par un agent étranger, le système immunitaire monte une réponse afin d'éradiquer les cellules exprimant les protéines virales. La reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques entraîne la lyse des cellules par le mécanisme associé aux perforines et granzymes ou encore par un mécanisme relié à l'apoptose impliquant la liaison de Fas et Fas ligand (Nagata & Golstein, 1995). Il semblerait que l'expression du VIH par les cellules les rende plus sensibles à l'apoptose par le mécanisme impliquant Fas et son ligand (Kobayashi *et al.*, 1990; Debatin *et al.*, 1994).

6.2. Mort des cellules non-infectées.

La mort des cellules non-infectées peut survenir par deux mécanismes soit par la fusion entre une cellule non-infectée et une cellule infectée (syncytium) ou par l'induction de la mort des cellules suite au contact avec des protéines virales libres. La disparition des cellules précurseurs des lymphocytes T CD4+ peut également expliquer la chute de la population des cellules matures.

6.2.1. Formation de syncytium.

La fusion entre des cellules infectées exprimant l'enveloppe virale et des cellules non-infectées exprimant le récepteur CD4 entraîne la fusion des cellules en une cellule géante multinucléée (Lifson *et al.*, 1986a; Lifson *et al.*, 1986b). Le cytoplasme important de ces cellules est délimité par une membrane rendue fragile par l'altération de sa perméabilité qui éventuellement conduit à la lyse du syncytium. La gp120 et la gp41 sont impliqués dans ce phénomène (Cheng-Mayer *et al.*, 1990; York-Higgins *et al.*, 1990). La formation de syncytium a été largement observée *in vitro*, principalement par l'utilisation de souches T-tropiques. L'importance de ce phénomène cytopathique *in vivo* n'est pas connu.

6.2.2. Induction de l'apoptose par les protéines virales libres.

La présence des composantes virales libres dans la circulation sanguine des individus infectés peut expliquer la mort des cellules non-infectées. *In vitro*, l'ajout de la protéine Tat recombinante aux cellules T quiescentes non-infectées entraîne leur

mort par apoptose (Li *et al.*, 1995). Il semble, en effet, que la protéine Tat puisse traverser les membranes cellulaires. Le transfert du VIH-1 des cellules infectées aux cellules non-infectées provoque également la mort par apoptose de ces dernières. Ce phénomène est dépendant de l'enveloppe mais ne requiert pas de synthèse protéique *de novo* (Maldarelli *et al.*, 1995). L'augmentation de l'expression de Fas ligand par les monocytes infectés provoque la mort des cellules T lorsque mises en contact (Badley *et al.*, 1996). Ce phénomène serait également une des causes possibles de la déplétion des lymphocytes T.

6.3. Atteinte fonctionnelle des lymphocytes T CD4+.

La liaison de l'enveloppe virale au récepteur CD4 semble interférer dans l'activation du lymphocyte T. L'infection par le VIH entraîne également une perturbation dans la sécrétion des cytokines par les lymphocytes T CD4+. Ces molécules jouent un rôle crucial dans la transmission du signal menant à la réponse immunitaire.

7. Facteurs influençant l'expression virale.

L'environnement cellulaire influence de façon importante la réplication virale. Plusieurs étapes du cycle viral, telles l'entrée, la rétrotranscription, l'intégration ou même l'expression du virus peuvent être restreintes suite à l'absence de protéines importantes à ces étapes. L'étape du cycle cellulaire à laquelle se trouve la cellule infectée de même que son niveau de différenciation et d'activation sont des facteurs importants, influençant l'enclenchement des processus menant à l'infection productive.

7.1. Cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases ordonnées, identifiées G1 (gap1), S, G2 (gap2) et M (mitose) (figure 6). Les phases G1, S et G2 font partie de l'interphase. L'ADN génomique est répliqué durant la phase S. La division de la cellule-mère en cellules-filles se produit durant la mitose. Les phases G1 et G2 sont des phases de transitions durant lesquelles la cellule s'assure qu'un nombre suffisant de protéines est exprimé et que les phases précédentes ont été complétées correctement. Une étape distincte soit la phase G0 est associée au retrait des cellules du cycle cellulaire lors de la différenciation terminale des cellules. Une étape

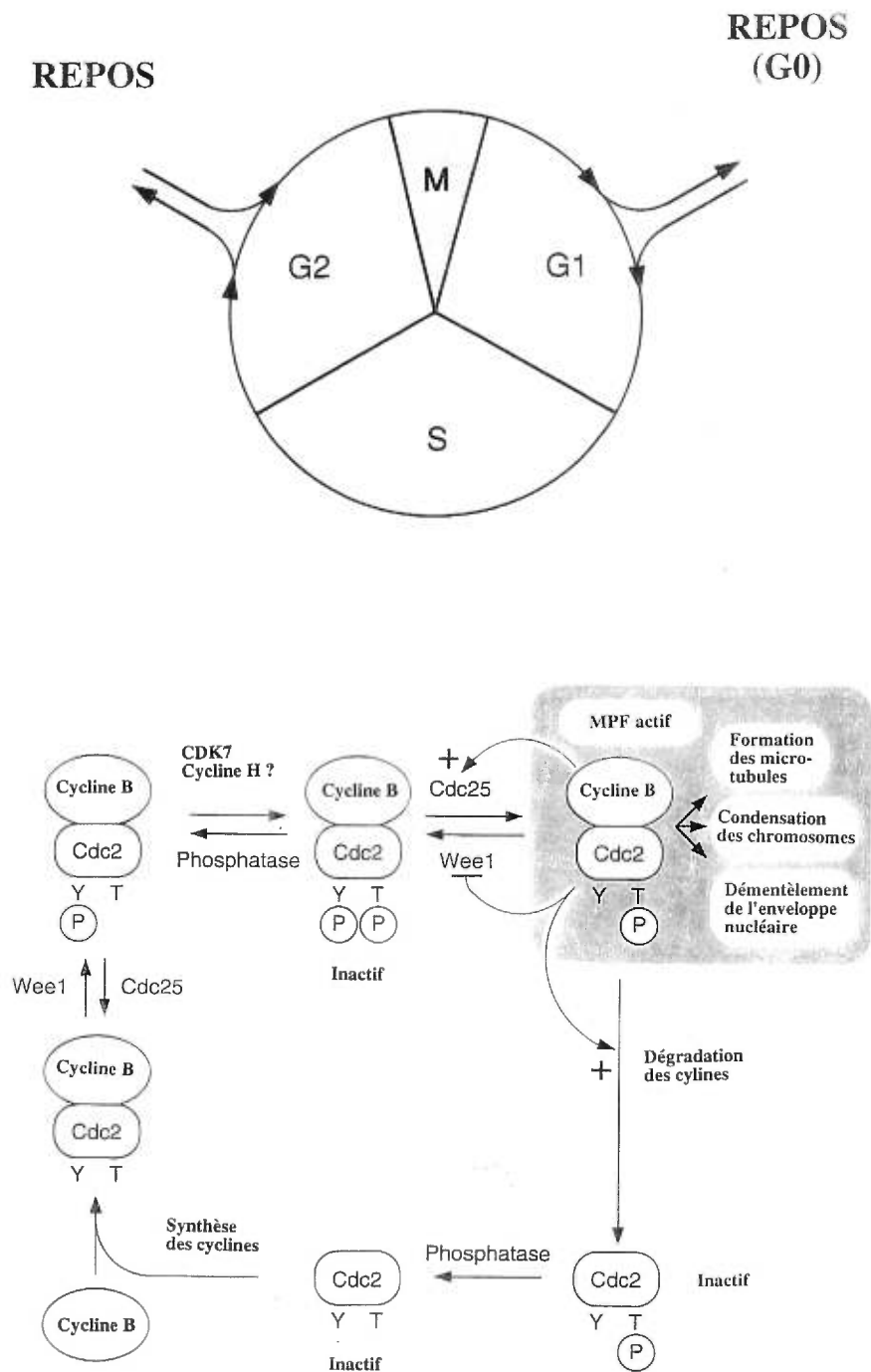


Figure 6. Le cycle cellulaire. A) Le cycle des cellules de mammifère est divisé en quatre phases. Les phases G1 et G2 sont des phases de transition pendant lesquelles la cellule se prépare à la réplication de son génome (phase S) et à la division cellulaire (phase M). B) La transition de la phase G2 à la phase M est régulée par le complexe p34CDC2et cycline B. Ce complexe devient actif ou inactif sous l'action de protéines impliquées dans la phosphorylation ou déphosphorylation de la protéine aux résidus thréonine 14 et tyrosine 15. (adapté de *The cell cycle: an introduction*, page 61, 1993)

transitoire de repos a également été identifiée lors de la phase G2 (Murray & Hunt, 1993).

La transition entre chacune des phases est régulée. Lors des phases G1 et G2, des protéines, soit les cyclines, sont synthétisées et s'accumulent dans la cellule. La présence des cyclines est essentielle à l'activité des régulateurs du cycle cellulaire soit les kinases dépendantes des cyclines (CDK). Les cyclines agissent comme sous-unités régulatrices. Plusieurs complexes CDK-cycline différents ont été identifiés à chacune des phases.

La kinase dépendante des cyclines, p34CDC2 joue un rôle primordial dans la transition de la phase G2 à M. L'activation de cette kinase est régulée à plusieurs niveaux (figure 6). Le premier niveau de régulation est assuré par l'association de p34CDC2, à la sous-unité régulatrice (cyclines B) parallèlement à sa phosphorylation par l'enzyme wee1, identifié chez la levure. Le deuxième niveau de régulation est assuré par une seconde kinase dépendante des cyclines (possiblement CDK7 associée à la cycline H) qui permet la phosphorylation de la p34CDC2 au résidu thréonine 161 (Nigg, 1995). Le dernier niveau de régulation est fournie par la protéine phosphatase; cdc25c, qui permet la déphosphorylation de la protéine aux résidus thréonine 14 et tyrosine 15. Cette dernière étape entraîne l'activation de la p34CDC2. Le complexe cycline B-p34CDC2 actif est aussi connu sous l'appellation de facteur d'activation de la mitose (mitosis promoting factor (MPF)). La kinase dépendante des cyclines devient inactive vers la fin de l'étape G2 suite à la dégradation de la sous-unité régulatrice. La kinase p34CDC2 active, phosphoryle les histones H1, les lamines, la protéine du rétinoblastome (Rb) et l'ARN Polymérase II. La phosphorylation de ces substrats permet, entre autres, l'activation de la transcription, l'assemblage du réseau des micotubules permettant la ségrégation des chromosomes et le démantèlement de la membrane nucléaire (Murray & Hunt, 1993; Nigg, 1995; Herwig & Strauss, 1997).

La progression du cycle cellulaire est perturbée suite aux dommages causés à l'ADN. Ce processus est régulé à la fin de la phase S, par la protéine p53. Cette protéine agit sur l'inhibition de la réplication en empêchant l'expression des protéine PCNA (proliferating cell nuclear antigen) nécessaires à l'activité de l'ADN Polymérase, en empêchant la progression du cycle par l'activation de la transcription d'inhibiteurs des CDK (p21) et en causant la mort des cellules par apoptose (Gartel *et al.*, 1996; Levine, 1997).

7.1.1. Importance du cycle cellulaire dans l'infection par le VIH-1.

Les cellules T quiescentes (non-activées) ne peuvent soutenir un cycle complet d'infection par le VIH-1. Les causes de cette restriction sont mal comprises mais proviennent, entre autre, d'un blocage au niveau de l'entrée du virus (Gowda *et al.*, 1989; Tang *et al.*, 1992). Certaines études ont également montré une accumulation d'ADN viral non-intégré à l'intérieur du cytoplasme (Stevenson *et al.*, 1990; Zack *et al.*, 1990). Les cellules T bloquées dans leur cycle cellulaire à la phase S, montrent également une accumulation d'ADN viral non-intégré de forme circulaire (Tang *et al.*, 1992; Sonza *et al.*, 1994). Le niveau d'activation de la cellule est donc important pour l'accomplissement du cycle viral.

L'arrêt du cycle cellulaire à l'étape G2/M ne semble pas restreindre l'infection des cellules (Bukrinsky *et al.*, 1993a; Heinzinger *et al.*, 1994). Cette particularité a principalement été démontrée par l'utilisation de cellules HeLa exprimant la molécule CD4. L'infection de cellules en absence de division cellulaire, se reflète par la capacité du VIH-1 à infecter les macrophages. Bien que certaines études aient démontré que seulement la population de macrophages se divisant puisse être infectée (Schuitemaker *et al.*, 1994), des études plus récentes infirment ces résultats (Freed *et al.*, 1997). Ces études confirment donc que l'infection des cellules par le VIH-1 ne requiert pas de division cellulaire et se produit donc sans le démantèlement de la membrane nucléaire. Les protéines de la matrice ainsi que Vpr sont impliqués dans cette propriété observée seulement chez les lentivirus et non chez les autres membres du groupe des rétrovirus (Bukrinsky *et al.*, 1992; Heinzinger *et al.*, 1994; von Schwedler *et al.*, 1994).

7.2. Différenciation et maturation cellulaire.

Les monocytes sont des cellules du sang pouvant infiltrer les tissus où ils se différencient en cellules matures, les macrophages. Ces cellules possèdent la capacité de phagocyter les agents étrangers à l'organisme et d'agir dans la présentation des antigènes. La différenciation des monocytes en macrophages *in vitro*, entraîne l'adhérence des cellules de même que des changements métaboliques dont la production de lysozymes.

Les lymphocytes sont également à des niveaux de différenciation variables dans chacun des compartiments du corps humain. Ainsi au niveau de la moelle osseuse, on retrouve les cellule souches non-différenciées. Ces cellules acquièrent leur caractère différencié au niveau du thymus alors que dans la circulation

périphérique, dans les ganglions lymphatiques et la rate, les cellules ont acquis leur fonction de présentation d'antigène et de cytotoxicité.

La susceptibilité des cellules à l'infection par le VIH est influencée par leur niveau de différenciation ou de maturation.

7.2.1. Importance de la différenciation des macrophages dans l'infection par le VIH-1.

Le niveau de différenciation des macrophages joue un rôle dans leur capacité à être infectés par le VIH. La différenciation des monocytes en macrophages peut être induite *in vitro* par la propriété d'adhérence au plastique de cette population cellulaire et qui enclenche par le fait même le processus de différenciation. Les monocytes poussés à la différenciation par cette technique sont infectés de façon productive par le VIH (Valentin *et al.*, 1991; Rich *et al.*, 1992; Schuitemaker *et al.*, 1992b). Ce phénomène met en lumière la capacité de la population de macrophages tissulaires, à contribuer de façon significative à la charge virale chez les individus infectés. Les macrophages peu différenciés (monocytes du sang) ou à un stade avancé de différenciation ne sont que peu permissifs à l'infection par le VIH et ce malgré une expression élevée de la molécule CD4 (Valentin *et al.*, 1991). Il semble donc qu'un facteur cellulaire induit durant la différenciation soit important à l'expression du virus. Le faible métabolisme des macrophages se trouvant à un stade avancé de différenciation semble également restreindre le cycle de réplication du VIH.

7.2.2. Importance de la maturation des cellules souches lymphocytaires dans l'infection par le VIH-1.

Les cellules souches des cellules hématopoïétiques retrouvées dans la moelle osseuse expriment le marqueur CD34. Plusieurs auteurs ont analysé la susceptibilité de ces cellules souches à l'infection par le VIH. Des résultats contradictoires ont été publiés. Certaines études indiquent que les cellules CD34+ sont infectées par le VIH (Folks *et al.*, 1989; Stanley *et al.*, 1992; De Luca *et al.*, 1993). D'autres études, vérifiant l'infection par amplification par PCR, indiquent que l'infection de ces cellules ne se produit que très rarement (Molina *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1991). Puisque ces cellules n'expriment pas la molécule CD4, l'infection est de toute évidence un phénomène rare comparativement aux cellules matures. Les cellules en cours de maturation au niveau du thymus expriment les deux marqueurs CD4 et CD8.

Ces cellules sont susceptibles à l'infection (Stanley *et al.*, 1992). Il semble donc que les cellules souches soient moins susceptibles que les cellules matures et que cette différence provient vraisemblablement de la présence ou non de la molécule CD4.

8. La protéine Vpr.

En 1987 un nouveau cadre de lecture potentiel, localisé entre ceux des protéines Vif et Tat, est identifié (Wong-Staal *et al.*, 1987). Suite au clonage du gène et à la production de la protéine recombinante chez *E. coli*, une reconnaissance spécifique de cette protéine par les anticorps d'individus infectés a été démontrée (Wong-Staal *et al.*, 1987). Une autre étude confirme ces résultats par l'utilisation d'un peptide synthétisé chimiquement, correspondant à la séquence de Vpr (Gras-Masse *et al.*, 1990). Les deux études ci-mentionnées montrent que 23 à 47% des individus asymptomatiques possèdent des anticorps contre Vpr. Ce nombre est de 17 à 30% chez les individus se trouvant dans la phase SIDA.

Le gène *vpr* est présent chez la majorité des souches virales du VIH-1. Chez le VIH-2 et certaines souches de VIS (VISagm, VISsm, VISmac), un autre cadre de lecture, *vpx*, codant pour une protéine homologue est présent (Tristem *et al.*, 1990; Tristem *et al.*, 1992). Il a initialement été suggéré que le gène *vpx* provient de la duplication du gène *vpr* (Tristem *et al.*, 1990; Tristem *et al.*, 1992). Une analyse phylogénétique plus récente affirme cependant que le gène *vpx* du VIH-2 et du VISsm provient du gène *vpr* du VISagm acquis suite à la recombinaison entre deux virus ayant infecté le même animal (Sharp *et al.*, 1996).

La protéine Vpr est codée par des ARN messagers mono-épissés dont l'expression dépend de Rev (Arrigo & Chen, 1991; Garrett *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1991). La protéine Vpr, de la plupart des souches virales du VIH-1, est une protéine de 96 acides aminés. Par contre, certains clones moléculaires dérivés de virus cultivés *in vitro*, présentent des mutations dans la région carboxy-terminale de *vpr* (Myers *et al.*, 1989; Lavalley & Cohen, 1993). L'insertion d'une thymidine dans la séquence de ces provirus cause un changement de cadre de lecture qui met en évidence un nouveau codon stop. Le poids moléculaire de Vpr, évalué par électrophorèse en conditions dénaturantes est de 14 à 15kDa (Ogawa *et al.*, 1989; Cohen *et al.*, 1990b).

La protéine Vpr est capable d'oligomérisation (Zhao *et al.*, 1994b). Ces analyses de filtration sur gel, indiquent que Vpr peut exister sous forme d'hexamère. L'analyse de mutants de délétion a démontré que les acides aminés 36 à 42 sont

critiques à l'oligomérisation. Cette équipe suggère que la formation du complexe s'étend jusqu'à l'acide aminé 73 puisque cette partie de la protéine est résistante à la digestion par la trypsine. Cette multimérisation a également été mise en évidence par l'utilisation du système des deux hybrides (Bogerd *et al.*, 1993).

8.1. Structure prédite.

L'analyse conformationnelle de la protéine, déduite par programmes informatiques, montre la présence d'une hélice- α dans la région amino-terminale de la protéine (Chou & Fasman, 1978; Garnier *et al.*, 1978). Cette structure secondaire s'étend des acides aminés 16 à 34 (Mahalingam *et al.*, 1995c; Mahalingam *et al.*, 1995d; Yao *et al.*, 1995) (figure 7). L'hélice- α possède d'un côté, un regroupement d'acides aminés hydrophiles et de l'autre, un regroupement d'acides aminés hydrophobes, propriété des hélice- α amphipatiques. La région comprenant les acides aminés 60 à 81 démontre une concentration importante de résidus leucine et isoleucine (figure 7). Cette région est nommée domaine riche en leucine/isoleucine (domaine LR) (Zhao *et al.*, 1994a). Cette région est capable de substituer fonctionnellement le zipper de leucine du facteur de transcription CREB (Wang *et al.*, 1996). Une deuxième hélice- α , prédite par analyse informatique est délimitée par les acides aminés 53 à 74 et chevauche ainsi le domaine LR (figure 7) (Mahalingam *et al.*, 1995b; Mahalingam *et al.*, 1997a). Une région linéaire comprenant les acides aminés 35 à 45 relierait les deux régions en hélice- α (Mahalingam *et al.*, 1995b) et servirait possiblement de région mobile permettant le positionnement des hélices (figure 7). La région carboxy-terminale de la protéine s'étend des acides aminés 71 à 96 et contient plusieurs résidus basiques (figure 7). Cette région contient deux répétitions H(S/F)RIG qui sont modérément conservées chez le VIH-2 et les VIS (Macreadie *et al.*, 1995). Les résidus glycine 75 et cystéine 76 sont hautement conservés chez la protéine Vpr des différentes souches du VIH-1 et chez les protéines Vpr et Vpx du VIH-2 et des VIS (Mahalingam *et al.*, 1995b).

8.2. Aspects cellulaires et biochimiques.

8.2.1. Incorporation dans la particule virale.

La protéine Vpr est incorporée dans la particule virale. Cette propriété a été mise en évidence suite au marquage métabolique des cellules infectées et à

l'immunoprécipitation des protéines faisant partie du virus (Cohen *et al.*, 1990a; Yuan *et al.*, 1990).

Le déterminant viral responsable de l'incorporation de Vpr dans la particule virale correspond au précurseur Pr55Gag. Ce déterminant a été identifié par introduction de mutations ou de délétions des différentes régions du provirus (Lu *et al.*, 1993; Paxton *et al.*, 1993; Lavalley *et al.*, 1994). L'analyse plus approfondie, par délétion du précurseur Pr55Gag, révèle que le domaine p6 est responsable de l'incorporation de Vpr dans la particule virale (Lu *et al.*, 1993; Paxton *et al.*, 1993). Une autre approche a permis de confirmer l'apport du domaine p6 de Pr55Gag dans l'incorporation de Vpr. La capacité de protéines chimères résultant de la fusion entre les protéines structurales du VIH-1 et du VLM (virus de la leucémie murine) à incorporer la protéine Vpr a été analysée (Kondo *et al.*, 1995). Ainsi, par mutagenèse de délétion et substitution, le motif LXXLF de l'extrémité carboxy-terminale de p6 a été impliqué dans cette fonction (Checroune *et al.*, 1995; Kondo *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1995; Kondo & Gottlinger, 1996). Le précurseur Pr55Gag en interagissant avec Vpr, permet la localisation appropriée de la protéine lors de l'assemblage de la particule virale. La protéine Vpr peut être incorporée en *trans*, c'est-à-dire sans qu'elle ne soit codée par le provirus même (Paxton *et al.*, 1993; Lavalley *et al.*, 1994). Par microscopie électronique, la co-localisation de Vpr avec les protéines de la capsid (p24) a été mise en évidence (Wang *et al.*, 1994). La présence de Vpr dans la particule virale suggère que cette protéine joue un rôle précoce dans le cycle d'infection du VIH.

Les protéines Vpr et Vpx des autres types viraux sont, elles aussi, incorporées dans les particules virales (Yu *et al.*, 1990). La protéine Vpr du VIH-2, par contre, est moins bien incorporée que Vpx (Kewalramani *et al.*, 1996). Cette différence entre le VIH-1 et le VIH-2 est relié à la courte demie-vie de la protéine Vpr chez le VIH-2 qui empêche une incorporation efficace (Kewalramani *et al.*, 1996). La région carboxy-terminale du précurseur Pr55Gag semble également être responsable de l'incorporation de Vpx (Wu *et al.*, 1994). Une association entre la capsid (p27) du VIH-2 et Vpx a également été mise en évidence par co-précipitation des deux protéines (Horton *et al.*, 1994) de même que par la présence de Vpx avec la coque purifiée (Kewalramani *et al.*, 1996).

8.2.2. Localisation cellulaire.

Afin d'identifier les cibles cellulaires sur lesquelles Vpr agit de même que son mécanisme d'incorporation, quelques équipes se sont intéressées au cheminement de Vpr à travers la cellule. Par fractionnement cellulaire et immunobuvardage, une association de Vpr aux membranes cellulaires de même que sa présence au niveau nucléaire, en absence d'autres protéines virales a été observée (Sato *et al.*, 1990). Ces résultats ont été confirmés en montrant l'association de Vpr avec la matrice nucléaire et la chromatine (Lu *et al.*, 1993). La présence de la protéine au niveau nucléaire et périnucléaire a également été observée par immunofluorescence indirecte (Lu *et al.*, 1993). Des travaux récents de notre équipe par microscopie confocale ont permis de confirmer les résultats de fractionnement cellulaire et d'immunofluorescence indirecte (Subbramanian *et al.*, 1998b). En présence des protéines virales, Vpr se retrouve principalement associé aux membranes nucléaires et cytoplasmiques (Lu *et al.*, 1993). Il semble que les interactions entre Vpr et le précurseur Pr55Gag prédomine sur la localisation nucléaire de la protéine lors de l'infection. Bien que Vpr possède la capacité de se rendre au noyau des cellules, aucun signal de localisation nucléaire typique n'est présent dans sa séquence.

8.3. Fonctions biologiques.

8.3.1. Augmentation des effets cytopathiques chez les lymphocytes T.

Une des premières fonctions biologiques associée à Vpr consiste en une augmentation dans la production virale et en une accélération de l'apparition des effets cytopathiques chez les lymphocytes T CD4+ infectés (Ogawa *et al.*, 1989; Cohen *et al.*, 1990b). Ce phénomène est observé lors de l'infection de lymphocytes primaires et de lignées de cellules T CD4+ (CEMX174) à faible multiplicité d'infection (M.O.I.) (Balliet *et al.*, 1994). D'autres équipes n'ont pu observer ce phénomène (Dedera *et al.*, 1989; Hattori *et al.*, 1990; Connor *et al.*, 1995). Il s'avère que dans un cas particulier, un clone moléculaire codant pour une protéine Vpr tronquée a été utilisé (Dedera *et al.*, 1989). La variation entre les résultats des différentes équipes semble également être reliée à la multiplicité d'infection utilisée.

Les études s'accordent à dire que la présence de Vpr n'est toutefois pas essentielle à la production et à la propagation du virus (Dedera *et al.*, 1989; Ogawa *et al.*, 1989; Cohen *et al.*, 1990b; Hattori *et al.*, 1990; Balliet *et al.*, 1994; Connor *et al.*, 1995). Par contre, les niveaux d'expression virale sont moindres et le maximum de

production virale est atteint moins rapidement. A la lumière des nouvelles données sur la demie-vie des cellules T CD4+ infectées, l'avantage que Vpr exerce sur la réplication virale peut s'avérer critique *in vivo* (Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995).

8.3.2. Infection productive chez les macrophages.

Dû à la présence de la molécule CD4 à leur surface, les monocytes et macrophages représentent une des cibles du VIH . Leur demie-vie étant plus longue que celle des lymphocytes T, l'hypothèse voulant que les macrophages servent de réservoir au virus a été émise (Embretson *et al.*, 1993; Wei *et al.*, 1995). Le rôle de Vpr dans l'infection de ces cellules a été évalué par plusieurs équipes. Les résultats obtenus indiquent que Vpr joue un rôle central dans la production virale chez les monocytes et les PBMC (peripheral blood mononucleated cell) infectés (Westervelt *et al.*, 1992). Un rôle tout aussi critique chez les monocytes différenciés en macrophages a également été mis en évidence (Balliet *et al.*, 1994). Ces résultats ont été confirmés par l'observation d'une inhibition de la réplication virale par des oligonucléotides anti-sens à la séquence de *vpr* (Balotta *et al.*, 1993). Le niveau de différenciation des monocytes/macrophages semble jouer un rôle dans l'importance de l'effet de Vpr (Connor *et al.*, 1995). Cependant, le niveau d'importance de Vpr dans l'infection des monocytes/macrophages varie entre les donneurs (Balotta *et al.*, 1993; Balliet *et al.*, 1994). La protéine Vpr du VIH-2 joue également un rôle important dans l'infection des macrophages (Hattori *et al.*, 1990).

8.3.2.1. Rôle de Vpr dans le transport du complexe de pré-intégration.

A la différence des oncorétrovirus, le VIH peut infecter des cellules en absence de division cellulaire. Le génome des oncorétrovirus ne peut s'intégrer dans celui de la cellule hôte que si la membrane nucléaire se désintègre lors de la division cellulaire (Roe *et al.*, 1993; Lewis & Emerman, 1994). Au contraire le VIH possède des déterminants lui permettant de se rendre au noyau de la cellule hôte et de s'intégrer en absence de mitose (Bukrinsky *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1992). Ces déterminants incluent les protéines de la matrice, Vpr et l'intégrase (Bukrinsky *et al.*, 1993a; Heinzinger *et al.*, 1994; Freed *et al.*, 1995; Gallay *et al.*, 1997).

Un des mécanisme de transport des macromolécules à travers la membrane nucléaire implique la voie des karyophérines (importines) (figure 8). Les protéines de la famille des karyophérines- α reconnaissent les signaux de localisation nucléaire et permettent l'association des protéines aux pores nucléaires (nucléoporines) par

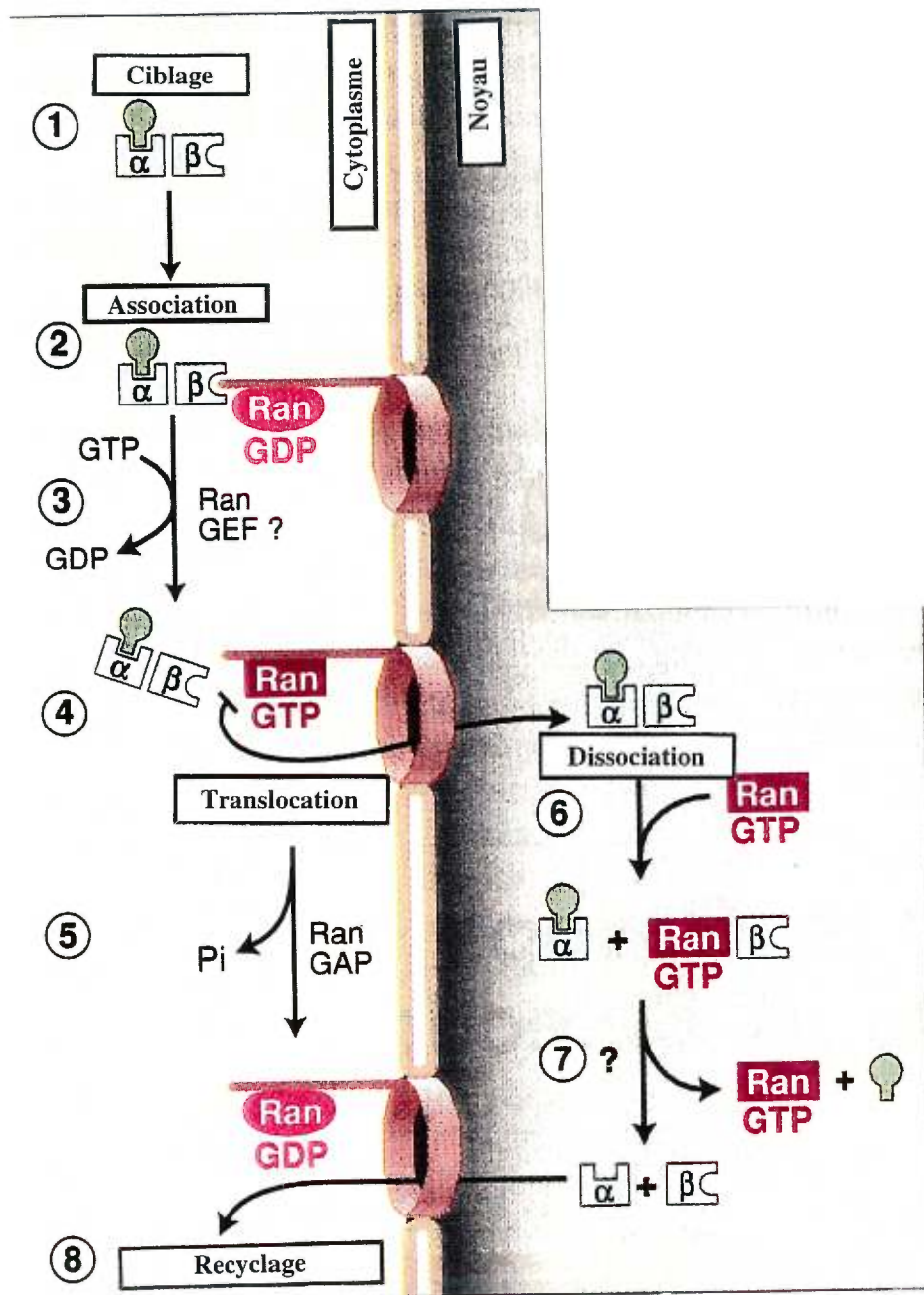


Figure 8. Modèle du transport actif des protéines au noyau des cellules. Les protéines possédant un signal de localisation nucléaire sont reconnues par les protéines de la famille des karyophérines- α qui permettent leur association aux pores nucléaires par l'intermédiaire de la karyophérine- β . Le transport à travers la membrane nucléaire est pris en charge par une petite protéine dépendante du GTP, la protéine RAN. Le transport actif demande l'hydrolyse du GTP en GDP. Les protéines du système de transport actif sont utilisées à nouveau pour des rondes successives de transport. (adapté de Goldfarb, D.S. dans Science, Vol. 276, page 1815, 1997)

l'intermédiaire de la karyophérine- β (Hurt, 1996). Le transport à travers les pores nucléaires est pris en charge par une petite protéine dépendante du GTP, la protéine Ran (Goldfarb, 1997). Ce transport actif permet la localisation nucléaire du complexe protéine-karyophérines-Ran. Les protéines impliquées sont recyclées et réinitient une seconde ronde de transport (figure 8).

Le rôle critique de Vpr dans l'infection des macrophages a été mieux compris par les études de Heinzinger et collaborateurs (1994). En effet, Vpr permet le transport du C.P.I. vers le noyau des cellules (Heinzinger *et al.*, 1994). Le mécanisme par lequel Vpr y parvient est, cependant, méconnu. Vpr ne contient pas de signal de localisation nucléaire typique et ce mécanisme semble indépendant des karyophérines (Gallay *et al.*, 1996).

Le second déterminant impliqué dans le transport du C.P.I. est fourni par la protéine de la matrice. Grâce à son signal de localisation nucléaire, cette protéine entraîne le C.P.I. vers le noyau des cellules infectées (Bukrinsky *et al.*, 1993a; Freed *et al.*, 1995). Le signal de localisation nucléaire de la matrice, composé d'acides aminés basiques, est reconnu par la karyophérine- $\alpha 2$ (Gallay *et al.*, 1996). La matrice emprunte donc cette voie de transport actif afin d'assurer la localisation nucléaire du C.P.I.. Puisque la matrice possède un acide myristilique lui permettant également une association aux membranes, la distinction entre ces signaux contraires a été analysée. Il semble que la phosphorylation de la matrice soit impliquée dans la capacité de la protéine à se rendre au noyau (Gallay *et al.*, 1995). La phosphorylation de la matrice au résidu tyrosine 131 par une kinase cellulaire associée au virus, permet son association à l'intégrase et assure ainsi sa présence au niveau du C.P.I. (Gallay *et al.*, 1995). Cependant l'implication de la matrice dans le transport du C.P.I. est fortement controversée.

Une étude récente a permis l'identification d'un troisième déterminant provenant d'un signal de localisation nucléaire localisé dans l'intégrase (Gallay *et al.*, 1997). La matrice semble également emprunter la voie des karyophérines lors du transport du C.P.I.

8.3.2.2. Rôle de Vpr dans l'expression virale.

Le transport du C.P.I. doit se produire avant toute synthèse de protéines virales. Ainsi, cette fonction ne peut être prise en charge que par la protéine Vpr déjà présente dans la particule virale. Le rôle de la protéine Vpr fournie par la particule virale dans cette fonction a été analysé (Connor *et al.*, 1995). Le clone moléculaire

utilisé, lors de cette étude, ne possède pas de cadre de lecture ouvert pour Vpr et la présence de la protéine Vpr est assurée par un expresseur. Les virus produits par co-transfection incorporent donc la protéine Vpr mais celle-ci n'est pas synthétisée *de novo* lors des étapes tardives de l'infection. Cette technique permet donc de séparer le rôle de la protéine Vpr fournie par le virus de celui de la protéine Vpr synthétisée *de novo*. Ainsi, il a été déterminé que la protéine Vpr fournie par la particule virale ne suffit pas à l'infection productive des macrophages (Connor *et al.*, 1995). La protéine synthétisée *de novo* joue donc un rôle important dans l'infection de ces cellules. L'infection des macrophages requiert donc la facilitation d'une étape tardive (suivant l'intégration) par la protéine Vpr synthétisée *de novo* (Connor *et al.*, 1995).

8.3.3. Modulation de l'environnement cellulaire par Vpr.

8.3.3.1. Arrêt du cycle cellulaire à l'étape G2/M.

L'absence de Vpr dans l'infection des lymphocytes T CD4+ (MT-4) permet la survie des cellules de même que la persistance de l'infection (Nishino *et al.*, 1991). Le même phénomène est observé chez une autre lignée de lymphocytes T CD4+ (H9) (Mustafa & Robinson, 1993). La capacité du virus à établir la persistance est également associée à des mutations au niveau du gène *vpr* (Nishino *et al.*, 1994; Planelles *et al.*, 1995; Rogel *et al.*, 1995). De plus, *in vivo*, le gène *vpr* des virus isolés des PBMCs d'individus infectés est souvent muté (Nakaya *et al.*, 1994). Il semble donc que la présence de Vpr empêche la survie des cellules. Plusieurs équipes ont par ailleurs démontré, par des essais de transfection transitoire, que la protéine Vpr empêche la croissance des cellules (Planelles *et al.*, 1995; Rogel *et al.*, 1995). Ce phénomène est relié à une accumulation à l'étape G2/M du cycle cellulaire induite par la protéine (Planelles *et al.*, 1995; Rogel *et al.*, 1995).

Le mécanisme par lequel Vpr induit l'arrêt de croissance a été analysé plus en détail. Ainsi, l'arrêt du cycle cellulaire à l'étape G2/M induit par Vpr s'exerce également dans un contexte d'infection de lignées cellulaires et de cellules primaires (Jowett *et al.*, 1995). Cet arrêt est observable en expression transitoire avec des cellules d'origine simienne (COS, CV-1) et d'origine humaine (HeLa). Par contre, les cellules d'origine murine ne répondent pas à l'effet cytostatique de Vpr (Jowett *et al.*, 1995). Le blocage dans la progression du cycle cellulaire est causé par l'hyperphosphorylation de la kinase dépendante des cyclines; p34CDC2 (Jowett *et al.*, 1995). Ce phénomène entraîne l'inactivation de cet important régulateur du cycle

cellulaire. L'inactivation de la p34CDC2 par Vpr a été confirmée par plusieurs autres équipes (He *et al.*, 1995; Re *et al.*, 1995). La protéine cdc25C, un régulateur de l'activité de la p34CDC2, est également inhibée par hypophosphorylation. Ces études démontrent que la cible de Vpr dans l'arrêt du cycle cellulaire agit en amont de la cascade menant à la régulation de la protéine cdc25C. L'utilisation d'inhibiteurs de phosphatase, tel l'acide okadaïque, permet d'inhiber l'action de Vpr sur le cycle cellulaire. Il semble donc qu'une phosphatase serait la cible même de Vpr ou serait impliquée dans la cascade menant à l'arrêt du cycle cellulaire induit par Vpr (Re *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1996).

Chez les groupes de virus possédant les gènes *vpr* et *vpx*, la fonction d'arrêt du cycle cellulaire est prise en charge par la protéine Vpr (Di Marzio *et al.*, 1995a; Planelles *et al.*, 1995; Re *et al.*, 1995; Fletcher *et al.*, 1996b). La fonction d'arrêt du cycle possède un certain niveau de spécificité. En général, la protéine Vpr des virus d'immunodéficience simienne n'arrête que le cycle des cellules simiennes, alors que la protéine Vpr des virus d'immunodéficience humaine agit sur les cellules humaines et simiennes (Jowett *et al.*, 1995; Planelles *et al.*, 1996; Stivahtis *et al.*, 1997). La protéine Vpr du VIH-2, par contre, ne cause pas un arrêt du cycle cellulaire aussi dramatique que la protéine Vpr du VIH-1 (Kewalramani *et al.*, 1996; Planelles *et al.*, 1996). La stabilité moindre de la protéine Vpr du VIH-2 semble être la cause de cette différence (Kewalramani *et al.*, 1996).

En plus des cellules de mammifères, Vpr perturbe le métabolisme des levures (Macreadie *et al.*, 1995; Macreadie *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1997; Macreadie *et al.*, 1997). L'expression de Vpr dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* cause un arrêt de leur croissance, une augmentation de leur volume ainsi qu'une augmentation de leur sensibilité osmotique causant la destruction du réseau d'actine. Des peptides dérivés de la séquence de Vpr causent ces mêmes phénotypes chez plusieurs souches de levure comprenant: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans* et *Schizosaccharomyces pombe* (Macreadie *et al.*, 1996). L'hyperphosphorylation de p34CDC2 et l'arrêt à l'étape G2/M a également été observé chez *Schizosaccharomyces pombe* (Zhao *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997). Vpr perturbe également la croissance des cellules procaryotes (Bodeus *et al.*, 1997).

L'avantage de l'arrêt du cycle cellulaire lors de l'infection par le VIH est mal comprise. Plusieurs hypothèses pouvant expliquer cette fonction de Vpr ont cependant été suggérées (Emerman, 1996). Une de ces hypothèses est que l'arrêt du

cycle cellulaire à l'étape G2/M permettrait une meilleure expression des protéines virales. Puisque les cellules exprimant Vpr deviennent polyploïdes, le nombre de copies du génome viral par cellule est augmenté (Re *et al.*, 1995; Bartz *et al.*, 1996). *In vivo*, les cellules infectées ont une demie-vie courte et la présence de Vpr maximiserait l'expression du virus dans ce temps restreint. Cette hypothèse n'a, par contre, pas été vérifiée. Une autre hypothèse émise par Emerman suggère que l'infection des cellules en absence de division peut nécessiter cette étape précise du cycle cellulaire. La dernière hypothèse, repose sur le fait que l'inactivation de la kinase p34CDC2 entraîne une certaine protection des cellules envers l'apoptose induite par la réponse des lymphocytes T cytotoxiques (Chen *et al.*, 1995; Greenberg & Litchfield, 1995). Du point de vue pratique, certains chercheurs ont déjà entrevu la possibilité d'exploiter la fonction d'arrêt du cycle cellulaire induite par Vpr en l'utilisant comme agent suppresseur de tumeurs (Mahalingam *et al.*, 1997b).

8.3.3.2. Différenciation cellulaire.

L'expression de Vpr dans des cellules de rhabdomyosarcome et d'ostéosarcome entraîne un changement de leur morphologie (Levy *et al.*, 1993). Cet effet est le résultat de l'expression de la protéine Vpr seule mais est également observé en présence des autres protéines virales. L'expression de la myosine dans les cellules de type musculaire démontrant des changements morphologiques, associe Vpr à l'induction de la différenciation musculaire.

La différenciation des cellules en myocytes est contrôlée par les protéines de la famille hélice-boucle-hélice (HLH) à laquelle appartient la protéine MyoD (Braun *et al.*, 1989). Celles-ci sont en effet, responsables de l'activation transcriptionnelle des gènes déterminant le caractère musculaire d'une cellule (Murre *et al.*, 1989; Lassar *et al.*, 1991). Les protéines de la famille HLH contiennent deux régions fonctionnelles. La première est une région basique capable de lier une séquence palindromique d'ADN (CANNTG) (Tapscott *et al.*, 1988; Lassar *et al.*, 1989). La seconde est la région hélice-boucle-hélice même, qui est impliquée dans l'homo ou l'hétérodimérisation des protéines (Murre *et al.*, 1989; Davis *et al.*, 1990; Voronova & Baltimore, 1990). La liaison à l'ADN dépend de la dimérisation de la protéine et permet l'activation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la différenciation (créatine kinase musculaire, myogénine, MRF4). Du point de vue phénotypique, l'activation du processus de différenciation musculaire produit généralement l'allongement des cellules en fuseau lors des étapes précoces et entraîne la fusion des

myocytes en une cellule géante multinuclée (myotube) lors des étapes tardives de différenciation. Du point de vue immunohistochimique, les filaments intermédiaires; vimentine et desmine sont les premiers marqueurs associés à la différenciation musculaire. L'initiation de la différenciation terminale de ces cellules est associée à l'expression des actines- α (actine- α du muscle lisse et sarcomérique) et de la myosine (Babai *et al.*, 1990) (tableau 1).

La régulation de la différenciation musculaire s'exerce par l'inhibition des activateurs transcriptionnels se trouvant au niveau cytoplasmique. Ainsi, la régulation de l'action de MyoD se produit par l'association à la protéine Id (Benezra *et al.*, 1990). Celle-ci possède le domaine de dimérisation, hélice-boucle-hélice, mais ne possède pas le domaine de liaison à l'ADN. Le dimère ainsi formé est donc non-fonctionnel.

La différenciation cellulaire requiert un arrêt de croissance définitif des cellules. Cet état de quiescence correspond à la phase G0 du cycle cellulaire. La différenciation et l'arrêt de croissance doivent donc être intimement couplés. Le contrôle de ces deux phénomènes est assuré, entre autre, par la protéine du rétinoblastome. De hauts niveaux de protéines Rb actives (hypophosphorylées) sont en effet retrouvés dans les cellules musculaires différenciées (Coppola *et al.*, 1990; Endo & Goto, 1992; Gu *et al.*, 1993a). Ce n'est que tout récemment que le mécanisme de régulation du cycle cellulaire menant à la différenciation a été mieux compris. La protéine MyoD est responsable de l'activation transcriptionnelle d'un important régulateur du cycle cellulaire (Halevy *et al.*, 1995). Cette protéine; la p21, est impliquée dans l'inhibition de l'activité des kinases dépendantes des cyclines (el-Deiry *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1993b; Harper *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 1993). L'activité inhibitrice de p21 sur les CDK permet de garder Rb sous sa forme hypophosphorylée (Sherr, 1993; Sherr, 1994). Il semblerait également que MyoD soit régulée de façon négative par les CDK (Skapek *et al.*, 1995). La régulation de MyoD lors du cycle cellulaire contrôle donc l'enclenchement des processus de différenciation.

Il est possible que Vpr agisse sur la différenciation des cellules de rhabdomyosarcome par la modulation du cycle cellulaire en interagissant avec les facteurs de transcription myogéniques tel MyoD, ou en modulant les régulateurs du cycle cellulaire tels p34CDC2 ou p21. La relation entre la capacité de Vpr à causer l'arrêt du cycle et à induire la différenciation n'a été que tout récemment démontrée (Mahalingam *et al.*, 1997a). Ainsi l'enclenchement du processus de différenciation

Type	Marqueur #	Aspect morphologique	Etape de différenciation
Mesoblaste (somite)			Cellule souche
Pré-myoblaste	VIM+		Différenciation initiale
Myoblaste de type 1	VIM+ * DSM+		
Myoblaste de type 2 (rhabdomyoblaste)	VIM+ * DSM+ alpha-sr+ alpha-sm+		Différenciation terminale
Myotube type 1 (myocyte multinucléé)	VIM+ DSM+ alpha-sr+ alpha-sm+ *		Fusion cellulaire
Myotube de type 2	VIM- DSM+ alpha-sr+ alpha-sm+ *		Maturation
Myofibre	DSM+ alpha-sr+		Cellule mature

déterminé par immunohistochimie, VIM: Vimentine, DSM: desmine, alpha-sr: actine alpha sarcomérique, alpha-sm: actine alpha du muscle lisse, * diminution, + marqueur positif, - marqueur négatif, cellule en division.

Tableau 1. Différenciation des cellules du muscle squelettique du rat lors du développement. Les cellules musculaires passent par plusieurs stades de différenciation (mésoblaste, pré-myoblaste, myoblaste, myotube et myofibre) avant leur maturation finale. Ces stades sont associés à l'expression de protéines structurales de la cellule (vimentine, desmine) et de protéines impliquées dans la fonction musculaire (actine-alpha sarcomérique et actine-alpha du muscle lisse. (adapté de Babaï F. et coll. dans Differentiation, Vol. 44, pages 132-142, 1990)

montre, tout comme l'arrêt à l'étape G2/M, une augmentation de la ploïdie des cellules de rhabdomyosarcome. Ces études démontrent donc que Vpr agit sur le métabolisme cellulaire en causant un effet cytostatique qui permet la différenciation des cellules.

8.3.3.3. Induction de l'apoptose.

L'arrêt du cycle cellulaire à l'étape G2/M causé par Vpr est indépendant de p53. Cette fonction de Vpr est, en effet, observée dans les cellules Jurkat où le gène *p53* est muté (Bartz *et al.*, 1996). L'arrêt du cycle cellulaire par Vpr est également observé dans des cellules ne réagissant pas aux dommages à l'ADN (cellules de patients atteints d'ataxia-telangiectasia) et ne peut être inhibé par des agents permettant la progression du cycle suite à ce type de dommages (Bartz *et al.*, 1996). Ces études indiquent que l'arrêt du cycle cellulaire par Vpr n'est pas reliée aux dommages à l'ADN et est donc indépendant de la mort par apoptose. Cependant, une autre étude démontre que la mort des cellules par apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire semblent causés par un mécanisme semblable à celui induit lors de dommages à l'ADN (Stewart *et al.*, 1997). La différence entre les résultats de ces deux équipes provient vraisemblablement de la courte période où le phénomène d'apoptose est observable. Une induction de l'apoptose par la protéine Vpr recombinante, ajoutée au milieu de culture des cellules, a également été observée (Ayyavoo *et al.*, 1997a). Ces études ont permis d'envisager l'éventualité d'une induction de l'apoptose par Vpr chez les lymphocytes T lors de l'infection (Ayyavoo *et al.*, 1997a; Stewart *et al.*, 1997). Il semble que les glucocorticoïdes agissent par un mécanisme semblable à celui de Vpr (Beg & Baltimore, 1996; Van Antwerp *et al.*, 1996).

8.3.4. Transactivation du LTR du VIH-1 et de promoteurs viraux hétérologues.

Les premières analyses effectuées par le groupe de Cohen et collaborateurs ont attribué à Vpr un rôle dans la transactivation du LTR du VIH-1 (Cohen *et al.*, 1990b). Des lymphocytes T (Jurkat) ont été co-transfectés de façon transitoire avec un expresseur de Vpr et un expresseur du gène rapporteur de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) sous le contrôle du LTR du VIH-1. Cette équipe a pu mettre en évidence ainsi, une augmentation de trois fois l'activité de la protéine CAT par Vpr. L'augmentation de l'activité de la protéine CAT mesure indirectement l'augmentation de son expression (Gorman *et al.*, 1982). La délétion de la région distale du promoteur, de la région TAR ou de la région NRE n'entrave, ni ne diminue

la capacité de Vpr à transactiver (Cohen *et al.*, 1990b; Agostini *et al.*, 1996). Il semble donc que la région du LTR du VIH-1 répondant à l'action de Vpr ne soit pas contenue dans ces éléments.

La fonction de transactivation n'est pas seulement restreinte au LTR du VIH-1 mais est observée pour plusieurs autres promoteurs viraux tels le LTR du VIH-2, le LTR de HTLV-1 (human T-cell leukemia virus), celui du virus du sarcome de Rous (RSV) et le LTR SL3-3 du rétrovirus de la leucémie murine (LTR SL3-3 du VLM) ainsi que le promoteur du cytomégalo virus (CMV) (Cohen *et al.*, 1990b). Une augmentation de dix fois l'activité CAT est observée en présence de Vpr lorsque le gène *CAT* est sous le contrôle du LTR SL3-3 du VLM (Cohen *et al.*, 1990b). Le LTR SL3-3 du VLM est donc le promoteur qui est transactivé le plus fortement par Vpr.

Le phénomène de transactivation du LTR du VIH-1 est observé également dans des essais *in vitro* (Wang *et al.*, 1995). Dans ce contexte, le facteur SP1 joue un rôle important dans la transactivation du LTR par Vpr (Wang *et al.*, 1995). Vpr peut, de plus, coopérer avec les facteurs E1A, VP16 et SP1 sous forme de fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal4 pour la transactivation d'un promoteur chimère (Agostini *et al.*, 1996). Les raisons de la propension de Vpr à transactiver une variété de promoteurs ni le mécanisme par lequel la transactivation s'effectue ne sont connus. Ainsi, jusqu'ici, les études n'ont pas clarifié l'influence de Vpr sur la transcription, la traduction ou encore sur la stabilisation des acides nucléiques. Le manque de spécificité de son action n'a également pas été expliqué.

Un autre phénomène d'activation de l'expression par Vpr a été observé. Une réactivation de l'expression virale chez des cellules pro-monocytaire ou lymphocytaire (lymphocytes T ou B) n'exprimant habituellement qu'un faible niveau des protéines virales a également été observée. Ce phénomène est induit lorsque la protéine Vpr recombinante ou la protéine Vpr purifiée à partir de sérum d'individus infectés, est ajoutée au milieu de culture des cellules. Cette activité de Vpr peut être inhibée par des anticorps dirigés contre la protéine. Il semble également que l'ajout de la protéine de façon extra-cellulaire, compense l'absence d'expression de Vpr par le virus (Levy *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 1995).

Du point de vue de l'infection, la transactivation peut être le résultat de plusieurs phénomènes. Premièrement, l'augmentation de l'expression des gènes par Vpr, mise en évidence dans le système d'expression transitoire, semble corrélée avec l'accélération des effets cytopathiques observée lors de l'infection des lymphocytes T CD4+ (Ogawa *et al.*, 1989; Cohen *et al.*, 1990b; Balliet *et al.*, 1994). Deuxièmement,

chez les macrophages, cette augmentation de l'expression virale par Vpr a été associée à son rôle dans le transport du C.P.I. (Heinzinger *et al.*, 1994) mais la possibilité d'une augmentation au niveau transcriptionnel a également été soulevée (Connor *et al.*, 1995; Subbramanian *et al.*, 1998a). Finalement la réactivation de l'expression virale chez les cellules infectées de façon latente est probablement reliée au potentiel de transactivation du LTR du VIH-1 par Vpr (Levy *et al.*, 1994; Levy *et al.*, 1995). Les études n'ont pas démontré par contre, si Vpr agit de façon directe sur une des étapes menant à l'expression des gènes ou de façon indirecte en agissant sur le métabolisme cellulaire tel l'arrêt du cycle cellulaire. Il est intéressant de noter que Vpr module l'activité de NF- κ B en agissant sur l'induction de l'expression de I κ B (Ayyavoo *et al.*, 1997a).

8.4. Interactions.

8.4.1. Protéines virales.

L'incorporation de Vpr dans la particule virale dépend de la région p6 du précurseur Pr55Gag. Bien que la co-précipitation de Vpr avec Pr55Gag soit possible, aucune association directe entre p6 et Vpr n'a été démontrée (Lavalley *et al.*, 1994).

Par le système des deux hybrides (Fields & Song, 1989) et par co-précipitation, une association entre Vpr et la région carboxy-terminale de la matrice a été mise en évidence (Sato *et al.*, 1990). La force d'interaction est, par contre, faible et semble plus spécifique de la région carboxy-terminale de la MAp17 que de la protéine MAp17 entière. Cette équipe ne parvient pas à démontrer, par ce système, la multimérisation de Vpr ni l'interaction de Pr55Gag et Vpr. L'association de Vpr et MAp17, si elle s'avère réelle *in vivo*, pourrait expliquer la présence et la coopération des deux protéines dans le transport du C.P.I.

Une interaction entre la nucléocapside (NCp7) et Vpr a été observée *in vitro* (Li *et al.*, 1996).

8.4.2. Protéines cellulaires.

Le complexe formé entre la NCp7 et Vpr semble activer, *in vitro*, la protéine phosphatase-2A0 (Lim Tung *et al.*, 1997). Cet enzyme est impliqué dans l'inhibition de la transition des phases G2 à M du cycle cellulaire et dans le contrôle de la transcription. Cette étude peut mener à penser que la phosphatase-2A0 est la cible de Vpr pour l'inactivation de p34CDC2 et cdc25C. Par contre, les auteurs montrent que

sans NCp7, Vpr n'active pas la protéine phosphatase-2A0 alors que les études démontrent que Vpr seul suffit à causer l'arrêt du cycle des cellules.

Par chromatographie d'affinité, l'interaction entre Vpr et une protéine de 180kDa appelée R interacting protein (RIP) a été mise en évidence (Zhao *et al.*, 1994a). Le domaine identifié par cette étude comme étant important à la localisation nucléaire de Vpr (domaine-LR) est également responsable de l'interaction avec RIP. Par contre, puisque ce domaine est également important pour la stabilité de Vpr, l'absence d'interaction peut être reliée à un repliement inapproprié de la protéine.

Une interaction entre une protéine de 41kDa (RIP-1) et Vpr a été observée dans des cellules monocytaires (U-937) et dans les cellules de rhabdomyosarcome (RD) (Refaeli *et al.*, 1995; Ayyavoo *et al.*, 1997b). La protéine RIP-1 démontre une translocation nucléaire lorsque les cellules sont mises en présence de la protéine Vpr recombinante. Cette translocation de RIP-1 est semblable à celle induite par les analogues des glucocorticoïdes (hydrocortisone et dexaméthasone). Il semble donc, d'après cette étude, que Vpr agisse d'une manière semblable aux analogues des glucocorticoïdes pour l'activation du récepteur des glucocorticoïdes. Une coprécipitation entre Vpr, RIP-1 et le récepteur des glucocorticoïdes activé a effectivement été démontrée. De plus, l'augmentation de la production virale induite par Vpr dans les cellules U-937 peut être augmentée par les analogues de glucocorticoïdes et inhibée par les inhibiteurs des glucocorticoïdes. Cette étude indique que les glucocorticoïdes peuvent stimuler l'expression du virus d'une manière semblable à Vpr mais ne prouve pas l'existence d'un lien fonctionnel. Par chromatographie d'affinité, des protéines cellulaires de 18, 32, 40 et 200kDa ont également été identifiées comme partenaires potentiels de Vpr (Ayyavoo *et al.*, 1997b).

La capacité de Vpr à interagir avec le facteur de transcription SP1 sous forme dimérique a été démontrée *in vitro* (Wang *et al.*, 1995). La présence des motifs 2 et 3 semble nécessaire à cette interaction (Wang *et al.*, 1995). L'association entre Vpr et le facteur SP1 dépend donc de la présence d'au moins deux motifs de liaison à SP1. Cette étude ne tient pas compte de la capacité de Vpr à transactiver, *in vivo*, le LTR du VIH-1 malgré une délétion laissant seulement le premier motif (1) (Cohen *et al.*, 1990b).

Récemment, une interaction entre Vpr et le facteur de transcription IIB (TFIIB) a été observée *in vitro* (Agostini *et al.*, 1996). Cette interaction démontrée

par chromatographie d'affinité a permis d'identifier la région amino-terminale de TFIIB comme étant requise pour la liaison à Vpr.

Par l'utilisation du système des deux hybrides et la co-précipitation une interaction entre Vpr et l'enzyme uracile DNA glycosylase (UNG) a été mise en évidence (Bouhamdan *et al.*, 1996). Cet enzyme permet la réparation de l'ADN lorsque des uraciles sont incorporés lors de la réplication. La liaison de Vpr à UNG ne change pas l'activité de l'enzyme. La fonction d'arrêt du cycle cellulaire de Vpr est également indépendante de la liaison à UNG (Selig *et al.*, 1997). La pertinence de cette interaction dans le rôle fonctionnel de Vpr n'est donc pas comprise. Une étude récente indique que Vpr réduit le niveau de mutation introduites dans le génome viral lors de la réplication (Mansky, 1996). Cette observation pourrait possiblement avoir un lien avec l'interaction mise en évidence par Bouhamdan et collaborateurs (1996).

8.5. Autres caractéristiques.

Une étude récente attribue à Vpr, la capacité à former un canal cationique (Piller *et al.*, 1996). Cette étude, indique que Vpr, dans certaines conditions *in vitro* est capable de s'insérer aux membranes par son extrémité carboxy-terminale. L'implication de ces résultats dans la fonction de Vpr n'est pas connue. La véracité de cette observation dans un modèle *in vivo* n'a pas été confirmée.

8.6. Relation structure-fonction.

Le rôle des différentes régions structurales dans la fonction de la protéine Vpr a fait l'objet de plusieurs études. La mutagenèse des différentes régions de la protéine et l'étude de façon transitoire ou dans un contexte d'infection a permis de clarifier le rôle de chacune de ces régions. Les mutations introduites ont été choisies pour détruire la structure des domaines ou pour changer la charge ou encore l'encombrement stérique d'acides aminés particuliers (Chou & Fasman, 1978; Garnier *et al.*, 1978). Ainsi, la stabilité, la localisation cellulaire, l'incorporation et la fonction d'arrêt du cycle cellulaire ont été analysées.

La stabilité des protéines Vpr mutées a été analysée par marquage métabolique et chasse des protéines exprimées suite à la transfection transitoire par des expresseurs ou par des clones moléculaires. L'hélice- α amphipathique de la région amino-terminale (acides aminés 16 à 34) est impliquée dans la stabilité de la protéine (Mahalingam *et al.*, 1995d). Cette étude a permis de mettre en évidence l'importance de la structure secondaire (par remplacement des acides aminés en

proline) ainsi que l'importance même, des acides aminés hydrophobes et acides de cette région (Mahalingam *et al.*, 1995d). La substitution de la cystéine 76, la mutation des acides aminés 79 à 85 de même que la délétion des derniers acides aminés de cette région (17aa (CRST), 19aa (77fs) et 26aa (72fs)) influence également de façon importante la stabilité de Vpr (Paxton *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994; Mahalingam *et al.*, 1995b; Mahalingam *et al.*, 1995e; Yao *et al.*, 1995). Ces études indiquent donc que la région amino-terminale en hélice- α de même que la région carboxy-terminale sont importantes pour la stabilité de la protéine. Ces régions représentent une grande partie de la protéine ce qui semble suggérer que la conservation de l'intégrité de la protéine est un critère important dans la stabilité de celle-ci.

La localisation cellulaire de Vpr a été analysée soit par immunofluorescence indirecte ou par fractionnement cellulaire de cellules transfectées de façon transitoire. La région amino-terminale en hélice- α de Vpr est requise pour une localisation nucléaire optimale (Yao *et al.*, 1995). Parallèlement, une étude exhaustive a mis en évidence l'importance de la structure de l'hélice- α amino-terminale et non d'acides aminés spécifiques de cette région, de même que l'importance de l'hélice- α centrale (Mahalingam *et al.*, 1995a). L'implication de l'hélice- α amino-terminale a subséquemment été confirmée (Di Marzio *et al.*, 1995a) de même que celle de l'hélice- α centrale correspondant au domaine LR (Zhao *et al.*, 1994a; Mahalingam *et al.*, 1997a). L'importance de la région carboxy-terminale, par contre, n'est pas claire puisque des résultats contradictoires ont été trouvés (Lu *et al.*, 1993; Di Marzio *et al.*, 1995a). Lors de ces études, deux techniques différentes ont été utilisées, soit le fractionnement cellulaire et l'immunofluorescence indirecte, ce qui explique la différence des résultats. Le fractionnement cellulaire est une technique précise qui permet de séparer les différents compartiments cellulaires selon leur résistance plus ou moins grande aux détergents. L'immunofluorescence donne une vue d'ensemble de la cellule et ne permet pas la distinction, par exemple, de la localisation périnucléaire ou nucléaire.

Une étude récente de notre groupe par microscopie confocale à balayage indique en effet que la protéine Vpr de type sauvage démontre une localisation nucléaire et périnucléaire (Subbramanian *et al.*, 1998b). Cette technique repose sur l'immunofluorescence indirecte mais le signal est analysé à l'aide d'un laser traversant la cellule en plusieurs couches distinctes. Cette analyse permet de déterminer la présence de la protéine dans chacune de ces couches. Cette étude indique que

l'introduction de mutations au niveau des hélices- α amino-terminales et centrales empêche, de façon générale, la localisation nucléoplasmique de la protéine (Subbramanian *et al.*, 1998b). Les protéines mutantes sont bloquées principalement au niveau périnucléaire (Subbramanian *et al.*, 1998b). L'introduction de mutations au niveau de la région-carboxy-terminale, par contre, n'empêche pas la protéine de se rendre au niveau du nucléoplasme.

La contribution des différentes régions de Vpr impliquées dans son incorporation a été analysée par mutation de *vpr* et transfection de l'ADN proviral muté. Le marquage métabolique et l'immunoprécipitation des protéines associées au virus permet de déterminer l'effet des mutations introduites dans l'incorporation de la protéine. Ainsi, l'importance de l'hélice- α amino-terminale dans cette propriété de Vpr a été mise en évidence (Mahalingam *et al.*, 1995c; Mahalingam *et al.*, 1995d; Yao *et al.*, 1995). L'absence de contribution du domaine LR et de la région carboxy-terminale dans l'incorporation de Vpr a également été démontrée (Di Marzio *et al.*, 1995a; Mahalingam *et al.*, 1995c; Mahalingam *et al.*, 1995e).

L'identification de la région de Vpr importante pour la fonction d'arrêt du cycle cellulaire a été effectuée chez la levure et chez les cellules de mammifères transfectées de façon transitoire. Une séquence répétée de la région carboxy-terminale de Vpr (H(S/F)RIG) a été identifiée comme étant responsable du retard de croissance observé chez *Saccharomyces cerevisiae* (Macreadie *et al.*, 1995; Macreadie *et al.*, 1996). La région carboxy-terminale est majoritairement responsable de l'arrêt du cycle cellulaire chez les cellules de mammifères (Di Marzio *et al.*, 1995a). L'introduction d'une mutation au niveau de l'arginine 80, qui rend la protéine incapable d'arrêter le cycle cellulaire, ne démontre pas l'hyperphosphorylation caractéristique de l'inactivation de p34CDC2 (He *et al.*, 1995). Notre groupe s'est également intéressé à identifier les différents domaines de Vpr impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire. La méthode employée se rapproche plus du contexte d'infection. Des cellules lymphocytaires CD4+ ont été infectées par des virus pseudotypés avec la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) où le gène *vpr* a été muté. L'importance de la région carboxy-terminale dans cette fonction de Vpr a donc été confirmée (Yao *et al.*, 1998).

Le domaine LR est responsable de l'interaction entre Vpr et le facteur de transcription SP1 ainsi que la protéine RIP (Zhao *et al.*, 1994a; Wang *et al.*, 1995). La région 15 à 77 de Vpr est responsable de la liaison de Vpr à TFIIB et à UNG (Agostini *et al.*, 1996; Bouhamdan *et al.*, 1996).

En résumé, l'hélice- α de la région amino-terminale est impliquée dans la stabilité de la protéine ainsi que sa localisation nucléaire et est responsable de l'incorporation dans la particule virale. L'hélice- α centrale, contenant le domaine LR, est impliquée dans la localisation nucléaire et dans l'interaction entre Vpr et les protéines cellulaires. La région carboxy-terminale est responsable de l'arrêt du cycle cellulaire et influence la stabilité de la protéine (figure 9).

L'importance des différentes fonctions de Vpr lors du cycle d'infection est encore mal connue. Cependant, une étude indique que la délétion de la région carboxy-terminale de Vpr entraîne l'apparition d'un phénotype équivalent à celui d'un virus Vpr-négatif (Ogawa *et al.*, 1989). Jusqu'à maintenant la contribution des différents domaines de Vpr dans l'infection des macrophages n'a pas été étudiée.

8.7. Importance de Vpr *in vivo*.

Le rôle de Vpr dans l'infection a été étudié chez les singes macaque Rhésus en utilisant le virus, VISmac (Lang *et al.*, 1993). L'ATG du gène *vpr* a été muté parallèlement à l'introduction d'un codon stop au niveau du gène *nef*. Les virus produits ont été inoculés aux singes Rhésus et la mesure de la charge virale ainsi que l'apparition des symptômes ont été analysés. Cette étude indique que l'absence de la protéine Vpr semble protéger les singes de l'infection par le VISmac. De plus, l'apparition des symptômes chez les singes inoculés avec des virus mutés pour *vpr* corrèle avec la réapparition d'un ATG fonctionnel. Ce phénomène est lié à la protéine Vpr puisque chez les singes inoculés par des virus exprimant Vpr ou non, une réversion de la mutation de *nef* est observée. La possibilité d'utiliser des virus atténués par l'inactivation des gènes *nef* et *vpr* dans le développement de vaccins, a été soulevée. Par contre, il semble que malgré les délétions, ces virus soient pathogéniques chez les singes nouveau-nés (Baba *et al.*, 1995). Une autre étude indique que l'infection de singes macaques par des virus chimériques entre VISmac et le VIH-1 (SHIV), mutés pour les gènes *nef* et *vpr*, semble protéger les singes inoculés contre l'infection par le virus de type sauvage (Igarashi *et al.*, 1997).

Une seconde étude démontre que la double délétion des gènes *vpx* et *vpr* chez le VISmac réduit considérablement la charge virale et empêche l'apparition des symptômes de la maladie liés à l'infection (Gibbs *et al.*, 1995). Puisque la fonction de la protéine Vpr du VIH-1 est répartie entre Vpr et Vpx chez le VIH-2 et les VIS, l'absence des deux protéines chez VISmac reflète l'absence complète des fonctions reliées à la protéine Vpr du VIH-1. Par contre, cette étude, contrairement à la

Vpr

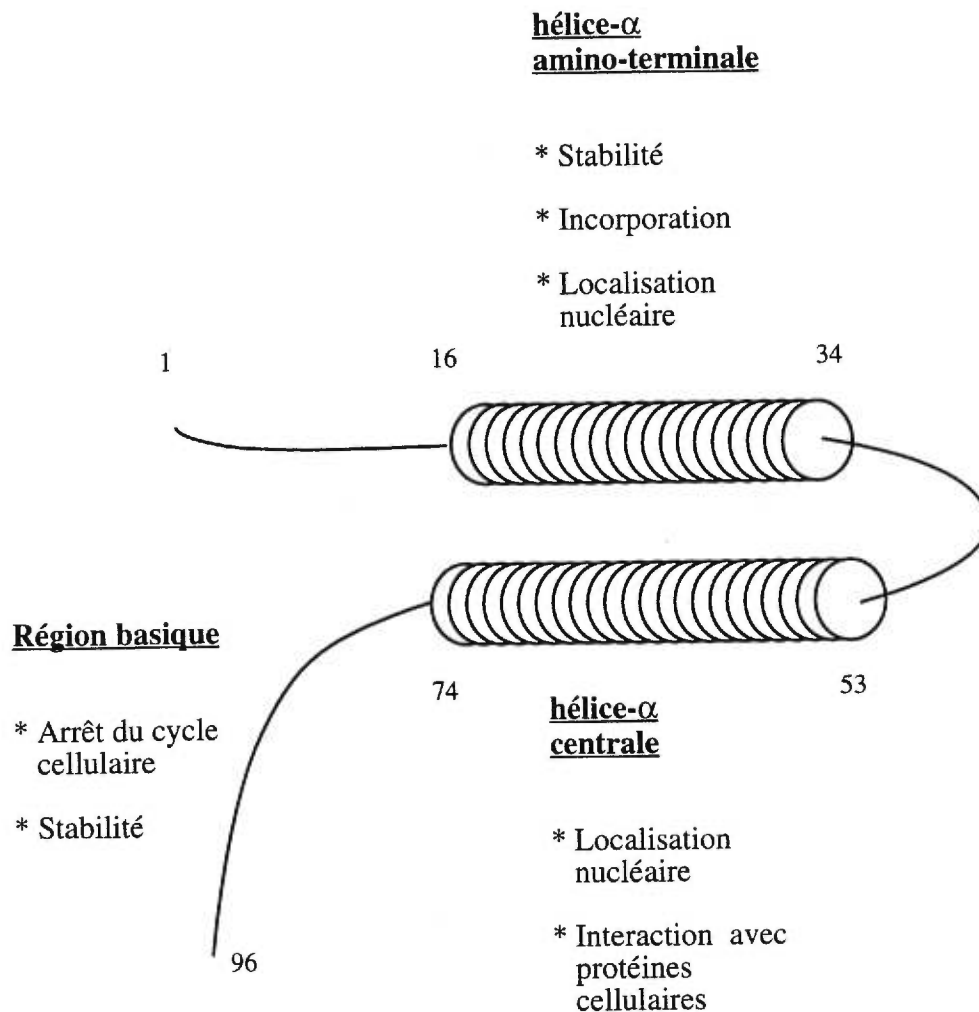


Figure 9. Représentation schématique des régions responsables des différentes fonctions et propriétés de la protéine Vpr. L'hélice-alpha N-terminale est impliquée dans la stabilité, l'incorporation de Vpr dans la particule virale et dans la localisation nucléaire de la protéine. L'hélice-alpha centrale est impliquée dans la localisation nucléaire et dans l'interaction de Vpr avec les protéines cellulaires. Finalement, la région basique de Vpr est responsable de la stabilité et de la fonction d'arrêt du cycle cellulaire de la protéine.

première, indique que la délétion de *vpr* n'est pas suffisante à la protection contre l'infection (Gibbs *et al.*, 1995; Hoch *et al.*, 1995).

Le modèle de la souris SCID (severe combined immunodeficient) a également été utilisé afin de déterminer le rôle de Vpr dans l'infection *in vivo*. Une partie d'un thymus et d'un foie foétal humain est implantée chez ces souris. La différenciation des thymocytes en lymphocytes matures est possible dans ce système et les phénotypes d'infection et de déplétion des lymphocytes T CD4+ sont observés (McCune *et al.*, 1988; Stanley *et al.*, 1993; Kollmann *et al.*, 1994; Aldrovandi & Zack, 1996). L'utilisation des souris SCID n'a pas permis de démontrer un rôle de Vpr dans l'infection *in vivo* (Aldrovandi & Zack, 1996). Ce modèle animal ne démontre pas, par contre, toute la complexité de l'infection dans des conditions où le système immunitaire se défend contre le virus. Le rôle de Vpr dans ces conditions peut prendre une toute autre importance.

9. Problématique.

La protéine Vpr fait partie du groupe des protéines accessoires du virus d'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Quatre fonctions biologiques ont été attribuées à cette protéine. La première, consiste en une accélération de la production virale chez les lymphocytes T CD4+ qui cause une augmentation des effets cytopathiques associés au virus. La seconde, consiste en une augmentation de la production virale chez les macrophages et est reliée à la capacité de Vpr à agir sur le transport du C.P.I. vers le noyau des cellules en absence de division. Par contre, certaines études indiquent que Vpr agit également à une étape autre que celle du transport du C.P.I. chez ces cellules. La troisième fonction biologique de Vpr, repose sur la manipulation de l'environnement cellulaire causant un arrêt du cycle des cellules, des changements dans leur morphologie de même que leur mort par apoptose. Finalement, Vpr transactive le LTR du VIH-1 de même que d'autres promoteurs viraux dans un système d'expression transitoire. Cette dernière fonction est dérivée de l'observation d'une augmentation de l'expression de gènes rapporteurs lorsque la protéine Vpr est co-exprimée dans la cellule. Le mécanisme par lequel Vpr augmente la production virale, de même que le lien entre chacune des fonctions biologiques de Vpr n'est toujours pas clair. Par contre, l'augmentation de l'expression de gènes rapporteur en présence de Vpr reflète probablement les phénomènes d'accélération et d'augmentation de la production virale observée chez les lymphocytes T CD4+ et les macrophages.

Le but de cette étude est de clarifier le rôle de la protéine Vpr dans le cycle d'infection du VIH-1. L'étude qui sera présentée tentera plus précisément, d'évaluer l'impact de la fonction de transactivation dans la réplication du VIH-1 et le lien entre les fonctions de transactivation et d'arrêt du cycle cellulaire.

1) Afin de préciser le mécanisme moléculaire par lequel Vpr permet l'augmentation de l'expression des gènes viraux, le système de transactivation transitoire sera utilisé. Les régions de la protéines impliquées dans cette fonction seront identifiées et le lien entre les différents phénotypes ou fonctions biologiques de Vpr et la fonction de transactivation sera présentée. Finalement, j'essaierai d'établir un lien entre la fonction de transactivation de Vpr et l'augmentation de la production virale observées chez les lymphocytes T CD4+ et les macrophages.

2) Une étude de l'effet de Vpr sur la physiologie cellulaire et l'importance de la fonction d'arrêt du cycle cellulaire sur ce phénomène sera amorcée. J'utiliserai le modèle des cellules musculaires afin de clarifier la relation entre les fonctions biologiques de Vpr et la réponse de la cellule aux changements subits.

Chapitre 2
Matériels et Méthodes

1. Génie génétique.

Les techniques de génie génétique utilisées lors du clonage sont basées sur les protocoles tirés de *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* et de *Current Protocols in Molecular Biology* (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1991).

Les enzymes de restriction ont été achetées chez les compagnies Gibco-BRL (Burlington, Ont.), New England Biolab (Beverly, CA.) ou Pharmacia Biotech Inc (Baie d'Urfée, Qué.). Les conditions de digestion enzymatique sont basées sur les recommandations des manufacturiers. Habituellement, l'ADN est digéré pendant une heure à 37°C en utilisant 1U d'enzyme par microgramme d'ADN. L'ADN digéré est séparé par électrophorèse en gel d'agarose 1% et visualisé par exposition aux ultraviolets suite à la coloration au bromure d'éthidium (McDonnell *et al.*, 1977). Les fragments d'ADN sont purifiés par extraction à l'aide d'une matrice de silice (Gene Clean, Bio 101, La Jolla CA.) et sont insérés dans un vecteur digéré avec les mêmes enzymes de restriction à l'aide de la ligase d'ADN du phage T4. Un rapport molaire de 1:3 (vecteur : fragment) est utilisé lors de cette réaction. Des bactéries compétentes (AG-1) sont transformées par choc thermique avec la construction obtenue et sont sélectionnées sur plaque d'agar contenant l'antibiotique auquel le vecteur fournit la résistance (ampiciline ou tétracycline) (Cohen *et al.*, 1973). Des colonies individuelles de bactéries sont recueillies et l'ADN est isolé par lyse alcaline. La présence du fragment désiré est déterminée par digestion enzymatique. Les bactéries possédant la construction voulue sont amplifiées dans un bouillon de culture contenant l'antibiotique approprié et l'ADN est isolé par lyse alcaline. L'ADN est purifié par centrifugation à l'équilibre dans un gradient de chlorure de césium.

2. Construction des vecteurs d'expression.

Le vecteur d'expression du gène *vpr* illustré à la figure 1A a servi à l'insertion des gènes *vpr* mutés, obtenus par la technique de mutagenèse par réaction de polymérase en chaîne (polymerase chain reaction (PCR)). La construction du vecteur d'expression, SVCMVBruR a été réalisée par amplification de la séquence *vpr* du clone moléculaire HxBru (nucléotides (nt): 5126 à 5443: +1: site d'initiation de la transcription). L'oligonucléotide sens utilisé introduit un site de restriction reconnu par l'enzyme *Xba*1 en amont de l'ATG du gène *vpr* (5'-ACTTCTAGAGGATAGAT-GGAACAAGCC-3'). L'oligonucléotide antisens introduit un site de restriction pour l'enzyme *Sac*1 suivant le codon stop de *vpr* (5'-CAGGAGCTCAGTCTAGGATCTA-

CTGGC-3'). Le vecteur d'expression pSU3CAT a servi à créer les expresseurs possédant un promoteur SL3-3 muté (figure 2).

2.1. Mutagenèse par PCR.

La mutagenèse par PCR a été utilisée soit pour introduire de nouveaux sites de restriction à chaque extrémité du fragment désiré ou pour introduire une mutation ponctuelle dans la séquence de *vpr*. L'introduction de nouveaux sites de restrictions a été rendue nécessaire lors du clonage de la séquence de *vpr* dans les plasmides du système inductible à la tétracycline. La création d'oligonucléotides mutagéniques pour le PCR a été planifiée afin que la séquence mutée (non-appariée) soit encadrée par des séquences d'au moins six nucléotides démontrant 100% d'homologie à la séquence du gène amplifié. La réaction s'effectue dans un volume total de 100µl contenant 10ng de la matrice d'ADN, 50pmol de chacun des oligonucléotides mutagéniques, 16mM de chacun des dNTPs, le tampon de l'enzyme *Pfu* (10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 20mM Tris (pH8,75), 0,1% triton X-100, 100µg/ml BSA) et 2,5U de l'enzyme *Pfu* (Stratagene, La Jolla, CA.). La réaction de mutagenèse couplée à l'amplification s'effectue pendant trente cycles d'une minute à 94°C, deux minutes à 50°C et trois minutes à 72°C à l'aide d'un appareil à PCR (Perkin Elmer Cetus, Mississauga, Ont.). L'ADN amplifié est précipité par deux volumes d'éthanol, un dixième de volume de sodium acétate (3M) et 10µg d'ARNt. Le fragment est digéré par les enzymes de restriction appropriés et est inséré dans le vecteur d'expression digéré avec les mêmes enzymes (Yao *et al.*, 1995).

2.2. Mutants de Vpr.

Les mutants ont été obtenus par amplification de la séquence *vpr* à l'aide des oligonucléotides *Xba*I et *Sac*I décrits ci-haut à partir des clones moléculaires mutés correspondant. La création des clones moléculaires mutés a été décrite en détails dans d'autres publications (Yao *et al.*, 1995; Subbramanian *et al.*, 1998b). Les oligonucléotides mutagéniques sont exprimés selon le sens de la séquence codante (L23F:5'-ACTAGAGCTCTTCGAGGAGCTT-3' nt: 5197 à 5218), (E25K:5'-GCTT-TTAGAGAAGCTTAAGAA-3' nt: 5203 à 5223), (A30F:5'-TAAGAATGAATTCG-TTAGACATT-3' nt: 5218 à 5240), (V57L:5'-TTGGGCAGGACTCGAGGCCATA-ATAA-3' nt: 5299 à 5324), (R62P:5'-AGCCATAATACCCATTCTGCAAC-3' nt: 5314 à 5336), (I63K:5'-GCCATAATAAGAAAGCTTCAACAACACTGC-3' nt: 5315 à 5342), (I63F:5'-ATAATAAGATTTCTGCAAC-3' nt: 5320 à 5338), (IL63/64KR:5'-ATAATAAGAAACGCCAACAACACT-G-3' nt 5320 à 5343), (Q65E:5'-ATAAGAA-TTCTCGAGCAACTGCTCT-3' nt: 5320 à 5344), (LI68/70RK: 5'-CAACAACACTGC-GGTTTAAACATTTTCAGA-3' nt: 5335 à 5361), (SR79/80ID: 5'-TGTCGACA-TATCGATATAGGCGTTA-3' nt: 5367 à 5391), (R80A: 5'-ATTGGGTGTCGAC-ATAGCGCTATAGGCGTT-3' nt: 5360 à 5390). Le vecteur d'expression SVCMBruRATG- a été créé en amplifiant la séquence du gène *vpr* de HxBru en utilisant un oligonucléotide sens *Xba*I où la séquence de l'ATG a été modifiée pour GTG (5'-ACTTCTAGAGGATAGGTGGAACAAGCC-3' nt: 5126 à 5152). Chacun des gènes mutés est sous le contrôle du promoteur du cytomégalo virus (CMV). La séquence des protéines Vpr mutées est illustrée à la figure 1B.

2.3. Vecteurs d'expression possédant un promoteur SL3-3 muté.

La description des plasmides utilisés pour les essais de transactivation a été préalablement publiée (Celandier *et al.*, 1988). Le plasmide pSU3CAT et les mutants dérivés (AB2, AB3, AB7, AB16, AB17) possèdent la séquence -444 à +31 (+1: site d'initiation de la transcription) du promoteur SL3-3 cloné en amont du gène de la chloramphénicol acétyl transférase (Celandier & Haseltine, 1984). La mutation du promoteur SL3-3 a été effectuée par insertion d'un oligonucléotide, contenant un site de restriction pour l'enzyme *Bgl*III, suite à la digestion partielle du plasmide pSU3CAT par les enzymes de restriction *Apa*I ou *Ava*II. Ainsi, l'oligonucléotide *Bgl*III a été inséré à la position -184 (AB7), -208 (AB16), -256 (AB2), -280 (AB17) ou -328 (AB3) (Celandier *et al.*, 1988) (figure 2).

2.4. Clones moléculaires du VIH-1.

Les clones moléculaires utilisés sont clonés dans des vecteurs d'expression contenant un origine de répllication SV40. La présence de cette origine de répllication permet d'obtenir de haut niveaux d'expression lors de la transfection des expressieurs chez les cellules transformées par l'antigène grand T de SV40 (293T).

Les clones moléculaires ayant servi à la production de virus pseudotypés avec l'enveloppe G du virus de la stomatite vésiculaire sont issus de HxBruR+ et HxBruR- et sont nommés HxBruR+/Env- et HxBruR-/Env- (figure 3) (Yao *et al.*, 1998). Pour chacun de ces deux clones moléculaire, le fragment *Sall-BamHI* (nt: 5366 à 8052) de HxBH10Vpu+/Env-/fs (décrit dans Yao *et al* 1992) a servi à remplacer le fragment *Sall-BamHI* correspondant (nt: 5371 à 8072) de HxBruR+ et HxBruR-. L'ATG de l'enveloppe de ce clone moléculaire a été muté pour ACG et un changement de phase a été introduit par digestion au site *KpnI* (nt: 5893) et réparation par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I. Le génotype de ces clones moléculaires est; 5'-LTR, *gag+*, *pol+*, *vif+*, *vpr+/-*, *tat+*, *rev+*, *vpu+*, *env-*, *nef-*, LTR-3'. Ceux-ci sont isogéniques sauf pour l'expression de Vpr.

2.5. Vecteurs d'expression du système inductible à la tétracycline.

Le système inductible à la tétracycline est basé sur le système développé par Gossen et Bujard (Gossen & Bujard, 1992). La construction du vecteur inductible pour l'expression de Vpr (pRepVpr) requiert au préalable l'insertion dans un vecteur intermédiaire où le promoteur inductible a été cloné (BICMV_T) (figure 4A). Le promoteur CMV_T contient sept copies de l'opérateur de la tétracycline (*Tn-10*) ainsi que le promoteur minimal des gènes immédiats-précoces du cytomégalo virus humain suivi de sites de polyclonage. La séquence de *vpr* a été amplifiée à l'aide d'un oligonucléotide en amont du gène, introduisant un site de restriction pour l'enzyme *HindIII* (5'-ACCTCCAAGCTTGGGCTG-3') et un oligonucléotide en aval du gène, introduisant un site de restriction pour l'enzyme *BamHI* (5'-TTCGGATCCAGTCTA-GGA-3'). Le vecteur BICMV_T et le fragment amplifié ont été digérés avec les enzymes de restriction *HindIII* et *BamHI* et le fragment correspondant à *vpr* a été inséré, créant le vecteur d'expression; BICMV_TVpr. La séquence correspondant au promoteur CMV_T et au gène *vpr* a été digérée par les enzymes *XhoI* et *BamHI*. Ce fragment a été cloné dans les sites *XhoI* et *BamHI* du vecteur ΔpRep9 créant le vecteur d'expression; pRepVpr. Ce vecteur possède un gène de résistance à la néomycine et à l'ampiciline. Un cadre de lecture ouvert codant pour la protéine

Clones HxBruR+/Env- et HxBruR-Env-

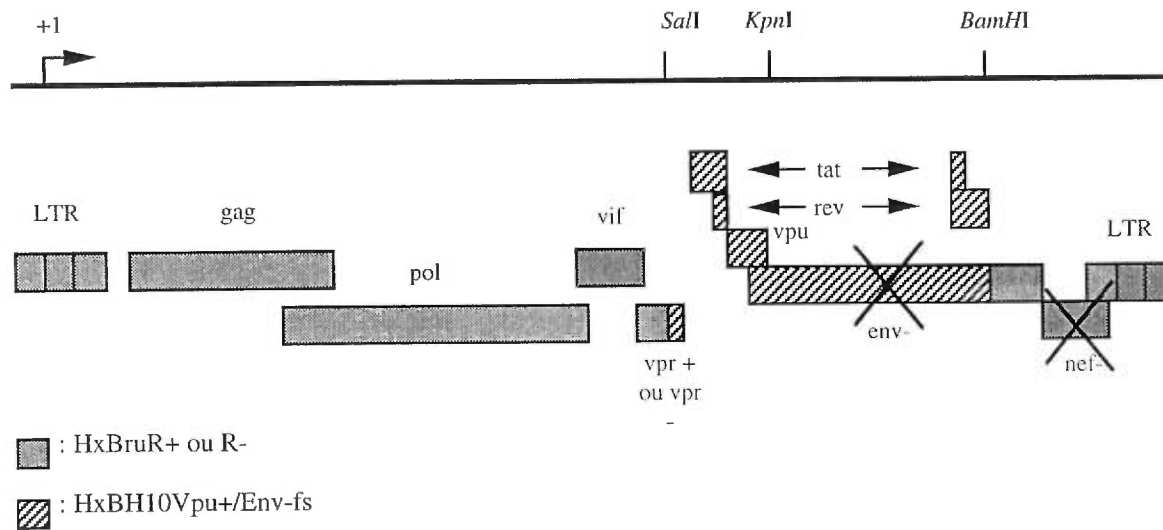


Figure 3. Clones moléculaires du VIH-1. Les clones moléculaires HxBruR+/Env- et HxBruR-/Env- ont été co-transfectés avec un exprèsseur de l'enveloppe G du virus de la stomatite vésiculaire dans les cellules 293T afin de produire les préparations virales servant à l'infection des cellules Jurkat à M.O.I. élevée.

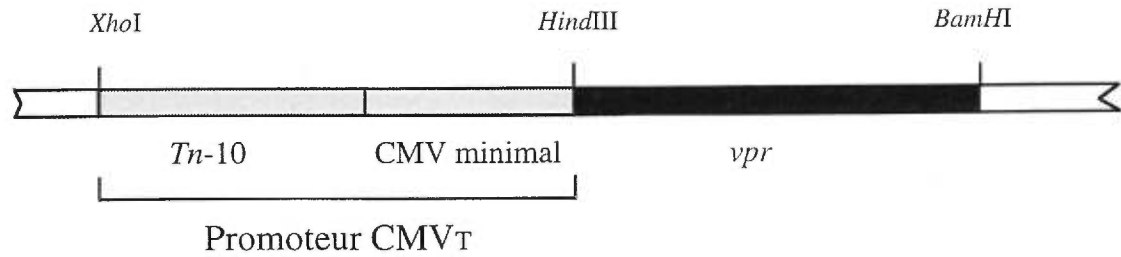
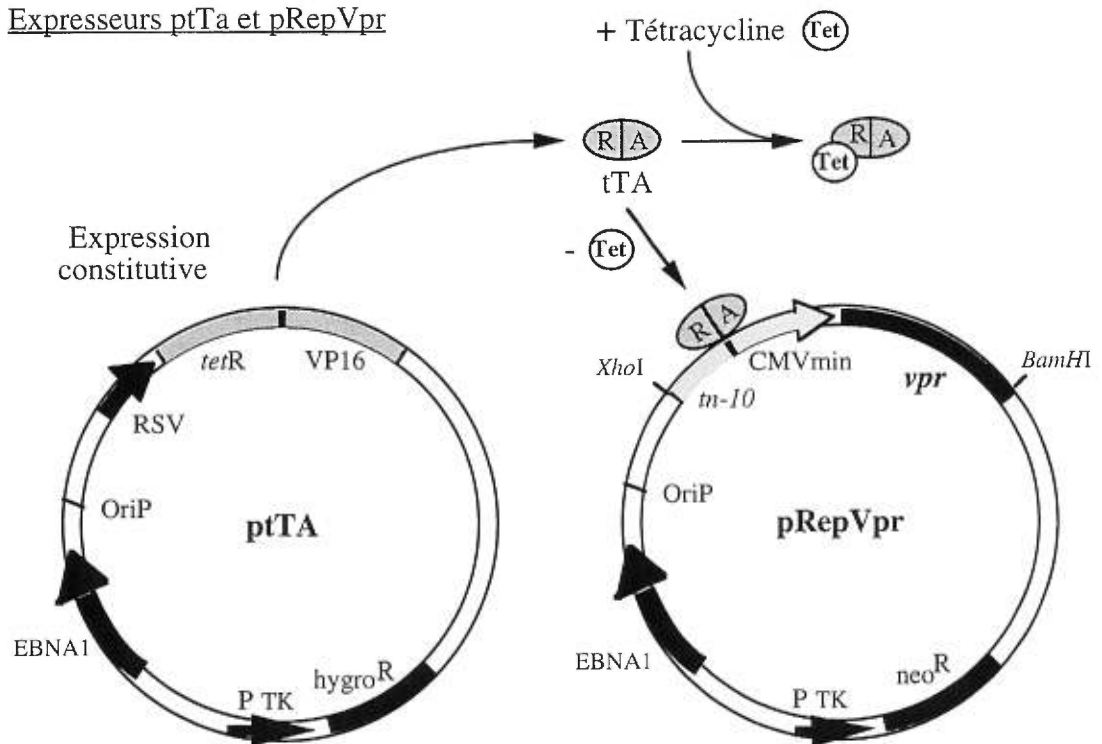
A) Expresseur BICMV_TB) Expresseurs ptTa et pRepVpr

Figure 4. Expresseurs du système inducible à la tétracycline. A) Intermédiaire de clonage BICMV_T servant à insérer le gène *vpr* en amont du promoteur inducible. Le fragment *XhoI-BamHI* a été inséré dans le vecteur pRep. B) Vecteurs du système inducible à la tétracycline ayant servi à la transfection des cellules RSH-AC1. Le vecteur ptTA code pour une protéine de fusion constituée du répresseur de la tétracycline et de la protéine VP16 qui, par sa liaison au promoteur CMV_T, permet l'expression de la protéine Vpr en absence de tétracycline. (adapté de Pignac-Kobinger, G. *et al* dans *Gene Therapy* Vol. 4, pages 868 à 874, 1997).

EBNA1 de même que l'origine de réplication (oriP) du virus Epstein-Barr permettent le maintien du plasmide sous une forme épisomale.

Un second vecteur (tTA) est responsable de la régulation de l'expression du gène cloné en aval du promoteur inductible CMV_T. Ce vecteur code pour une protéine de fusion composée du répresseur de la tétracycline et du domaine carboxy-terminal d'activation de la transcription de la protéine VP16 du virus Herpes simplex. L'expression de cette protéine est contrôlée par le promoteur RSV et s'exerce de façon constitutive. Cette protéine se lie à l'opérateur de la tétracycline du promoteur CMV_T et permet la transcription du gène. La présence de tétracycline empêche la liaison de la protéine de fusion au promoteur CMV_T. Ce vecteur possède un gène de résistance à l'hygromycine et à l'ampiciline. Un cadre de lecture ouvert codant pour la protéine EBNA1 de même que l'origine de réplication du virus (oriP) Epstein-Barr permettent également le maintien du plasmide sous une forme épisomale (figure 4B).

2.6. Autres vecteurs d'expression.

Les expresseurs IIIexTat et SVCMVTat ont été décrits par les groupes de ailleurs (Sodroski *et al.*, 1985) (Yao *et al.*, 1995).

L'expresseur pGEMGAPDH servant à la création de la sonde de la séquence de GAPDH a précédemment été décrit (Fort *et al.*, 1985).

L'expresseur pGEMSL3CAT/Eco servant à obtenir la sonde reconnaissant le promoteur SL3-3 provient du clonage du fragment *XhoI-EcoRI* de pSU3CAT, aux sites *Sall-EcoRI* de pGEM-3 (Promega, Madison, WI.). Ce vecteur a été fourni par le Dr. W. Haseltine du Dana-Farber Cancer Institute (Boston, MA.)

L'expresseur de la protéine de l'enveloppe G du virus de la stomatite vésiculaire (SVCMV-VSV-G) a été décrit dans une publication ultérieure (Lodge *et al.*, 1997).

2.7. Séquençage.

Afin de confirmer la présence des mutations voulues, la séquence du gène inséré est vérifiée par séquençage. La technique utilisée est basée sur la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977; Sanger *et al.*, 1980). Dans un premier temps l'ADN (1µg) est dénaturé par incubation avec l'hydroxide de sodium. L'ADN est précipité et est subséquentement hybridé avec un oligonucléotide (1pmol) se trouvant à proximité de la séquence cible. La réaction de polymérisation est amorcée par ajout des nucléotides, y compris l'ATP radiomarquée au [³⁵S] et de l'enzyme (Sequenase)

(United States Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio). La réaction de polymérisation est inhibée par transfert d'un quart de la réaction dans chacun des quatre tubes contenant un des didéoxynucléotides (ddATP, ddGTP, ddTTP ou ddCTP). La réaction est arrêtée par ajout d'une solution inactivant l'enzyme.

Avant l'électrophorèse, l'ADN est dénaturé à 85°C pendant cinq minutes. L'ADN est déposé sur gel de polyacrylamide 8%. Suite à la fixation, le gel est séché une heure à 80°C et mis en contact avec un film pour l'autoradiographie.

3. Biologie cellulaire.

3.1. Lignées cellulaires.

Les cellules utilisées proviennent soit de American Type Culture Collection ou du NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Les cellules adhérentes sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Eagle modifié (DMEM) et les cellules en suspension sont cultivées dans du milieu RPMI (GIBCO BRL, Burlington, Ont.). Ces milieux sont complétés par ajout de 10% de sérum de veau foétal et 1% d'une solution de pénicilline et streptomycine. Les cellules sont gardées dans des incubateurs à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Toutes les solutions utilisées pour la culture cellulaire, les transfections et les infections sont stérilisées soit par filtration avec un filtre de 0,2 micron ou par autoclavage. Les cellules sont congelées dans l'azote liquide dans du milieu (RPMI ou DMEM) contenant 20% de sérum de veau foétal, 10% de DMSO et 1% de pénicilline/streptomycine.

Les cellules HeLa sont des cellules épithéliales provenant d'un carcinome cervical humain.

Les cellules HeLa TAR CAT ont été obtenues par co-transfection de l'expresseur IIIICAT et d'un expresseur permettant la résistance à la néomycine. La lignée cellulaire a été isolée par la résistance des clones à l'antibiotique. Ces cellules proviennent du laboratoire du Dr. Nahum Sonenberg du département de Biochimie de l'Université McGill.

Les cellules 293T sont des cellules épithéliales du rein humain ayant été transformées avec la protéine E1a d'adénovirus et par l'antigène grand T de SV40. La présence de l'antigène grand T, chez ces cellules, favorise la réplication des expresseurs possédant l'origine de réplication de SV40.

Les cellules HeLa-CD4-LTR- β -gal proviennent de cellules HeLa infectées avec un vecteur rétroviral exprimant CD4 et transfecté de façon stable avec un plasmide exprimant l'enzyme β -galactosidase sous le contrôle du LTR du VIH-1 (Kimpton & Emerman, 1992).

Les cellules RSH-AC1 ainsi que les clones qui en sont dérivés proviennent d'un rhabdomyosarcome humain de type embryonnaire, isolé d'un patient et mis en culture. Les cellules RSH-AC1 ont été fournies par le Dr Feridoun Babai du département de Pathologie de l'Université de Montréal et ont été caractérisées pour leur degré de différenciation (tableau 1, chapitre 5).

Les cellules Jurkat et MT-4 sont des cellules de type lymphocytaires exprimant la molécule CD4. Les cellules Jurkat proviennent d'un lymphome humain (Weiss *et al.*, 1984). Les cellules MT-4 ont été transformées par HTLV-1 (human T cell leukemia virus type 1) (Larder *et al.*, 1989). Les cellules ACH2 sont des cellules lymphocytaires n'exprimant pas la molécule CD4 (clone A3.01 dérivé des cellules CEM) et sont infectées de façon latente par la souche LAV du VIH-1 (Folks *et al.*, 1989). Ces cellules croissent en suspension.

3.2. Transfections.

3.2.1. Précipité de phosphate de calcium.

La technique de transfection par précipité de phosphate de calcium est basée sur la publication de Chen et collaborateurs (Chen & Okayama, 1988). Vingt-quatre heures avant la transfection, les cellules sont comptées et un ou cinq million de cellules sont mises dans des pétris de 100mm ou de 140mm de diamètre. Dix microgrammes d'ADN sont utilisés pour la transfection d'un million de cellules et 20 μ g pour la transfection de cinq millions de cellules. Les cellules sont généralement récoltées soixante-douze heures suivant la transfection afin d'effectuer les analyses fonctionnelles ou récupérer les virus produits.

3.2.2. DEAE-dextran.

Les cellules en suspension (Jurkat et MT-4) sont transfectées par la méthode de DEAE-dextran (Lopata *et al.*, 1984). Les cellules sont prélevées, centrifugées et rincées avec du milieu DMEM sans sérum. Les cellules sont à nouveau centrifugées et resuspendues à une densité de dix millions par millilitre dans du milieu DMEM sans sérum. Parallèlement, la solution de transfection est préparée par ajout de 10 à

20µg d'ADN, avec 150µl de DEAE-dextran stérile (5mg/ml dans du Tris 1M (pH7,4)) et 2ml de DMEM sans sérum dans des tubes de polypropylène de 5ml (Falcon, Becton-Dickinson N.-J.). Un millilitre de cellule est ajouté au mélange d'ADN et de DEAE-dextran et incubé une heure à 37°C avec agitation occasionnelle. Suivant l'incubation, les cellules sont culottées par centrifugation à 800rpm pendant dix minutes (rotor GH3.7, centrifugeuse GS-6R, Bekman Instruments Canada Inc., Mississauga, Ont.) et sont rincées avec 3ml de DMEM complet puis resuspendues dans 12ml de RPMI complet et incubées à 37°C dans un incubateur à CO₂. Lors de l'analyse de la fonction de transactivation, les cellules sont récoltées soixante-douze heures post-transfection. Lors de la production de virus, le surnageant des cellules est récolté lors de l'apparition des syncytiums (quarante-huit heures et plus).

3.3. Développement de lignées inductibles.

3.3.1. Détermination des concentrations d'antibiotiques servant à la sélection.

Avant la production de lignées cellulaires par transfection des vecteurs du système inductible à la tétracycline, la résistance intrinsèque des cellules à l'hygromycine et la néomycine a été déterminée. Ainsi, les cellules de rhabdomyosarcome humain (RSH-AC1) ont été mises dans des plaques de six puits (puit de 25mm de diamètre) à une densité de cent mille cellules par puit et ont été mises en présence de concentrations croissantes d'hygromycine ou de néomycine (50, 100, 200, 350, 500, et 650µg/ml). Chaque deux ou trois jours la quantité de cellules est évaluée dans les puits correspondants à chacune des concentrations des antibiotiques. Ceci a permis de déterminer la capacité des cellules RSH-AC1 à croître aux différentes concentrations d'antibiotiques. Ainsi la concentration d'hygromycine et de néomycine capable de tuer les cellules RSH-AC1 en une semaine est de 100µg/ml et 400µg/ml respectivement. Puisque les lignées cellulaires ont été obtenues par sélection des deux plasmides au même moment et donc par l'utilisation des deux antibiotiques en même temps, la concentration d'hygromycine et de néomycine a été diminuée de moitié. Les concentrations utilisées pour la sélection des lignées inductibles sont donc de 50µg/ml d'hygromycine et 200µg/ml de néomycine. Ces concentrations d'antibiotiques permettent la mort des cellules non-transfectées servant de contrôle. La résistance des cellules à l'hygromycine est fournie par le gène codant pour l'hygromycine-B-phosphotransferase. La résistance à

la néomycine est fournie par le gène codant pour l'aminoglycoside phosphotransférase.

3.3.2. Isolation des clones de rhabdomyosarcome exprimant Vpr.

Les cellules de rhabdomyosarcome humain (RSH-AC1) ont été transfectées par la méthode de précipité de phosphate de calcium avec 10 μ g de chacun des plasmides du système inductible (tTa et pRepVpr) par pétri de 100mm. Le protocole suivant décrit la création de lignées inductible de façon générale. Le milieu DMEM ajouté suite à la transfection contient 2 μ g/ml de tétracycline. Quarante-huit heures post-transfection, les cellules sont rincées deux fois avec 5ml de PBS 1X et sont décollées par incubation pendant cinq minutes avec 1ml de trypsine (0,25%). L'activité de la trypsine est inhibée par l'ajout de 9ml de DMEM complet contenant 2 μ g/ml de tétracycline. Les cellules sont comptées et sont transférées dans des pétris de 100mm à une densité de deux millions par pétri. Le lendemain, le milieu de culture des cellules est changé pour du milieu de sélection (milieu complet contenant 50 μ g/ml d'hygromycine, 200 μ g/ml de néomycine, 2 μ g/ml de tétracycline et 100mM HEPES (pH7,4)). Les cellules ayant incorporé les deux vecteurs du système inductible à la tétracycline expriment les protéines permettant la résistance à l'hygromycine et la néomycine. Le milieu de culture des cellules sous sélection est changé à tous les deux jours pour du milieu de sélection contenant 10% de milieu conditionné (milieu de culture prélevé de cellules parentales non-transfectées). Ce milieu contient des facteurs qui aide à la croissance des cellules. La formation de clone se produit après environ dix jours de sélection. Lorsque ceux-ci sont en nombre suffisant, les cellules sont lavées deux fois avec 10ml de PBS 1X. Les clones sont prélevés par contact avec des cercles de papier Whatman 3M de 5mm de diamètre imbibés de trypsine. Lorsque le clone cellulaire est décollé, les cellules sont mises en culture dans des plaques de quatre-vingt-seize puits contenant le milieu de sélection conditionné. Lorsque les cellules sont confluentes, elles sont transférées dans des plaques de vingt-quatre puits et par la suite dans des pétris de 100mm. Les cellules sont congelées dans l'azote liquide. Les clones cellulaires utilisés dans cette étude sont nommés M2 et C1.

3.3.3. Induction de l'expression de Vpr.

Les cellules sont mises en culture à une densité de cent mille cellules par pétri de 100mm dans du milieu de sélection. Le lendemain les cellules sont rincées quatre

fois avec 5ml de PBS 1X et du milieu de sélection sans tétracycline est ajouté. Les cellules sont laissées cinq jours et plus en culture pour l'apparition des phénotypes de différenciation.

3.4. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie.

Pour la détermination de la longueur du cycle cellulaire, 2,5 million de cellules sont utilisés. Les cellules sont lavées trois fois au PBS 1X froid et sont resuspendues dans une solution de perméabilisation (PBS contenant 0,1% de citrate de sodium, 0,1% de Triton X-100 et 50µg/ml de RNase A). Les cellules sont incubées une heure à 37°C, sont transférées dans des tubes de polypropylène servant à la lecture au FACS et l'iodure de propidium est ajouté à une concentration finale de 50µg/ml. Les cellules sont analysées immédiatement au FACS (FACScan, Becton Dickinson N.-J.) par le programme Consort 30. L'analyse du cycle cellulaire est effectuée sur dix mille cellules.

4. Analyse des protéines.

4.1. Anticorps.

Un sérum de lapin pré-immun est utilisé lors des expériences d'immunoprécipitation afin de minimiser la formation de complexes immuns non-spécifiques (SIGMA-Aldrich Canada Ltd. Mississauga, Ont.).

L'antirérum reconnaissant Vpr (R3.7) a été isolé de lapins injectés avec la protéine Vpr recombinante produite chez *E.coli* (Lavalée *et al.*, 1994). Lors de l'immunofluorescence, l'anticorps est dilué cent fois. Lors de l'immunoprécipitation, l'anticorps est dilué environ huit fois.

L'anticorps secondaire (anti IgG de lapin produit chez la chèvre) utilisé en immunofluorescence est couplé à un fluorochrome soit le FITC (fluorescein isothiocyanate). Lors des expériences d'immunofluorescence, cet anticorps est dilué mille fois (anti IgG de lapin produit chez la chèvre).

L'anti-p24 du VIH-1 a été produit chez le lapin. L'anticorps secondaire est produit chez la chèvre et est dirigé contre les IgG de lapin. Cet anticorps est couplé à la peroxidase (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program).

4.2. Immunofluorescence indirecte.

4.2.1. Vpr.

Vingt mille cellules sont déposées dans des vials contenant une lamelle de 1cm de diamètre. Les cellules sont induites pour l'expression de Vpr par remplacement du milieu de sélection pour du milieu ne contenant pas de tétracycline. Suivant une induction de soixante-douze heures, les cellules sont fixées à l'acétone pendant trente minutes. Les lamelles auxquelles les cellules ont adhéré sont récupérées et sont incubées trente minutes dans du PBS contenant 2% de lait (Carnation) permettant la saturation des sites non-spécifiques. Les lamelles sont déposées sur 20µl de l'anti-Vpr. Les cellule sont incubées avec l'anticorps pendant dix-huit heures à 37°C. Le lendemain, les lamelles sont rincées trois fois dans du PBS-lait et sont incubées avec l'anticorps secondaire soit l'antisérum de chèvre dirigé contre les IgG de lapin. L'incubation avec cet anticorps se fait pendant deux heures à 37°C. Les cellules sont rincées trois fois avec du PBS-lait et une fois dans du PBS avant le montage des lamelles avec un milieu contenant du glycérol (10% PBS 1X, 90% glycérol). L'émission de fluorescence du FITC est observée par microscopie à un grossissement de 20X (Axioskop 20 de la compagnie Zeiss, Allemagne).

4.3. Marquage métabolique.

Suivant l'induction de l'expression de Vpr, les cellules des clones M2 et C1 sont lavées trois fois avec 5ml de PBS 1X. Les cellules sont incubées une heure avec 2,5ml d'un milieu de carence (milieu sans méthionine) contenant 10% de sérum décomplémenté dialysé. Suivant la carence, le milieu est remplacé par 2,5ml de ce même milieu contenant 50µCi/ml de méthionine radiomarquée au [³⁵S] (1000Ci/mmol) (ICN Radiochemicals, Irvine, CA.). Les cellules sont incubées à 37°C pendant six heures et sont rincées trois fois avec 5ml de PBS 1X. Le tapis cellulaire est gratté à l'aide d'un policeman et récupéré dans un eppendorf. Les cellules sont lysées par l'ajout de 800µl de RIPA (140mM NaCl, 8mM Na₂HPO₄, 2mM NaH₂PO₄, 1% NP-40, 0,5% DOC, 0,05% SDS) et le lysat est congelé à -20°C.

4.4. Immunoprécipitation.

Le lysat cellulaire des cellules radiomarquées est décongelé sur glace. La centrifugation des lysats cellulaires à 14 000rpm (rotor F-12/M.18, centrifugeuse MC12C, Sorvall, DUPONT Canada, Mississauga, Ont.) pendant une heure à 4°C

permet le culottage du matériel insoluble soit l'ADN et les membranes. Le surnageant est transféré dans un nouvel eppendorf et 5µl de sérum de lapin pré-immun sont ajoutés. Le lysat est incubé pendant deux heures avec le sérum pré-immun et les anticorps sont précipités par l'ajout de 60µl de protéine A-sépharose. Le surnageant est récupéré suite à une centrifugation de cinq minutes à 14 000rpm (rotor F-12/M.18, centrifugeuse MC12C, Sorvall, DUPONT Canada, Mississauga, Ont.) et incubé dix-huit heures avec 10µl de sérum de lapin dirigé contre la protéine Vpr (R3.7). Le complexe immun est précipité par l'ajout de 60µl de protéine A-sépharose. Le culot est récupéré et lavé trois fois avec 800µl de RIPA ne contenant pas de DOC suivant la centrifugation à 4°C pendant cinq minutes. Le culot est finalement lavé avec 800µl de Tris-NaCl (50mM Tris, 150mM NaCl, (pH7,2)) et resuspendu dans 25µL de tampon de chargement (50mM Tris (pH6,8), 100mM DTT, 2% SDS, 0,1% bleu de bromophénol, 10% glycérol). L'électrophorèse est effectuée dans un gel de gradient de 18% à 12,5%. Le signal est quantifié par analyse densitométrique par le programme ImageQuant (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA.).

4.5. Chromatographie d'affinité.

Les protéines GST (glutathione S-transférase) et GST-TFIIB ont été produites chez *E. coli*. La colonne a été préparée en liant les protéines GST et GST-TFIIB aux billes d'agarose-glutathione (Sigma). Le glutathione est le substrat naturel de la protéine GST. Les protéines Vpr mutantes ont été synthétisée *in vitro* dans un volume final de 50ml en présence de ³⁵S-méthionine (>1000Ci/mmol, Amersham), à l'aide du système TNT (Promega). Un aliquot de 5ml a été utilisé afin de tester la liaison à la protéine GST-TFIIB. Les essais de liaison de Vpr à TFIIB ont été effectués à 4°C pendant deux heures dans un tampon contenant 50mM Tris-HCl (pH7.6), 150mM NaCl, 0,02% Tween-20 et l'albumine bovine sérique (200µg/ml). Les billes d'agarose ont été lavées dans un tampon contenant 50mM Tris-HCl (pH7.6), 150mM NaCl, 0,02% tween-20 avant l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturantes.

5. Essais enzymatiques.

5.1. Essai de l'activité de la chloramphénicol acétyl transférase.

Le protocole de l'essai de la chloramphénicol acétyl transférase a été décrit en détails ailleurs (Gorman *et al.*, 1982). Les cellules ayant été transfectées par un vecteur d'expression de la protéine CAT sont récoltées par centrifugation et le culot est resuspendu dans 150µl de Tris 250mM (pH7,5). Les cellules sont lysées par trois séries de congélation/décongélation dans la glace sèche et à 37°C. Le surnageant contenant les protéines est clarifié afin d'enlever les débris cellulaires et l'ADN. Les acétylases endogènes sont inactivées par incubation à 65°C pendant dix minutes et le surnageant est clarifié par centrifugation. La concentration de protéines est évaluée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). La quantité de protéine utilisée est équivalente pour chacun des échantillons d'une même expérience (100 à 500µg). Un volume total de 70µl de lysat cellulaire est utilisé pour l'essai de l'activité CAT. Le lysat cellulaire est incubé à 37°C avant l'ajout de 10µl du mélange réactionnel (10µl d'acétyl coenzyme A (20mg/ml) (Pharmacia Biotech Inc, Baie d'Urfée, Qué.) et 1,1µl de chloramphénicol radiomarqué au [¹⁴C] (1µCi/µl) (ICN Radiochemicals, Irvine, CA.). La moitié de la réaction enzymatique est arrêtée après trente minutes d'incubation par ajout de 1ml d'acétate d'éthyle. Le reste de la réaction est arrêté après soixante minutes. La phase organique contenant le substrat (chloramphénicol) est récupérée et est évaporée sous vide. Le substrat est resuspendu dans 20µl d'acétate d'éthyle et est apposé sur une plaque de silice afin d'effectuer la chromatographie (60F254, EM Science, Gibbstown, N.-J.). La chromatographie se fait par ascension d'un solvant polaire (95% chloroforme, 5% méthanol) qui entraîne le substrat acétylé dans sa migration. La séparation de substrat acétylé du non-acétylé s'effectue pendant trente minutes dans une chambre saturée de solvant. La plaque de chromatographie est séchée et est mise en contact avec un film pour l'autoradiographie. Les sections de la plaque correspondant au substrat acétylé et au substrat non-acétylé sont découpées, mise dans des vials contenant un liquide à scintillation (CytoScint, ICN, Montréal, Qué.) et sont comptées au compteur Beta. L'activité de la protéine CAT est déterminée par le pourcentage d'acétylation (cpm du substrat acétylé/(cpm du substrat acétylé + cpm du substrat non-acétylé)). L'activité CAT est dans la plupart des cas exprimée par le pourcentage d'acétylation/minute (moyenne des pourcentage d'acétylation par minute obtenus à trente minutes et à soixante minutes).

6. Infections.

6.1. Préparation virales.

Les préparations virales servant à l'infection sont obtenues par transfection transitoire de cellules 293T par les clones moléculaires HxBruR+/Env- ou HxBruR-/Env- avec l'expresseur de l'enveloppe G de VSV. Trois pétris de 140mm à une densité de cinq millions de cellules sont transfectés avec 20µg d'ADN/ml chacun selon la méthode de précipité de phosphate de calcium. Soixante-douze heures post-transfection, le surnageant des cellules est récolté et centrifugé à 3 000rpm (rotor GH3.7, centrifugeuse GS-6R, Beckman Instruments Canada Inc., Mississauga, Ont.) pendant trente minutes afin de sédimenter les cellules associées. Ce surnageant ainsi clarifié est ultracentrifugé à 45 000rpm (rotor 70Ti., ultracentrifugeuse L8-5B, Beckman Instruments Inc., Mississauga, Ont.) à 4°C pendant une heure. Le culot de virus est resuspendu dans 500 à 1000µl de milieu de culture contenant 20% de sérum de veau foétal et est filtré à l'aide d'un filtre de 0,2 micron.

Lorsque requis, le virus est purifié par coussin de sucrose. Cette technique permet la séparation de particules selon leur densité. Deux millilitres de sucrose 60% sont déposés dans le fond d'un tube de polypropylène de 10 ml, et 3ml de sucrose 20% sont ajoutés au dessus. La préparation virale filtrée est déposée sur le sucrose 20% et le tube est rempli de milieu de culture. Le virus est ultracentrifugé à 32 000rpm (rotor SW41, ultracentrifugeuse L8-5B, Beckman Instruments Canada Inc., Mississauga, Ont.) pendant trois heures à 4°C dans des godets oscillants. Le virus, sédimenté entre les deux couches de sucrose sous forme d'anneau blanc, est récupéré avec une pipette de transfert. Le sucrose est éliminé de la suspension virale par dilution avec 10ml de milieu RPMI. Le virus est récupéré par ultracentrifugation à 45 000rpm (rotor 70Ti., ultracentrifugeuse L8-5B, Beckman Instruments Inc., Mississauga, Ont.) pendant deux heures à 4°C.

6.2. Titrage des préparations virales.

Le nombre de particules virales infectieuses dans la préparation virale est déterminé par l'essai MAGI (Multinuclear Activation of Galactosidase Indicator Cells) (Kimpton & Emerman, 1992). Les cellules HeLa-CD4-LTR-β-gal sont mises dans des puits de 6mm à une densité de 300 000 cellules par puit. Le lendemain, les dilutions du virus sont préparées, le milieu de culture des cellules est enlevé et un volume de 150µl de chaque dilution du virus est ajouté. L'adsorption du virus sur les

cellules est laissée pendant deux heures et est suivie d'une série de lavages. L'expression de l'enzyme β -galactosidase en quantité suffisante n'est possible que lorsque la protéine Tat est exprimée et donc lorsque les étapes précoces et tardives de l'infection sont complétées. L'expression de la β -gal est détectée par la coloration bleue des cellules en présence du substrat (X-gal). Le nombre de cellules bleues indique le nombre de particules virales infectieuses.

6.3. Mesure de l'antigène p24.

La mesure de l'antigène p24 indique la quantité de virus produite par les cellules. Dans un premier temps, le surnageant des cellules est clarifié afin d'éliminer les débris cellulaires. Par la suite, les échantillons sont lysés avec un dixième de volume de Triton X-100 (10% dans l'eau) et sont déposés dans les puits d'une plaque de quatre-vingt seize puits. Cette opération permet l'adsorption des protéines à la plaque. Un anticorps primaire (anti-p24 produit chez le lapin) est mis en contact pendant une heure avec les protéines adsorbées. L'anticorps secondaire (anti-IgG de lapin produit chez la chèvre couplé à la peroxidase) est mis en contact par la suite. Le substrat de la peroxidase est ajouté, incubé trente minutes et la réaction est arrêtée. Ces différentes étapes requièrent plusieurs séries de lavages. La réaction produit une couleur dont l'intensité est mesurée par la densité optique à une longueur d'onde de 450nm. Une réaction est effectuée parallèlement avec des quantités connues de l'antigène p24 qui permet d'évaluer la concentration de p24 dans l'échantillon en fonction de la densité optique.

6.4. Essai de l'activité de la Transcriptase Inverse.

La détermination de l'activité de la transcriptase inverse est effectuée sur 50 μ l de surnageant de cellules infectées (dilué ou non) (Yao *et al.*, 1993). Ce surnageant est ajouté à un mélange réactionnel contenant des détergents, des ions, une matrice ainsi que la déoxythymidine 5'-triphosphate radiomarquée au tritium (ICN Radiochemicals, Irvine, CA.) et incubé pendant vingt-deux heures à 33°C. Le mélange réactionnel contient une concentration finale de 50mM Tris (pH 7,9), 5mM MgCl₂, 150mM KCl, 0,5mM EGTA, 0,05% Triton X-100, 2% éthylène glycol, 5mM DTT, 3mM glutathione réduit, 50 μ g/ml de poly(rA)-Oligo(dT) et 20 μ Ci de [³H]-dTTP. Les acides nucléiques sont précipités par l'ajout d'acide trichloro acétique (TCA) 10% (dilué dans 0,02M de sodium pyrophosphate) froid et par incubation sur glace pendant deux heures et les nucléotides non-incorporés sont enlevés par

filtration. Les filtres sont rincés deux fois avec du TCA 5% et une fois avec de l'éthanol 100%. Les filtres sont séchés, mis dans des vials contenant du liquide à scintillation et la radioactivité est comptée à l'aide du compteur Beta.

6.5. Infection des lymphocytes T CD4+.

L'infection des cellules Jurkat, par les virus pseudotypés avec l'enveloppe G de VSV requiert l'utilisation de 10 particules virale infectieuses par cellule (multiplicité d'infection de 10). Les cellules sont centrifugées à 1 200rpm (rotor 1175338, centrifugeuse C4-12, Jouan Inc., Winchester, VI.) pendant dix minutes et sont resuspendues dans 500µl. Le virus est ajouté aux cellules et incubé deux heures à 37°C avec agitation occasionnelle. Dix millilitres de RPMI complet sont ajoutés et l'incubation est poursuivie pendant deux heures. A la fin de l'incubation, les cellules sont centrifugées à 1 200rpm (rotor 1175338, centrifugeuse C4-12, Jouan Inc., Winchester, VI.) pendant dix minutes et 40 ml de milieu RPMI complet sont ajoutés. Les cellules sont récoltées à différents temps suivant l'infection (douze, vingt-quatre, trente et cinquante heures).

7. Quantification de l'ADN et de l'ARN.

7.1. Quantification de l'ADN.

7.1.1. Isolation de l'ADN total des cellules de mammifère.

Le culot de cellules (un à dix millions de cellules) est resuspendu dans 500µl de tampon de lyse (20mMTris (pH8,5), 100mM KCl, 0.8% NP-40). Le lysat est incubé avec la Protéinase K (0,1mg/ml) pendant quatre heures à 55°C afin de digérer les protéines cellulaires. La protéinase K est inactivée par incubation des échantillons pendant quinze minutes dans l'eau bouillante.

7.1.2. PCR semi-quantitatif.

Les réactifs servant à l'amplification sont préparés sous forme de solution mère contenant 2,5mM MgCl₂, 1X PCR buffer II (0,5M KCl, 0,1M Tris (pH8,3)), 0,25mM de chacun des dNTPs, 1,25U d'AmpliTaq Polymerase. Cette solution mère est séparée en deux et 10pmol des oligonucléotides sens et antisens du gène cible sont ajoutés dans une des moitiés alors que les oligonucléotides du gène cellulaire contrôle sont ajoutés dans l'autre. Trente-cinq microlitres des réactifs servant à l'amplification

du gène cible ou du gène cellulaire sont ajoutés dans des eppendorfs à PCR contenant 50µl d'huile minérale. Quinze microlitres du lysat cellulaire (dilué ou non) sont utilisés pour l'amplification. L'amplification s'effectue dans l'appareil à PCR pendant trente-cinq cycles d'une minute à 94°C, trente secondes à 55°C et une minute à 72°C, suivie d'une période d'élongation finale des produits d'amplification de sept minutes à 72°C.

7.2. Quantification de l'ARN.

7.2.1. Isolation de l'ARN total.

Toutes les solutions utilisées sont traitées avec le diéthyl pyrocarbonate (0,1% DEPC) qui inhibe les RNases. Les cellules sont culottées dans des tubes de polypropylène et resuspendues dans le Trizol (Gibco BRL, Burlington, Ont.) à une concentration d'un million de cellules par millilitre de Trizol. La lyse s'effectue à température de la pièce pendant cinq minutes. Deux cent microlitres de choloforme par millilitre de Trizol utilisé sont ajoutés et mélangés au lysat. A cette étape, l'ARN s'associe à la phase aqueuse. Suite à une incubation de trois minutes à la température de la pièce, les phases sont séparées par centrifugation à 4°C pendant quinze minutes. Le surnageant est transféré dans un nouvel eppendorf et est extrait deux fois avec un volume équivalent de phénol/chloroforme (un volume de phénol saturé dans l'eau + un volume de chloroforme) puis de chloroforme seul. Les acides nucléiques contenus dans la phase aqueuse sont précipités avec l'isopropanol pendant une heure à -80°C (0,5ml d'isopropanol/ml de Trizol initialement utilisé). L'ARN est récolté par centrifugation à 12 000rpm (rotor F-12/M.18, centrifugeuse MC12C, Sorvall, DUPONT Canada Inc., Mississauga, Ont.) pendant trente minutes et le culot d'ARN est lavé avec l'éthanol 70%. Le culot d'acides nucléiques est traité à la DNase afin d'enlever toute trace d'ADN contaminant. Pour ce faire, le culot d'ARN est resuspendu dans 500µl de tampon de digestion de la DNase (0.1M NaOAc, 5mM MgSO₄, (pH5.0)) auquel 20U de DNase RQ1 (Promega, Madison, Wisconsin) sont ajoutés. La digestion de l'ADN s'effectue pendant quatre heures à 25°C. La DNase est inactivée par deux extractions avec le phénol/chloroforme et une extraction avec le chloroforme. L'ARN est précipité par l'ajout d'un dixième de volume d'acétate d'ammonium (3M) et deux volumes d'éthanol 100%. L'ARN est récupéré par centrifugation à 12 000rpm (rotor F-12/M.18, centrifugeuse MC12C, Sorvall, DUPONT Canada Inc., Mississauga, Ont.) et lavé à l'éthanol 70%. Le culot est

resuspendu dans 50µl d'eau traitée au DEPC. La concentration de l'ARN est évaluée par la mesure de l'absorption à 260nm dans le spectre des ultraviolets et son intégrité est évaluée par électrophorèse en gel d'agarose-formaldéhyde (0,30g d'agarose dans 30ml d'eau traitée au DEPC contenant du MOPS 1X et 5% de formaldéhyde). L'électrophorèse du gel s'effectue dans du tampon MOPS 1X (20mM MOPS, 5mM NaOAc, 1mM EDTA, (pH7,0)). L'ARN est visualisé par l'incubation du gel avec de l'eau traitée au DEPC contenant 1µg/ml de bromure d'éthidium.

7.2.2. RT-PCR semi-quantitatif.

Vingt microgrammes d'ARN total sont précipités pour la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Une solution mère contenant les réactifs nécessaires à la rétrotranscription est faite au préalable. Ce mélange contient 5mM MgCl₂, 1X PCR buffer II (0,5M KCl, 0,1M Tris (pH8,3)), 1mM de chacun des dNTPs, 0,5U/µl d'inhibiteurs de RNase, 1,7U/µl de transcriptase inverse du virus de la leucémie murine (VLM) et 10pmol de chacun des oligonucléotides antisens soit l'oligonucléotide complémentaire à l'ARN cible et l'oligonucléotide complémentaire à l'ARN cellulaire contrôle (GAPDH). L'ARN précipité est resuspendu dans 60µl de cette solution mère et transféré dans un eppendorf à PCR de 0,5ml contenant 60µl d'huile minérale. La réaction de rétrotranscription s'effectue pendant trente minutes à 42°C suivi d'une période d'inactivation de l'enzyme de cinq minutes à 99°C dans un appareil à PCR (Perkin Elmer Cetus). Cette réaction permet à l'ARN cible et l'ARN cellulaire contrôle d'être rétrotranscrits en ADN double brin (ADNc). Un dixième de l'ADNc est utilisé pour l'amplification.

Les réactifs servant à l'amplification sont préparés sous forme de solution mère contenant 2mM de MgCl₂, 1X PCR buffer II, 2,5U d'AmpliTaq Polymerase. Cette solution mère est séparée en deux et 10pmol des oligonucléotides sens et antisens spécifiques de l'ADNc cible sont ajoutés dans une des moitiés alors que les oligonucléotides spécifique de l'ADNc cellulaire contrôle sont ajoutés dans l'autre. Quarante-quatre microlitres des réactifs servant à l'amplification de l'ADNc cible ou de l'ADNc cellulaire sont ajoutés dans des eppendorfs à PCR contenant de l'huile minérale. Six microlitres d'ADNc sont ajoutés dans le tube servant à l'amplification de l'ADNc cible de même que dans le tube servant à l'amplification de l'ADNc cellulaire. Avant d'être amplifiés, les produits sont dénaturés deux minutes à 95°C dans l'appareil à PCR. L'amplification s'effectue pendant trente-cinq cycles d'une

minute à 95°C et une minute à 60°C suivi d'une période d'élongation finale des produits d'amplification de sept minutes à 72°C.

7.3. Oligonucléotides servant au PCR et RT-PCR semi-quantitatif.

L'ARN du gène de la glycéraldéhyde-3 phosphate déhydrogénase (*GAPDH*) sert de contrôle cellulaire lors de la réaction de RT-PCR semi-quantitatif. Les oligonucléotides utilisés amplifient un fragment de 510 paires de bases couvrant la séquence 436 à 946 du gène *GAPDH* humain (+1: site d'initiation de la transcription) (numéro d'accèsion à Gene Bank: M33197) (*GAPDH* sens: 5'-GCTGATGCCCCC-ATGTTTCGT-3', *GAPDH* anti-sens: 5'-CAAAGGTGGAGGAGTGGGTGT-3'). Le gène cellulaire du sous-type β 2 du récepteur adrénergique (β 2-*AR*) est utilisé comme contrôle cellulaire interne lors de la réaction de PCR semi-quantitatif. Un fragment de 399 paires de bases est amplifié correspondant à la séquence 1465 à 1821 du gène humain (+1: site d'initiation de la transcription) (numéro d'accèsion à Gene Bank: Y00106) (β 2-*AR* sens: 5'-TAGGCCTTCAAAGAAGACCTGC-3', β 2-*AR* anti-sens: 5'-CGTCTACTCCAGGGTCTTTCAG-3').

Les ARN ou gènes cibles sont ceux du gène *CAT*, du promoteur SL3-3 et du gène *gag*. Le fragment amplifié de l'ARN messager *CAT* couvre les séquences 1 à 116 du gène (+1: site d'initiation de la transcription) (*CAT* sens: AAGGAATCTAGA-ATGGAGAAAAAATC-3', *CAT* anti-sens: CAGCTGAACGGTCTGGTTA-3'). Le fragment amplifié du promoteur SL3-3 couvre les séquences -432 à +27 du promoteur (+1: site d'initiation de la transcription) (SL3-3 sens: 5'-GCCATTTTCGCG-AGGCATG-3', SL3-3 anti-sens: 5'-CTCAGTCAAGCTTAGGACTGG-3'). Le fragment de 114 paires de bases amplifié du gène *gag* ou de l'ARN messager couvre la séquence 1090 à 1204 selon la souche HxBru (+1: site d'initiation de la transcription) (*gag* sens: ATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAAT-3', *gag* anti-sens: 5'-TTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAGAATGC-3').

7.4. Transfert de Southern et hybridation.

La technique de transfert d'ADN et d'hybridation est basée sur le protocole de Southern (Southern, 1975). Suite à l'électrophorèse, l'ADN est hydrolysé en petits fragments par traitement à l'acide et est dénaturé par traitement à la soude. L'ADN est transféré par le principe de capillarité. La haute concentration de sels permet l'entraînement de l'ADN vers le support de polyamine (Zeta-Probe GT, BIO-RAD, Mississauga, Ont.). L'ADN est lié à la membrane par irradiation aux UV (UV

Stratalinker 1800, Statagene, La Jolla, CA.). L'hybridation est effectuée pendant six heures à 65°C avec 500 000cpm/ml d'une sonde radiomarquée au [³²P].

7.5. Sondes.

Les sondes utilisées afin de détecter la séquence de *CAT*, SL3-3, *gag*, *GAPDH* et *β2-AR* sont obtenues soit par phosphorylation de l'extrémité d'oligonucléotides monocaténares par la T4 polynucléotide kinase en utilisant de l'ATP radiomarqué au [³²P] à la position γ (*CAT*, *gag* et *β2-AR*) (Berkner & Folk, 1977) ou par initiation aléatoire de la polymérisation (SL3-3 et *GAPDH*) (Feinberg & Vogelstein, 1983).

Dans le cas de la séquence de *CAT*, un oligonucléotide sens couvrant la séquence 30 à 58 (+1: site d'initiation de la transcription) est utilisé pour l'hybridation (5'-CCACCGTTGATATATCCCAATCGCATCGT-3'). Dans le cas de *β2AR*, un oligonucléotide couvrant la séquence 1514 à 1548 (+1: site d'initiation de la transcription) du gène est utilisé pour l'hybridation (5'-CATGTCCAGAACCTTAGC-CAGGTGGAGCAGGATG-3'). Dans le cas de *gag*, un oligonucléotide sens couvrant la séquence 1032 à 1062 (selon HxBru, +1: site d'initiation de la transcription) du gène est utilisé (5'-AATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGA-AT-3'). Dans chacun des cas, les oligonucléotides reconnaissent une séquence interne au fragment amplifié, s'assurant ainsi de la spécificité de ce fragment.

Le fragment d'ADN utilisé pour la production de la sonde reconnaissant le promoteur SL3-3 provient de la digestion du plasmide pGEMSL3CAT/Eco par l'enzyme *HindIII*. Le fragment d'ADN utilisé pour la création de la sonde servant à la reconnaissance de *GAPDH* provient de la digestion du plasmide pGEMGAPDH par l'enzyme *PstI*. La digestion par ces enzymes permet de recueillir un fragment d'ADN correspondant au promoteur SL3-3 entier et au gène *GAPDH* entier. Ces fragments sont purifiés par la méthode de GeneClean. Cent nanogrammes sont utilisés pour produire une sonde par la méthode d'initiation aléatoire de la polymérisation. Dans un premier temps, l'ADN est dénaturé par incubation dans l'eau en ébullition. L'ADN est hybridé avec des hexamères contenant une séquence variable et la polymérisation est initiée par ajout du fragment Klenow de l'ADN Polymérase I de *E. coli* et des dNTPs dont le [³²P]-dCTP.

8. Réactifs utilisés.

L'activation du récepteur des glucocorticoides est réalisée par ajout de 50nM de dexaméthasone (dilué dans l'éthanol) dans le milieu de culture des cellules. Ce

milieu contient du sérum de veau foétal auquel les hormones endogènes ont été enlevées par le charbon activé. Ce sérum est préparé par incubation pendant trente minutes avec 0,125g de charbon activé, 0,125g de dextran (T-70) (Pharmacia Biotech Inc., Baie d'Urfée, Qué.)

Chapitre 3

Identification du mécanisme et des domaines impliqués dans la fonction de transactivation de la protéine Vpr du virus d'immunodéficience humaine de type 1.

1. Introduction.

Le rôle de la protéine Vpr dans le cycle de réplication du virus d'immunodéficience humaine n'est pas clairement défini. L'analyse des fonctions de cette protéine a permis de mettre en évidence la contribution de Vpr dans l'augmentation et la facilitation de la réplication du virus chez les lymphocytes T et les macrophages (Ogawa *et al.*, 1989; Cohen *et al.*, 1990b; Westervelt *et al.*, 1992; Balotta *et al.*, 1993; Balliet *et al.*, 1994; Connor *et al.*, 1995). Une augmentation de l'expression d'un gène rapporteur causée par Vpr est également constatée lors de l'utilisation d'un système d'expression transitoire chez les lymphocytes T (Cohen *et al.*, 1990b). Ce phénomène, appelé transactivation, a été observé indépendamment du promoteur utilisé. D'autre part, des études ont montré que Vpr pouvait coopérer avec plusieurs activateurs de la transcription dont VP16 du virus de l'herpes, E1a des adénovirus ainsi qu'avec les facteurs de transcription cellulaire, SP1 et TFIIB (Agostini *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 1995). Le mécanisme moléculaire par lequel Vpr exerce cette fonction de transactivation est par contre, mal compris. De plus, la relation entre la capacité de Vpr à transactiver des promoteurs et sa capacité à stimuler la réplication virale demeure peu comprise. Au cours de cette étude j'utiliserai la capacité de Vpr à transactiver de façon transitoire le LTR du VIH-1 et le LTR SL3-3 du virus de la leucémie murine (VLM) afin de clarifier le mécanisme par lequel Vpr augmente l'expression de gènes. Une analyse des régions de la protéine impliquées dans cette fonction sera également présentée dans ce travail. Finalement je tenterai brièvement d'établir un parallèle entre la transactivation observée par le système d'expression transitoire et l'augmentation de l'expression virale chez les lymphocytes T et les macrophages. L'identification du mécanisme de transactivation de gènes hétérologues nous permettra de mieux comprendre comment Vpr augmente la réplication virale chez les lymphocytes T CD4+ et les macrophages.

2. Objectif.

L'objectif de cette étude est d'analyser la fonction de transactivation de la protéine Vpr du virus d'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Cette étude consiste à déterminer le mécanisme de transactivation de la protéine ainsi que les domaines ou structures de la protéine impliqués dans cette fonction. Une analyse corrélationnelle entre les différentes propriétés et fonctions de la protéine sera également présentée. Finalement, une étude préliminaire du mécanisme d'augmentation de la production virale chez les lymphocytes T sera présentée.

3. Résultats

3.1. Les niveaux d'ARN messenger du gène rapporteur CAT sont augmentés par Vpr.

Vpr augmente l'expression des gènes viraux et du gène rapporteur de la chloramphénicol acétyl transférase *in vivo*. Afin d'analyser le mécanisme par lequel Vpr exerce cette fonction, nous avons utilisé la capacité de Vpr à augmenter l'expression du gène CAT sous le contrôle soit du LTR du VIH-1 ou du LTR SL3-3 du VLM. La méthode utilisée est basée sur la co-transfection de lymphocytes T (Jurkat) avec un expresseur de la protéine Vpr (SCVMVBruR) ou un expresseur contrôle (SVCMBruRATG-) et avec une construction codant pour la protéine CAT sous le contrôle du LTR du VIH-1 (IICAT) ou du LTR SL3-3 du VLM (pSU3CAT). Soixante-douze heures suivant la transfection, les cellules sont récoltées et les protéines sont isolées à partir d'un tiers des cellules afin d'évaluer l'activité de la protéine CAT. L'ADN et l'ARN total sont isolés des deux-tiers restant. Les quantités d'ADN plasmidique du gène rapporteur CAT sont évaluées par PCR semi-quantitatif et les quantités d'ARN messenger correspondant sont évaluées par RT-PCR semi-quantitatif.

Les données de la figure 1A représentent la transactivation du LTR du VIH-1 et du LTR SL3-3 du VLM par Vpr. Ces données représentent la moyenne de quatre et neuf expériences indépendantes respectivement. L'expression de la protéine CAT exprimée ici par son activité enzymatique est augmentée de 2,9 à 7,0 fois en présence de Vpr lorsque le LTR du VIH-1 est utilisé pour diriger l'expression du gène CAT. Cette augmentation est de 5,1 à 11,6 fois pour le LTR SL3-3 du VLM.

La quantification de l'ARN messenger de CAT par la méthode de RT-PCR semi-quantitatif montre que son niveau est augmenté dans les cellules exprimant Vpr comparativement à celles transfectées avec le contrôle négatif ATG- (figure 1B). Une expérience représentative est illustrée à la figure 1B. La quantification par analyse densitométrique du signal obtenu à partir de l'autoradiogramme indique que cette augmentation est de l'ordre de 2,0 fois lorsque le LTR du VIH-1 contrôle l'expression du gène CAT (IICAT) et est de l'ordre de 4,2 fois pour le LTR SL3-3 du VLM (pSU3CAT) (figure 1B). Dans chacune des expériences, les niveaux d'ARN messagers de CAT sont normalisés avec ceux de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Les niveaux de l'ARN messenger cellulaire GAPDH sont stables et servent à normaliser ceux d'un ARN messenger variable. Les données

illustrées à la figure 1B montrent clairement que les niveaux d'ARN messagers mesurés pour IIIICAT et pSU3CAT augmentent tout comme l'activité CAT mesurée (figure 1A). Les niveaux ne sont par contre, pas parfaitement proportionnels suggérant qu'une fonction post-transcriptionnelle peu également entrer en jeu.

Nous avons envisagé la possibilité que l'augmentation des niveaux d'ARN messenger puisse être le résultat d'une augmentation de la stabilité de l'ADN CAT co-transfecté avec l'expresser de Vpr. Ce phénomène a déjà été décrit pour la protéine de 19kDa du gène E1b des adénovirus (Herrman & Mathews, 1989). Afin d'éliminer cette possibilité, nous avons amplifié une région du plasmide CAT à partir de l'ADN isolé des cellules transfectées. Le fragment de 495 paires de bases correspond au promoteur SL3-3 et a été amplifié parallèlement à un fragment d'un gène cellulaire, soit celui du sous-type $\beta 2$ du récepteur adrénérique ($\beta 2$ -AR) qui sert de contrôle cellulaire interne d'amplification. Cette expérience indique que les cellules transfectées avec l'expresser de Vpr possèdent des niveaux d'ADN plasmidiques CAT, similaires à ceux des cellules transfectées par le contrôle négatif ATG-. Ainsi, le ratio SL3-3/ $\beta 2$ -AR est de 0,86 pour les cellules exprimant Vpr et de 1,26 pour les cellules contrôles (figure 1C).

Ces résultats indiquent que Vpr transactive en augmentant les niveaux d'ARN messagers et non en stabilisant l'ADN plasmidique du gène rapporteur. Ces résultats ont été observés lors de trois expériences indépendantes de quantification par PCR en utilisant deux promoteurs différents soit le LTR du VIH-1 et le LTR SL3-3 du VLM.

3.2. Un haut niveau d'activité basale du LTR du VIH-1 et du LTR SL3-3 du VLM permet la transactivation des promoteurs par Vpr.

Un complexe entre Vpr et une protéine de 41kDa (RIP-1) interagissant avec le récepteur des glucocorticoides activé a été mis en évidence par le passé (Refaeli *et al.*, 1995). Nous avons voulu déterminer l'importance de la voie des glucocorticoides dans la fonction de transactivation de Vpr. A cette fin, nous avons transfecté des cellules HeLa avec l'expresser du gène rapporteur CAT (pSU3CAT) et l'expresser de Vpr (SVCMBruR) ou du contrôle négatif (SVCMBruRATG-). Vingt-quatre heures suivant la transfection, les cellules ont été mises en présence d'un activateur de la voie des glucocorticoides, la dexaméthasone, à une concentration de 50nM (Celandier *et al.*, 1988). Les cellules ont été récoltées vingt-quatre heures plus tard et l'essai CAT effectué tel que décrit précédemment. Les résultats de la figure 2A indiquent que la transactivation du LTR SL3-3 du VLM par Vpr est très faible dans

les cellules HeLa. Lorsque les cellules exprimant Vpr sont mises en présence de dexaméthasone, une augmentation de l'expression de CAT représentant 51 fois celle du contrôle négatif est observée (figure 2A). Cette augmentation est d'environ deux (1,7) fois supérieure à celle mesurée pour le contrôle négatif mis en présence de dexaméthasone (29,6 fois) (figure 2A). Il semble donc qu'une coopération entre les glucocorticoides et Vpr puisse exister.

Nous avons voulu clarifier l'importance de chacun des éléments de réponse aux glucocorticoides du LTR SL3-3 du virus de la leucémie murine dans la fonction de transactivation de Vpr. Nous avons utilisé à cette fin, des constructions où le premier (AB7), le second (AB2) et le troisième (AB3) élément de réponse aux glucocorticoides du promoteur SL3-3 a été muté par insertion d'un oligonucléotide de 8 paires de bases contenant le site *Bgl*III (figure 2; chapitre 2). Des constructions ont été utilisées où la distance entre le premier et le deuxième (AB16) de même qu'entre le deuxième et le troisième (AB17) élément de réponse aux glucocorticoides a été augmentée par insertion de ce même oligonucléotide. Ces promoteurs mutés contrôlent l'expression du gène CAT. Des cellules Jurkat ont été co-transfectées avec chacune des constructions ainsi qu'avec les plasmides exprimant Vpr ou le contrôle négatif ATG-. Les cellules ont été récoltées soixante-douze heures suivant la transfection et la capacité des promoteurs à être transactivés par Vpr a été déterminée par mesure de l'activité CAT. Les résultats de la figure 2B représentent deux expériences indépendantes. L'augmentation de l'activité CAT est exprimée en fonction des résultats obtenus pour le contrôle négatif (ATG-) auquel la valeur 1 a été attribuée. L'analyse des résultats obtenus pour les promoteurs mutés permet de déterminer que la transactivation des promoteurs AB3 (6.7 fois +/-0,6) et AB17 (7,1 fois +/-0,1) est similaire à celle du promoteur SL3-3 sauvage (7,4 fois +/-0,4) (figure 2B). Par contre les promoteurs AB7, AB2 et AB16 ne sont pas transactivés par Vpr. L'augmentation de l'activité CAT mesurée est de 1,4 fois +/-0,6 pour AB7, 1,0 +/-0 pour AB2 et 1,1 fois +/-0,15 celle du contrôle négatif (figure 2B).

Nous avons remarqué que les promoteurs SL3-3 mutants ne pouvant être transactivés par Vpr démontrent un niveau d'activité basale très faible. Par exemple, le niveau d'activité basale du promoteur AB7 (co-transfecté avec le contrôle négatif ATG-) est 6,5 fois (+/-0,5) plus faible que celui du promoteur sauvage SL3-3 (co-transfecté avec le contrôle négatif ATG-) (figure 3A et 3B). Ce phénomène est également observé pour les promoteurs AB2 et AB16 (figure 3A et 3B). Ces résultats indiquent que les mutations introduites au niveau du promoteur SL3-3

diminuant son activité basale, perturbe la capacité de Vpr à transactiver. La transactivation du LTR SL3-3 par Vpr ne s'exerce donc que lorsque le promoteur est capable de soutenir la transcription. La coopération observée entre la dexaméthasone et Vpr pour la transactivation du LTR SL3-3 du VLM, illustrée par la figure 2A, provient fort probablement de la capacité de Vpr à transactiver lorsque le promoteur est déjà activé par le récepteur des glucocorticoïdes. Le niveau basal d'expression du promoteur SL3-3 détermine donc le niveau de transactivation exercé par Vpr.

Afin de déterminer l'importance du niveau d'activité basale du LTR du VIH-1 dans la fonction de transactivation de Vpr, nous avons utilisé le système d'expression transitoire chez les cellules HeLa où le LTR du VIH-1 n'est que faiblement actif. Lorsque les cellules HeLa sont co-transfectées par la construction exprimant Vpr et l'expresseur IICAT, nous ne détectons qu'une augmentation de l'expression de l'activité CAT de 1,2 fois par rapport au contrôle négatif (figure 4, premier panneau). Lorsque la protéine Tat (IIIexTat) est co-exprimée avec Vpr dans les cellules HeLa, nous détectons une augmentation de l'activité CAT de 5,5 fois (+/- 1,4) supérieure par rapport au contrôle négatif (figure 4, deuxième panneau). Les niveaux d'activité CAT sont normalisés selon les contrôles négatifs respectifs afin d'éliminer l'effet de transactivation du LTR du VIH-1 par Tat. Des résultats similaires ont été obtenus chez les lymphocytes T CD4+ (résultats non-présentés). La transactivation mesurée provient vraisemblablement de la transactivation du promoteur de CAT (LTR du VIH-1) et aussi de celui de Tat (LTR du VIH-1) par Vpr. Il semble donc que la transactivation reliée à Vpr soit détectée même en présence du transactivateur puissant que représente la protéine Tat. Une fois de plus, le niveau d'activité basale du promoteur est important pour que Vpr puisse exercer sa fonction.

3.3. Régions de Vpr impliquées dans la fonction de transactivation.

Les interactions entre protéines requièrent l'apport de structures secondaires tel les hélices- α et les feuillets- β (Chou & Fasman, 1978; Garnier *et al.*, 1978). Les acides aminés de ces structures interagissent entre eux selon des attractions hydrophobes ou des attractions de charge qui dépendent de la longueur de leur chaîne latérale. Des mutations ont été introduites dans la séquence de *vpr* afin de déterminer l'importance des structures secondaires et d'acides aminés particuliers de la protéine dans la fonction de transactivation (figure 5A). Les acides aminés ciblés lors de l'analyse mutagénique ont été choisis selon leur conservation parmi les sous-types de

VIH et de VIS. Les résultats sont exprimés selon l'augmentation de l'activité CAT mesurée par rapport au contrôle négatif, auquel la valeur 1 a été attribuée.

L'hélice- α amino-terminale et centrale de même que la région carboxy terminale ont été ciblées par mutagénèse par PCR afin de déterminer leur importance respective dans la fonction de transactivation. Les protéines mutantes ont préalablement été analysées pour leur stabilité, leur localisation nucléaire, leur capacité à être incorporées dans la particule virale ainsi que leur capacité à arrêter le cycle cellulaire (Yao *et al.*, 1998). Les expresseurs de ces protéines mutantes ont été co-transfectés avec le gène rapporteur CAT sous le contrôle du LTR du VIH-1 dans les cellules Jurkat. Les cellules ont été récoltées soixante-douze heures suivant la transfection et l'activité CAT déterminée tel que précédemment décrit. Les résultats ont été exprimés soit en terme d'augmentation de l'activité CAT par rapport au contrôle négatif ATG- auquel la valeur 1 a été attribuée (figure 5B) ou en terme de pourcentage de transactivation par rapport au contrôle positif Vpr sauvage auquel la valeur 100% a été attribuée (tableau 1). Les résultats indiquent que lors de cette expérience, la protéine Vpr de type sauvage augmente l'activité de la protéine CAT par un facteur de 5,0 fois (+/-0,7) (figure 5B). Des acides aminés hydrophobes de l'hélice- α amino-terminale (L23 et A30) ont été substitués pour une phénylalanine, augmentant ainsi l'encombrement stérique causé par la chaîne latérale. Le caractère amphipathique de cette hélice a été modifié par substitution de l'acide glutamique 25 pour un résidu lysine. Les résultats démontrent que les protéines mutantes L23F et E25K transactivent le LTR du VIH-1 d'une manière semblable à la protéine de type sauvage puisqu'une augmentation de 5,3 fois (+/-0,7) et 5,4 fois (+/-1,1) de l'activité CAT est mesurée pour les protéines L23F et E25K respectivement (figure 5B). Par contre, la fonction de transactivation de la protéine mutante A30F est perturbée puisqu'une augmentation de 2,0 fois (+/0,6) seulement de l'activité CAT est mesurée (figure 5B). Les causes de cette diminution d'activité ne semblent pas reliées à l'importance de l'acide aminé A30 dans la fonction de transactivation. La perte d'activité de cette protéine mutante sera abordée plus en détails lors de la discussion présentée au chapitre 5. Les acides aminés de l'hélice- α amino-terminale (L23, E25 et A30) n'apparaissent donc pas requis dans la fonction de transactivation.

L'hélice- α centrale a été altérée de trois manières différentes. Premièrement, la structure de l'hélice- α centrale a été perturbée par la substitution de l'arginine en position 62 pour une proline. Deuxièmement, le caractère amphipathique de l'hélice- α a été changé par la substitution d'acides aminés hydrophobes pour des résidus

polaires (I63K et LI68/70RK). Troisièmement, des mutations ponctuelles ont été créées afin d'augmenter l'encombrement stérique au niveau de cette hélice (V57L, I63F).

La substitution du résidu arginine 62 pour une proline semble entraîner une augmentation de la rigidité structurale empêchant la formation de l'hélice- α (Chou & Fasman, 1974; Garnier *et al.*, 1978). L'augmentation de l'activité CAT obtenue pour cette protéine mutante, soit 4,5 fois (+/-0,9), ne diffère pas substantiellement de celle obtenue pour la protéine de type sauvage (figure 5B). Ceci suggère que la structure de l'hélice- α n'est pas requise dans la fonction de transactivation.

La substitution du résidu isoleucine 63 pour un résidu lysine change le caractère hydrophobe de cet acide aminé. Par contre la fonction de transactivation n'est pas perturbée de façon significative par cette mutation puisqu'une augmentation de l'activité CAT de 4,1 fois (+/-0,3) est mesurée pour cette protéine mutante (figure 5B). Cependant, lorsque les acides aminés hydrophobes 68 et 70 sont mutés pour des résidus basiques (LI68/70RK), la capacité de la protéine à transactiver est grandement diminuée (1,7 fois +/-0,1) (figure 5B).

La substitution de la valine 57 pour un résidu leucine et la substitution du résidu isoleucine 63 pour une phénylalanine ne change pas la structure de l'hélice- α mais augmente l'encombrement stérique de cette région. Les résultats indiquent que la fonction de transactivation n'est pas perturbée par ce changement puisque des niveaux d'activité CAT de l'ordre de 6,6 fois (+/-0,8) et 4,1 fois (+/-0,3) sont mesurés pour les protéines mutantes V57L et I63F respectivement (figure 5B).

L'analyse mutagénique de l'hélice- α centrale indique que la structure de l'hélice même, n'est pas requise pour la fonction de transactivation comme l'indique la mutation de l'arginine 62 en proline. Par contre, certains résidus hydrophobes de la région centrale de cette hélice (LI68/70) sont requis pour cette fonction. La substitution du résidu isoleucine 63 pour un résidu lysine ou phénylalanine (I63K, I63F) ne perturbe pas la fonction de la protéine.

La région carboxy-terminale a été mutée par la substitution du résidu arginine 80. La mutation introduite, change le résidu polaire pour un résidu hydrophobe (R80A). Cette substitution altère la capacité de la protéine à transactiver puisqu'une augmentation de seulement 1,8 fois (+/-0,2) de l'activité CAT est mesurée (figure 5B). Ces résultats soulignent l'importance de cet acide aminé de la région carboxy-terminale pour la fonction de transactivation de Vpr.

Les résultats de pourcentage de transactivation mesurés pour les mutants par rapport au contrôle positif Vpr sauvage reflètent également l'importance des acides aminés LI68/70RK de l'hélice- α centrale et R80A de la région carboxy-terminale pour la fonction de transactivation de Vpr (tableau 1). Des résultats similaires ont été observés pour chacun des mutants décrits ci-haut lors de la transactivation du LTR SL3-3 du VLM (tableau 1)

3.4. Association des protéines Vpr mutantes au facteur de transcription TFIIB.

Le groupe d'Agostini et collaborateurs (1996) a démontré une interaction entre le facteur de transcription de la machinerie basale, TFIIB et Vpr par chromatographie d'affinité. Il est donc possible que la fonction de transactivation de Vpr repose sur cette interaction. Nous avons donc voulu vérifier cette hypothèse en déterminant si il existe une corrélation entre la fonction de transactivation et la liaison au facteur TFIIB. Quelques une des protéines Vpr mutantes capables ou non de transactiver soit E25K, A30F, V57L et R80A ont été utilisées à cette fin (figure 6).

Les protéines Vpr sauvages ou mutantes ont été synthétisées *in vitro* en présence de méthionines radiomarquées au ^{35}S . La première colonne de chacune des figures représente le cinquième de la quantité de protéine Vpr utilisée pour l'essai de liaison. Dans un premier temps, la protéine GST-TFIIB a été adsorbée à des billes d'agarose auxquelles la glutathione est liée. Les protéines Vpr ont été ajoutées et suivant plusieurs lavages les protéines liées à GST-TFIIB ont été éluées en augmentant la concentration de sels. A titre de contrôle, les protéines Vpr sauvages et mutantes ont été mises en présence de la protéine GST seule (deuxième colonne). Les résultats de cette études indiquent que les protéines mutantes E25K, A30F, V57L et R80A lient la protéine TFIIB tout aussi bien que la protéine Vpr sauvage. Aucune liaison à la protéine GST seule n'a été constaté démontrant ainsi la spécificité de liaison à la partie TFIIB de la protéine de fusion. Les résultats indiquent qu'il y a une absence de corrélation entre la capacité de Vpr à transactiver et la liaison à TFIIB. La liaison de Vpr à TFIIB n'est donc pas le seul critère permettant la transactivation.

3.5. Vpr perturbe la croissance des cellules infectées et augmente la production virale chez les lymphocytes T CD4+.

Afin d'établir un parallèle entre l'augmentation de l'expression de gènes rapporteurs et l'augmentation de l'expression virale, nous avons analysé la

contribution de Vpr aux phases tardives, reliées à l'expression virale, chez les lymphocytes T CD4+. Les cellules ont été infectées à haute multiplicité d'infection (M.O.I. de 10) par des virus pseudotypés exprimant Vpr ou non (HxBruR+/Env- et HxBruR-/Env-). Le pseudotypage du VIH-1 par l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (VSV-G) permet d'obtenir un pourcentage d'infection approchant 100%. L'utilisation de ces virus pseudotypés assure donc l'infection d'un nombre équivalent de cellules d'un échantillon à l'autre et assure également un seul cycle de réplication. Les analyses ont été effectuées en parallèle sur des cellules non-infectées (mock).

Dans un premier temps, l'étape la plus tardive, soit la production virale, a été quantifiée par l'activité enzymatique de la transcriptase inverse présente dans le surnageant de culture des cellules infectées (tableau 2). Les essais ont été effectués à des temps variables suivant l'infection (douze et vingt-quatre heures) et proviennent des mêmes cultures de cellules infectées. L'activité de la transcriptase inverse a été déterminée en duplicata à partir des surnageant recueillis aux différents temps post-infection (tableau 2). La quantification de l'activité transcriptase inverse indique que la présence de Vpr influence la réplication virale chez les lymphocytes T CD4+ par un facteur de 1,9 fois après douze heures et de 2,8 fois après vingt-quatre heures (tableau 2). Il semble donc que l'influence de Vpr sur la réplication virale chez les lymphocytes T CD4+, s'exerce tôt après l'infection.

Les analyses de Yao et collaborateurs (1998) indiquent que Vpr arrête le cycle des cellules à l'étape G2/M, lors de l'infection des cellules par les virus pseudotypés. Ces mêmes analyses démontrent qu'une proportion importante des cellules meurent par apoptose (Yao *et al.*, 1998). Ces observations impliquent que la division cellulaire est perturbée chez la culture infectée par le virus HxBruR+/Env-. La quantification du nombre de cellules par exclusion du bleu de trypan indique effectivement, que le nombre de cellules dans la culture infectée par le virus HxBruR+/Env- est moindre (tableau 2). Ce phénomène est observé dès douze heures d'infection. Ainsi, bien qu'un nombre équivalent de cellules ait été infecté par les virus HxBruR+/Env- et HxBruR-/Env-, le nombre de cellules après douze heures d'infection, est de 0,65 million en présence de Vpr et de 0,85 million en absence de Vpr. Après vingt-quatre heures d'infection, le nombre de cellules dans la culture est de 1,45 millions en présence de Vpr et de 2,13 millions en absence de Vpr (tableau 2).

Ces résultats semblent donc indiquer que les virus présents dans la culture infectée par le virus HxBruR+/Env- proviennent d'un nombre moindre de cellules que

dans le cas de la culture infectée par le virus HxBruR-/Env-. Ainsi, l'augmentation de la production virale en présence de Vpr serait sous-estimée. En effet, lors de la normalisation de l'activité transcriptase inverse par la quantité de cellules dans la culture après douze et vingt-quatre heures suivant l'infection, l'augmentation de la production virale par Vpr est plus évidente. Ainsi, une augmentation de la production virale de 2,5 fois est mesurée chez les cellules infectées par le virus HxBruR+/Env- comparativement au virus HxBruR-/Env- après douze heures d'infection. Cette augmentation est de 4,1 fois après vingt-quatre heures d'infection. Le tableau 2 présente les données d'une seconde expérience qui a été présentée par Yao et collaborateurs et à laquelle j'ai participé. Lors de cette expérience, le virus a été recueilli après 24, 36 et 48 heures (tableau 2). Cette fois encore, l'effet de Vpr sur la production virale est plus évidente lors de la normalisation de l'activité T.I. par le nombre de cellules présentes dans la culture. Ainsi, après 24 heures d'infection, les cellules infectées exprimant Vpr produisent 2,4 fois plus de virus que celles qui n'expriment pas Vpr. Ce ratio demeure inchangé après 36 heures et est de 2,9 après 48 heures d'infection.

Ces résultats semblent indiquer qu'un nombre inférieur de cellules est présent chez la culture infectée par le virus HxBruR+/Env-. Ce phénomène est relié à l'inhibition de la croissance des cellules et à l'apoptose induite par la protéine Vpr précocément lors de l'infection (Yao *et al.*, 1998). Nos résultats indiquent également que Vpr augmente la production virale chez les lymphocytes T CD4+. Cette augmentation s'exerce précocément et est plus évidente lors de la normalisation de l'activité transcriptase inverse par le nombre de cellule présent dans la culture. Il semble y avoir une corrélation entre l'arrêt du cycle cellulaire par Vpr et l'augmentation de l'expression des gènes.

3.6. Vpr augmente la quantité d'ARN viral lors de l'infection des lymphocytes T CD4+.

Nous avons étudié la possibilité d'une augmentation des niveaux d'ARN viral lors de l'infection des lymphocytes T CD4+ par des virus exprimant Vpr. L'ARN total a été isolé parallèlement à la détermination de l'activité transcriptase inverse soit après douze et vingt-quatre heures d'infection. Les quantités d'ARN viral ont été évaluées par RT-PCR semi-quantitatif. Le fragment correspondant à *gag* a été rétrotranscrit et amplifié parallèlement à un fragment de 510 paires de bases de l'ARN messager cellulaire; glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GAPDH). Le ratio

gag/GAPDH mesuré chez les cellules infectées par le virus HxBruR+/Env-, après douze heures, est environ 2,5 fois plus important que celui des cellules infectées par le virus HxBruR-/Env- (figure 7). Le ratio gag/GAPDH mesuré après vingt-quatre heures d'infection est de 4,8 fois supérieur. Une seconde amplification a été effectuée à partir des mêmes échantillons où une augmentation des ARN viraux de 2,7 fois et de 3,0 fois en présence de Vpr à douze et vingt-quatre heures d'infection a été observée (résultats non-présentés). Ces résultats préliminaires ont servis à Yao et collaborateurs (1998) qui ont confirmé l'augmentation des niveaux d'ARN viral par analyse de Northern indiquant ainsi que Vpr exerce bien une stimulation au niveau de l'expression des ARN viraux. Cette augmentation de l'activité transcriptase inverse est également reflétée par une synthèse accrue des protéines virales chez les cellules infectées par le virus exprimant Vpr (Yao *et al.*, 1998).

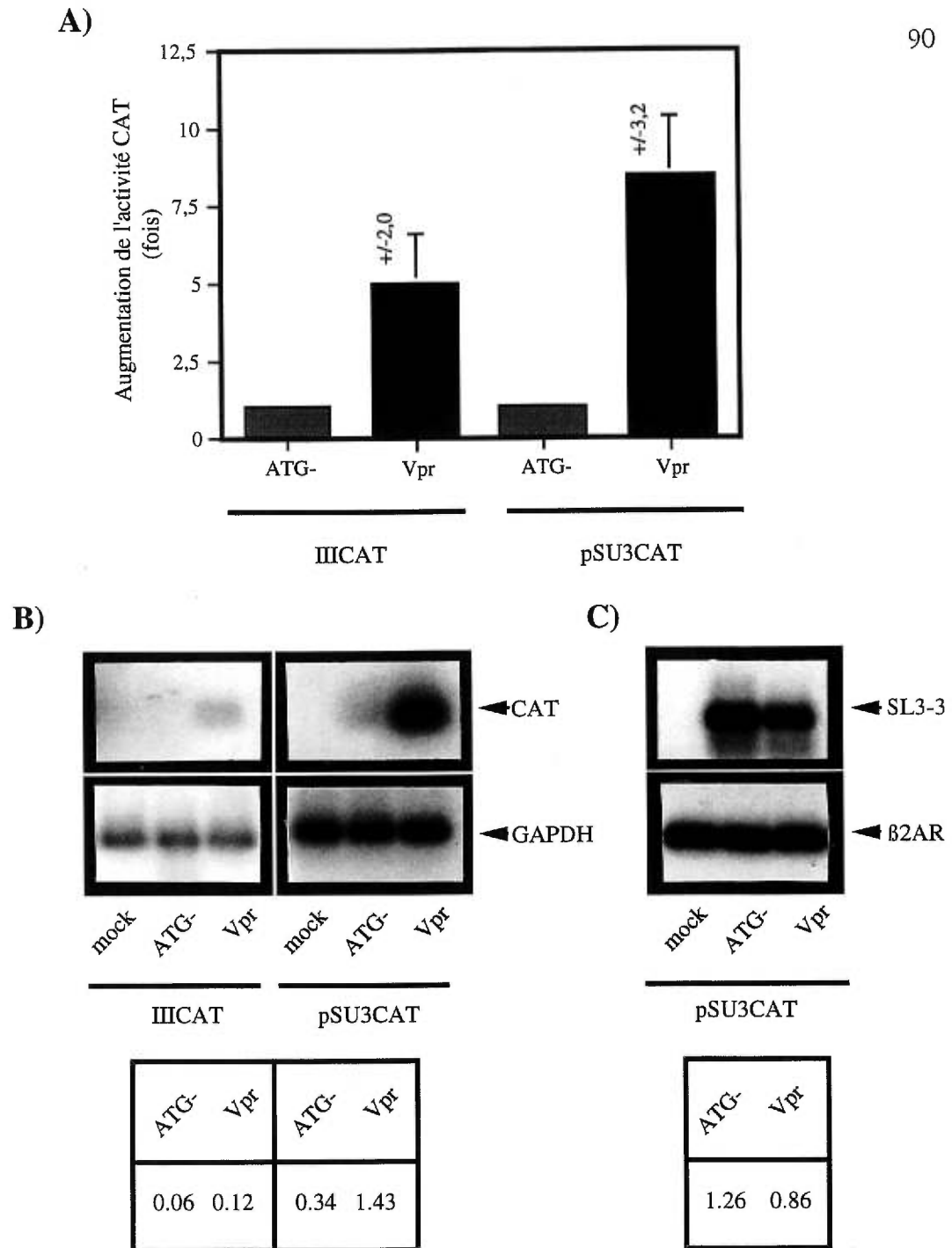


Figure 1. Transactivation du LTR du VIH-1 et du LTR SL3-3 du VLM par Vpr. A) Les cellules Jurkat ont été transfectées avec 5 μ g de l'expresser IICAT ou 2,5 μ g de l'expresser pSU3CAT et 5 μ g des expressers SVCMBruR ou SVCMBruRATG-. Les cellules ont été récoltées 72h suivant la transfection. Les expériences de transactivation ont été répétées 4 et 9 fois pour le LTR du VIH-1 et le LTR SL3-3 du VLM respectivement. Ces expériences ont été effectuées séparément. Les résultats de transactivation sont normalisés selon le contrôle ATG- auquel la valeur 1 a été attribuée. B) L'ARN total a été isolé lors des mêmes expériences et la quantification par RT-PCR a été effectuée sur l'ARN CAT ainsi que sur l'ARN GAPDH. C) L'ADN plasmidique a été quantifié par amplification par PCR du promoteur SL3-3 et du gène β 2-AR servant de contrôle interne d'amplification. Les tableaux expriment le ratio CAT/GAPDH ou SL3-3/ β 2-AR mesuré par analyse densitométrique.

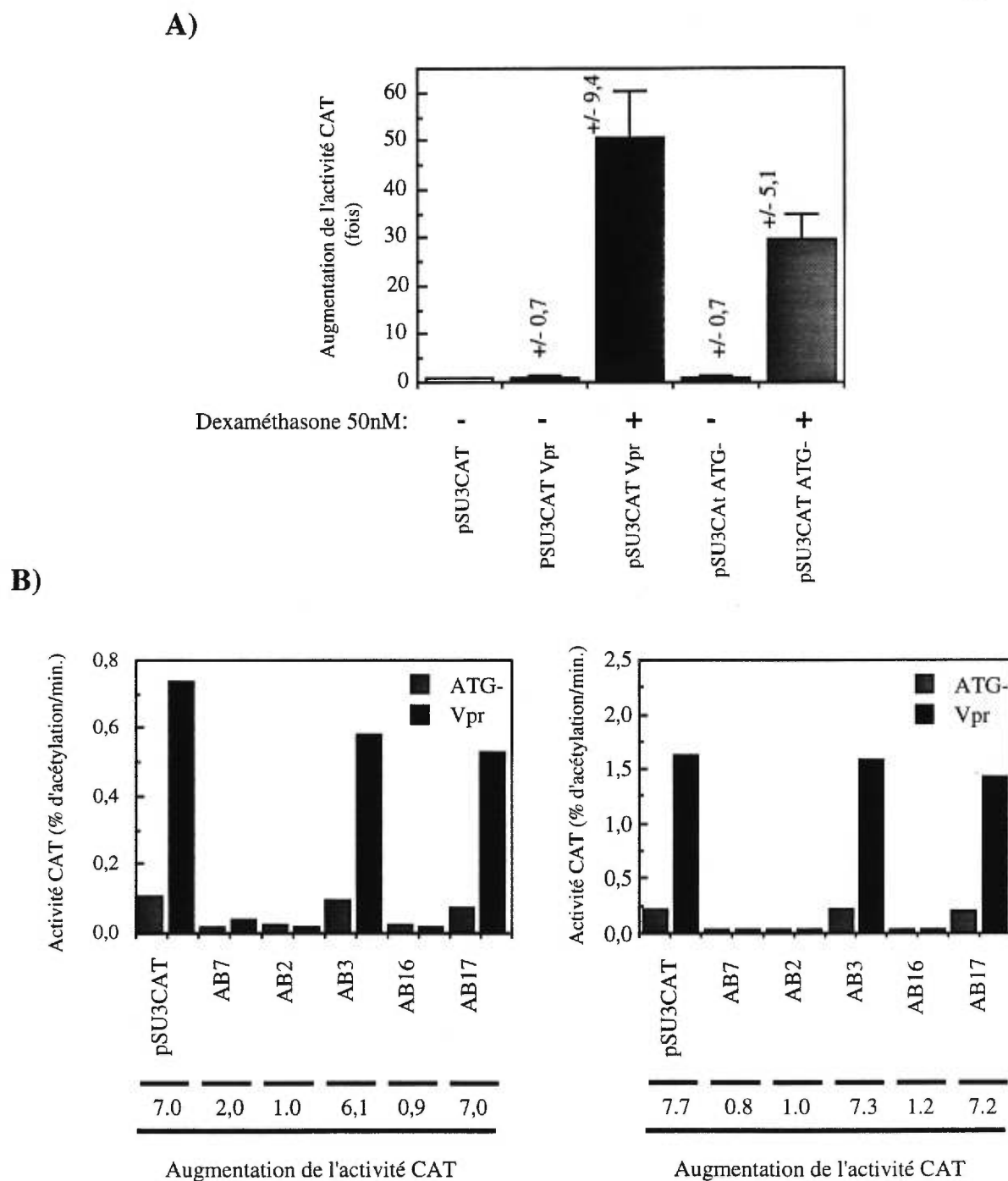


Figure 2. Analyse de l'implication du récepteur des glucocorticoïdes dans la fonction de transactivation de Vpr. A) Les cellules HeLa (1,5 millions) ont été transfectées avec 5 μ g de l'expressor pSU3CAT et 5 μ g des expressors SVCMBRuR ou SVCMBRuRATG-. Vingt-quatre heures suivant la transfection, les cellules ont été lavées et ont été mises en présence de dexaméthasone (50nM) ou d'éthanol. Les cellules ont été récoltées vingt-quatre heures plus tard et l'essai CAT a été effectué. B) Les cellules Jurkat (10 millions) ont été transfectées avec 2,5 μ g des expressors pSU3CAT sauvage ou mutés et 5 μ g des expressors SVCMBRuR ou SVCMBRuRATG-. Les cellules ont été récoltées 72 heures suivant la transfection et l'essai CAT a été effectué.

A)

Activité CAT (% d'acétylation/min.)					
pSU3CAT	AB7	AB2	AB3	AB16	AB17
0,107	0,018	0,020	0,095	0,022	0,076

B)

Activité CAT (% d'acétylation/min.)					
pSU3CAT	AB7	AB2	AB3	AB16	AB17
0,208	0,029	0,028	0,217	0,026	0,202

Figure 3. Un haut niveau d'activité basale du LTR SL3-3 du VLM permet la transactivation du promoteur par Vpr. Les résultats présentés représentent les niveaux d'activité CAT mesurés lors de la co-expression des mutants du LTR SL3-3 du VLM et du contrôle négatif SVCMVBruRATG-. Ces résultats sont dérivés de ceux de la figure 2B et représentent deux expériences indépendantes.

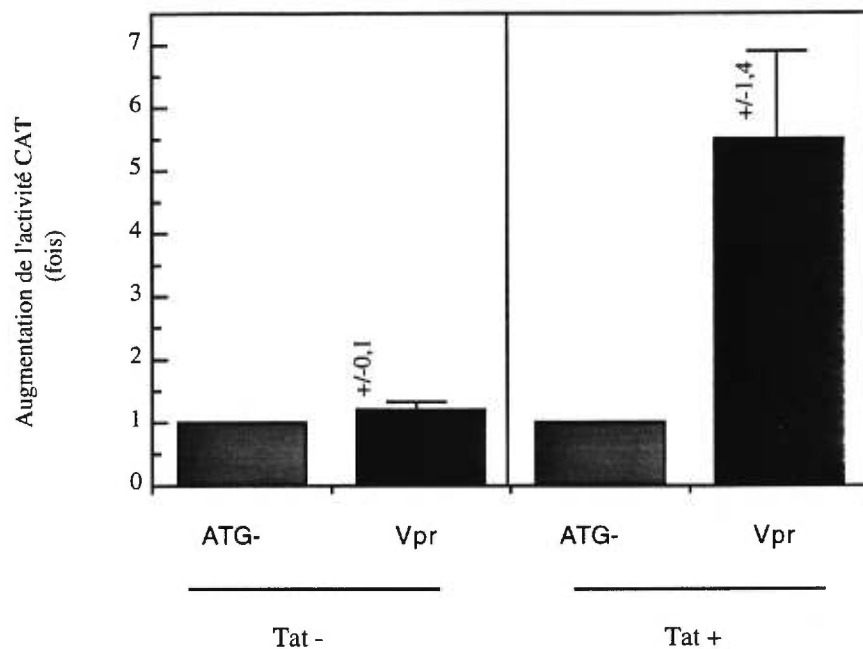


Figure 4. Importance du niveau basal du LTR du VIH-1 dans la fonction de transactivation de Vpr. Les cellules HeLa (1million) ont été transfectées avec 5 μ g de l'expresseur IIICAT et 5 μ g des expressers SVCMBruR ou SVCMBruRATG- ainsi que 2,5 μ g de l'expresseur IIIexTat. Les cellules ont été récoltées 72 heures suivant la transfection et l'essai CAT a été effectué. Les résultats sont exprimés en fonction du contrôle négatif ATG- auquel la valeur 1 a été attribuée.

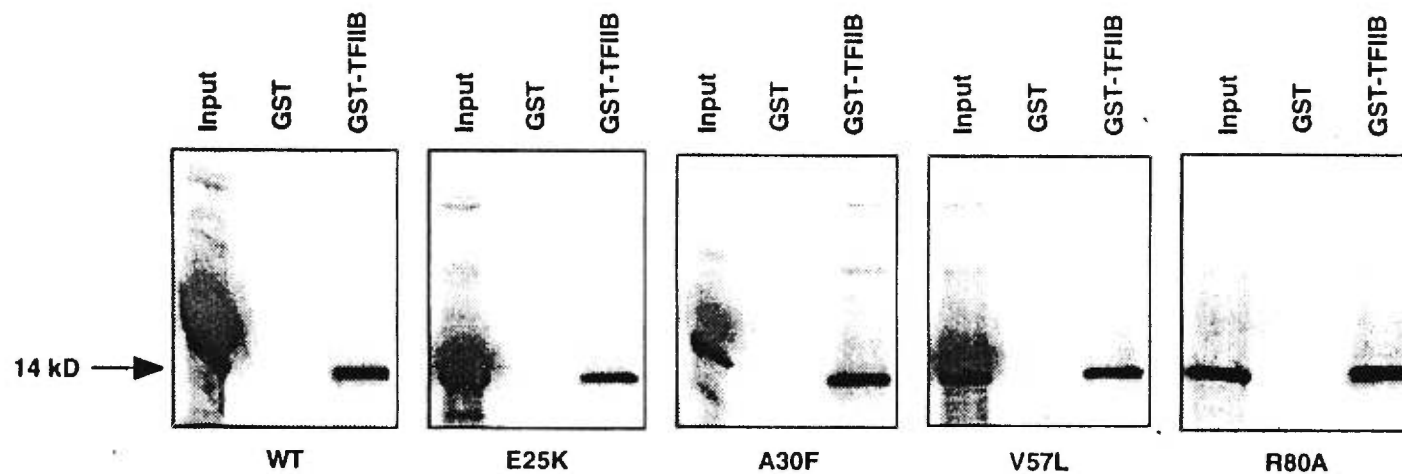


Figure 6. Liaison des protéines Vpr mutantes à TFIIB. Les protéines Vpr sauvage, E25K, A30F, V57L et R80A ont été synthétisée *in vitro* et des essais de liaison à la colonne GST ou GST-TFIIB ont été effectués. La première colonne représente le cinquième de la quantité des protéines Vpr utilisée pour les essais de liaison. La seconde colonne indique le niveau de liaison des protéines Vpr à la protéine GST seule et la dernière représente la liaison à la protéine de fusion GST-TFIIB.

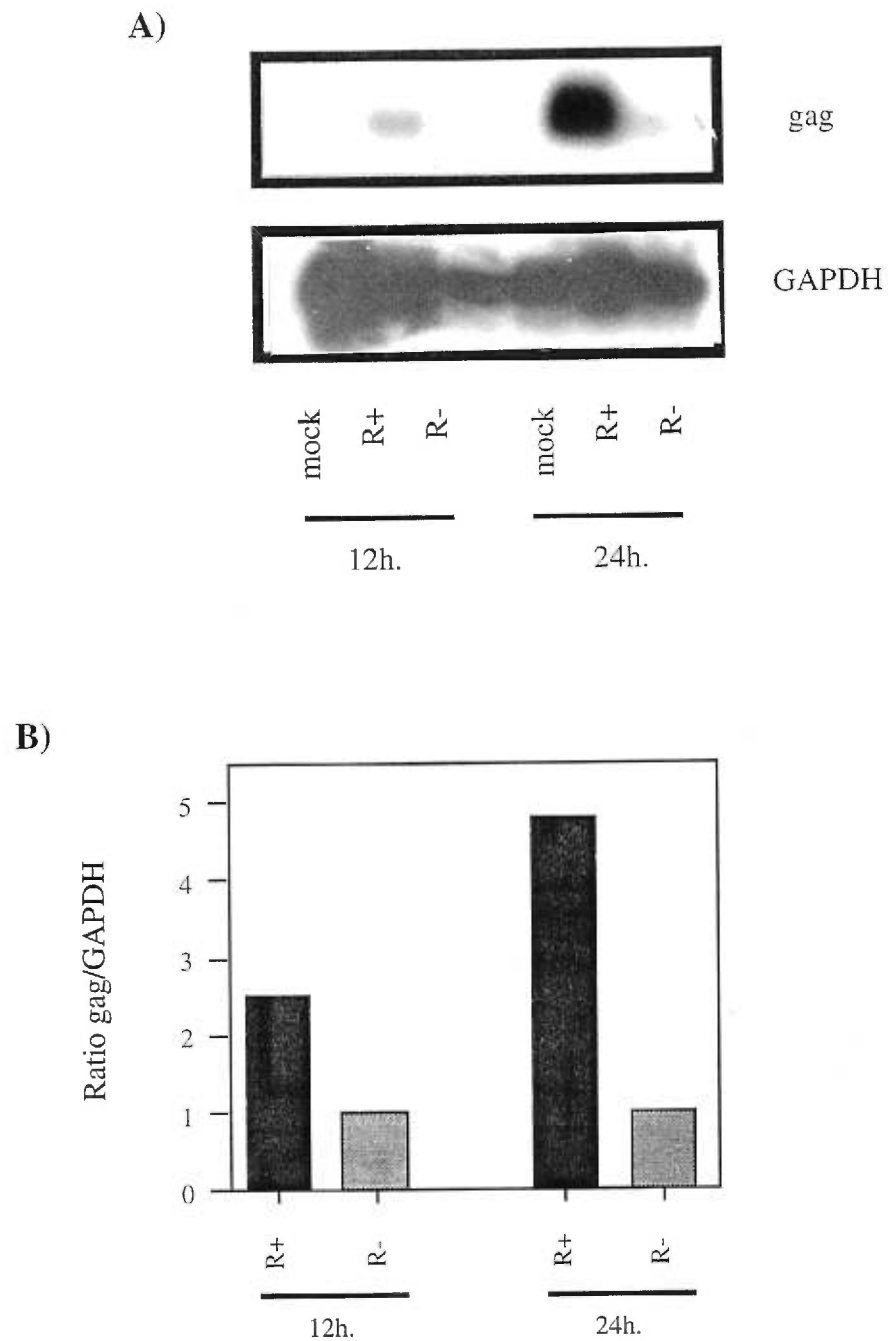


Figure 7. Quantification des ARN viraux chez les cellules Jurkat infectées. L'ARN total des cellules Jurkats infectées avec les virus pseudotypés exprimant Vpr ou non (HxBruR+/Env- et HxBruR-/Env-) et les ARN viraux ont été quantifiés par amplification par PCR de la séquence de gag et de GAPDH suivant la rétrotranscription. A) Autoradiogramme. B) Quantification densitométrique de l'autoradiogramme.

Mutants	Stabilité (% de Vpr sauvage)	Localisation nucléaire	Incorporation (% de Vpr sauvage)	Arrêt en G2/M	Transactivation du LTR du VIH-1 (% de Vpr sauvage)	Transactivation du LTR SL3-3 du VLM (% de Vpr sauvage)
Vpr sauvage	100	N	100	++	100	100
L23F	85	ND	20	++	90+/-4	103+/-4
E25K	70	P	25	++	106+/-4	88+/-14
A30F	80	P	20	+/-	39+/-6	39+/-4
V57L	100	P	75	++	112+/-18	130+/-22
R62P	80	P	70	++	89+/-3	127+/-40
I63F	100	P	90	++	69+/-5	82+/-6
I63K	45	P	65	++	78+/-7	112+/-10
LI68/70RK	80	N	ND	ND	34+/-3	14+/-2
R80A	100	N	100	-	36+/-2	30+/-4

Tableau 1. Résumé des phénotypes et fonctions des protéines Vpr mutantes. La stabilité des protéines a été mesurée par marquage métabolique et chasse et est exprimée selon les résultats obtenus pour la protéine Vpr de type sauvage auquel la valeur 100% a été attribuée. Les résultats de localisation nucléaire ont été obtenus par analyse du signal d'immunofluorescence par microscopie confocale suite à la transfection de cellules COS-7 par les expresseurs de Vpr. Les résultats sont exprimés selon la prédominance d'un signal nucléaire (N) ou périnucléaire (P). Les résultats d'incorporation des protéines Vpr mutantes ont été obtenus par transfection de cellules MT4 avec les provirus mutants. Les résultats sont comparés à ceux obtenus pour la protéine Vpr sauvage auquel une valeur d'incorporation de 100% a été attribuée. Les analyses de cycle cellulaire ont été effectuée suite à l'infection de cellules Jurkat avec des virus exprimant des protéines Vpr mutantes et qui ont été pseudotypés avec la protéine G du virus VSV. (ND= non-déterminé).

	Temps post-infection	Echantillon	Activité T.I. (cpm/ μ l)	Ratio Vpr+/Vpr-	Activité T.I./ 10^6 cell.	Ratio Vpr+/Vpr-
Expérience 1.	12 heures	mock	1 550		1 684	
		Vpr+	4 814	1,9	7 406	2,5
		Vpr-	2 560		3 012	
	24 heures	mock	992		536	
		Vpr+	101 500	2,8	68 120	4,1
		Vpr-	35 704		16 762	
Expérience 2.	24 heures	mock	1 064		ND	
		Vpr+	308 000	1,8	616 000	2,4
		Vpr-	169 000		260 000	
	36 heures	mock	2 113		ND	
		Vpr+	1 850 000	1,4	3 310 000	2,4
		Vpr-	1 310 000		1 408 000	
48 heures	mock	ND		ND		
	Vpr+	3 768 000	0,9	8 760 000	2,9	
	Vpr-	4 240 000		3 020 000		

Tableau 2. Quantification de la production virale chez les lymphocytes T CD4+ infectés. Les cellules Jurkat ont été infectées à une M.O.I. de 10 par des virus exprimant Vpr ou non (HxBruR+/Env- ou HxBruR-/Env-) et pseudotypés avec l'enveloppe G du virus de la stomatite vésiculaire. Une heure suivant l'infection, les cellules ont été rincées dans un milieu sans sérum contenant 15 μ g/ml de TPCk-trypsine afin d'enlever les virus accolés à la membrane cellulaire. Au temps indiqué dans le tableau, les cellules ont été comptées par exclusion du bleu de trypan et le milieu de culture clarifié a servi aux tests de l'activité de la Transcriptase Inverse. Les résultats représentent deux expériences indépendantes. ND=non déterminé.

Les expériences de stabilité, d'incorporation et d'arrêt du cycle cellulaires résumées au tableau 1 ont été effectuées par le Dr. Xiao-Jian Yao du département de Micobiologie et Immunologie de l'Université de Montréal.

Les expériences de localisation cellulaire, résumées au tableau 1, ont été effectuées par M. Ramu Subbramanian du département de Micobiologie et Immunologie de l'Université de Montréal.

Les analyses *in vitro* de liaison entre Vpr et TFIIB ont été effectuées au laboratoire de pathogénie des infections à lentivirus du Dr. Joséphine Sire de l'unité 372 de l'INSERM, 163 de Luminy, Marseille-Cedex, France.

Chapitre 4

Influence de la protéine Vpr du virus d'immunodéficience humaine de type 1 sur la physiologie cellulaire.

1. Introduction.

Tel que présenté au chapitre précédent, Vpr influence le cycle cellulaire et permet ainsi une augmentation de l'expression des gènes hétérologues et des gènes viraux. Nous avons voulu, lors de l'étude présentée dans ce chapitre, dissocier les fonctions d'arrêt du cycle cellulaire et de transactivation afin de mieux comprendre l'influence que Vpr exerce sur la physiologie cellulaire.

Le rôle de Vpr sur les fonctions physiologiques cellulaires n'a que tout récemment été analysé. Une de ces études a démontré que l'expression de Vpr dans les cellules de rhabdomyosarcome et d'ostéosarcome suffit à causer leur différenciation (Levy *et al.*, 1993). Des études subséquentes ont déterminé que Vpr cause un arrêt du cycle cellulaire à l'étape G2/M (He *et al.*, 1995; Jowett *et al.*, 1995; Planelles *et al.*, 1995; Re *et al.*, 1995; Rogel *et al.*, 1995). Cet arrêt, observé en présence ou non des autres protéines virales, est relié à l'inactivation de la kinase p34CDC2 et de la phosphatase cdc25C (He *et al.*, 1995; Jowett *et al.*, 1995; Re *et al.*, 1995). Jusqu'à tout récemment, aucune relation concrète entre la différenciation et l'arrêt du cycle cellulaire n'avait été démontrée (Mahalingam *et al.*, 1997a).

Nous avons analysé de façon préliminaire, la contribution de la fonction d'arrêt du cycle cellulaire de Vpr dans le phénomène de différenciation des cellules musculaires. Pour ce faire, nous avons développé des lignées cellulaires inductibles pour l'expression de la protéine. Les cellules utilisées pour cette analyse proviennent d'une tumeur musculaire humaine (rhabdomyosarcome) et sont peu différenciées. La régulation de l'expression de Vpr chez ces cellules repose sur le système développé par Gossen et Bujard, décrit dans la section "matériels et méthodes" du chapitre 2 (Gossen & Bujard, 1992).

2. Objectif.

L'objectif de cette étude consiste à analyser l'influence de Vpr sur la physiologie de la cellule. L'approche utilisée ici, consiste à exprimer la protéine Vpr dans des cellules de type musculaire peu différenciées et de déterminer les conséquences de l'expression de Vpr sur les changements morphologiques associés à la différenciation. Dans un premier temps, la lignée cellulaire sera caractérisée pour l'expression de Vpr. L'effet de Vpr sur la physiologie des cellules sera évalué par observation de leur morphologie tel que décrit par Levy et collaborateurs (1993). La capacité des cellules de rhabdomyosarcome à soutenir la fonction d'arrêt du cycle cellulaire de Vpr sera mise en relation aux changements morphologiques observés.

3. Résultats.

3.1. Caractérisation des clones de rhabdomyosarcomes inductibles pour l'expression de Vpr.

La lignée de rhabdomyosarcome RSH-AC1 provient de cellules d'une tumeur humaine. Ces cellules ont été choisies pour leur faible niveau de différenciation intrinsèque (tableau 1, chapitre 1), nous permettant de mieux constater ainsi les changements physiologiques associés à l'expression de la protéine Vpr. Les lignées inductibles ont été obtenues par co-transfection des cellules RSH-AC1 avec l'expresser inductible (CMV_TVpr) et l'expresser de la protéine de fusion inductrice (tTA). Deux clones (C1 et M2) ont été choisis pour leur haut niveau d'expression et seront analysés plus en détails. Un marquage métabolique à la [³⁵S]-méthionine a été effectué sur les cellules à différents temps (24, 48 et 72 heures) suivant l'induction et la protéine Vpr a été immunoprécipitée par l'antisérum de lapin R3.7. La séparation des protéines sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) indique que la protéine Vpr est exprimée à des niveaux appréciables dans les deux clones (figure 1A et 1B) et s'exerce de façon continue pendant au moins 30 jours (résultats non-présentés). Chacune de ces expériences a été effectuée parallèlement aux contrôles appropriés soit la lignée parentale (RSH-AC1), les cellules non-induites et des cellules fraîchement induites.

La localisation et l'expression de la protéine Vpr a été analysée par immunofluorescence indirecte pour les clones M2 et C1 à un grossissement de 40X. Deux exemples des résultats obtenus pour chacun des clones M2 et C1 sont illustrés aux figures 2 et 3. Ces résultats indiquent que la localisation de la protéine semble majoritairement nucléaire et périnucléaire (figure 2A, 2B, 3A et 3B). Par contre, la plupart des cellules n'expriment pas Vpr à des niveaux suffisamment élevés pour être détecté par cette technique.

3.2. Vpr semble induire un changement dans la morphologie des cellules du clone M2.

L'observation d'une morphologie atypique chez les cellules exprimant Vpr, nous a poussé à analyser ce phénomène. L'expression de Vpr chez les clones C1 et M2 a été induite pendant cinq jours. Les résultats de cette induction indiquent que les cellules du clone M2 sont multinucléées et de forme étoilée (figure 4B). De plus, une large vacuolisation est observée chez ces cellules. Les cellules contrôles non-

induites, gardées parallèlement en culture, ne démontrent pas cependant, ce genre de phénotype (figure 4A). Le clone C1 exprimant Vpr ne montre pas ce genre de changement morphologiques (cellules non-induites: figure 5A comparativement aux cellules induites: figure 5B). Les résultats présentés ici doivent cependant être confirmés par d'autres clones ou par l'utilisation d'une population non-clonale.

3.3. Vpr semble perturber la croissance des cellules du clone M2.

Nous avons voulu vérifier l'effet de l'expression de Vpr sur la croissance des cellules. Pour ce faire, nous avons mis en culture les clones C1 et M2 dans des plaques de six puits, induit l'expression de Vpr et chaque deux ou trois jours les cellules ont été trypsinées et comptées par exclusion du bleu de trypan. Les cellules parentales ont été mises en culture parallèlement. Les résultats exprimés sous forme de courbe de croissance indiquent que la croissance des cellules M2 exprimant Vpr est plus faible que celle du même clone non-induit (figure 6A). Par contre, la croissance du clone C1 n'est pas perturbée par l'expression de Vpr (figure 6B). L'expression de Vpr dans le clone C1 a été détectée à de forts niveaux et ce à plusieurs reprises lors d'expériences indépendantes (figure 1). L'absence de défaut de croissance et de changements morphologiques pourrait indiquer que ce clone cellulaire résiste à l'effet de Vpr.

3.4. Vpr semble causer une accumulation des cellules du clone M2 à l'étape G2/M du cycle cellulaire.

Afin de déterminer les causes des retards de croissance, nous avons analysé, par cytométrie, le cycle des cellules M2 induites. Cette expérience a également été effectuée chez le clone C1 afin de détecter des anomalies du cycle cellulaire qui seraient passées inaperçues lors de la cinétique de croissance. Les cellules M2 et C1 ont donc été induites pendant quarante-huit, soixante-douze ou quatre-vingt-seize heures avant la perméabilisation et la coloration de l'ADN à l'iodure de propidium. L'analyse des résultats de FACS indique que l'expression de Vpr dans le clone M2 produit une accumulation des cellules à l'étape G2/M du cycle cellulaire (figures 7F, 7I). L'arrêt du cycle à l'étape G2/M est détectable après soixante-douze heures d'induction (figure 7F). Ainsi, un ratio (G2/M)/G1 de 0,9 est mesuré pour les cellules M2 induites, comparativement à 0,6 et 0,4 pour les cellules non-induites et la lignée parentale respectivement (figures 7D, 7E, 7F). La dernière mesure effectuée après quatre-vingt-seize heures d'induction indique que les cellules M2 exprimant Vpr

montrent une accumulation à l'étape G2/M (ratio de 1,0) tout aussi accentuée comparativement aux contrôles non-induit et RSH-AC1 (ratio de 0,3 et 0,4 respectivement) (figures 7G, 7H, 7I). L'accumulation des cellules à l'étape G2/M, après quarante-huit heures d'induction, ne semble pas différente chez les cellules exprimant Vpr ou non (figures 7A, 7B, 7C).

L'analyse par cytométrie du cycle des cellules C1 induites n'indique pas d'accumulation importante à l'étape G2/M. La différence la plus grande observée lors de cette analyse est mesurée après quatre-vingt-seize heures d'induction (figure 8I). Ainsi, un ratio (G2/M)/G1 de 0,6 est mesuré pour les cellules C1 exprimant Vpr, alors que ce ratio est de 0,4 pour les cellules C1 non-induites et pour les cellules parentales RSH-AC1 (figures 8G, 8H, 8I). La proportion des cellules à l'étape G2/M pour les cellules C1 induites ne semble pas significativement différente des contrôles négatifs. Les ratios (G2/M)/G1 mesurés à quarante-huit ou soixante-douze heures pour les cellules C1 induites sont identiques à ceux des contrôles négatifs (figures 8A, 8B, 8C, 8D, 8E, 8F). Il est possible que les cellules du clone C1 soient résistantes à l'effet de Vpr. Il est également possible que le niveau de Vpr exprimé chez ce clone soit trop faible pour permettre l'arrêt à l'étape G2/M.

Il semble donc que la fonction d'arrêt du cycle des cellules, associé à Vpr, puisse se produire chez les cellules de rhabdomyosarcome du moins chez le clone M2.

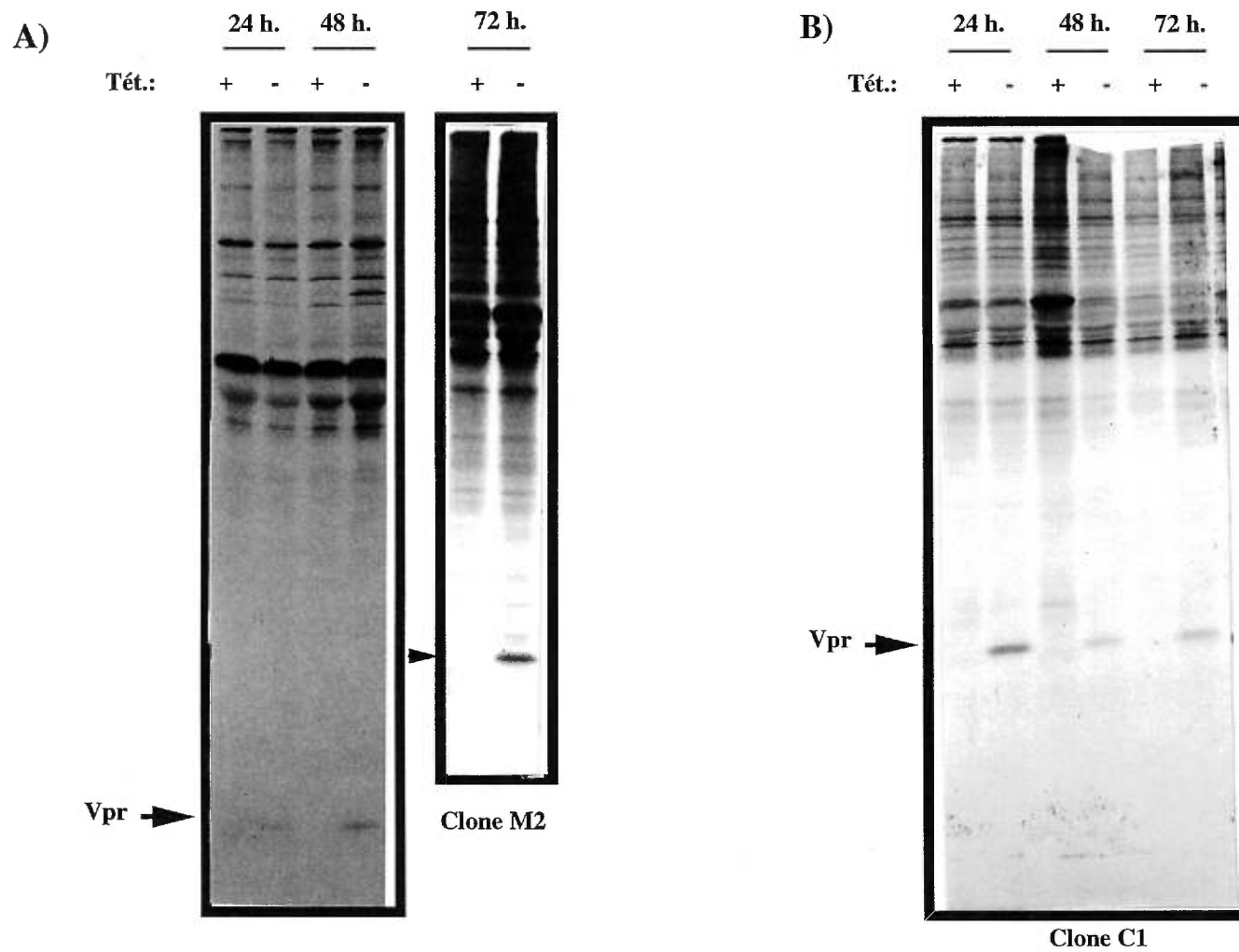


Figure 1. Analyse cinétique de l'expression de Vpr chez les clones M2 (A) et C1 (B). Les cellules ont été marquées à la méthionine radioactive pendant 6 heures après une carence d'une heure. La protéine a par la suite été immunoprécipitée par l'anticorps polyclonal R3.7 et les protéines ont été séparées sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

A)



B)



Figure 2. Analyse de l'expression de Vpr par immunofluorescence indirecte chez le clone M2. Les cellules du clone M2 ont été induites pendant trois jours et ont été fixées à l'acétone. Les cellules ont été mises en présence d'un anticorps polyclonal de lapin contre Vpr (R3.7) dilué cent fois et ont été mis en contact par la suite avec un anticorps de chèvre contre les IgG de lapins, couplé à la fluorescéine. Les figures A et B représentent deux exemples de cellules exprimant la protéine Vpr. Les flèches indiquent le signal majoritairement nucléoplasique chez cellules exprimant la protéine Vpr.

A)



B)

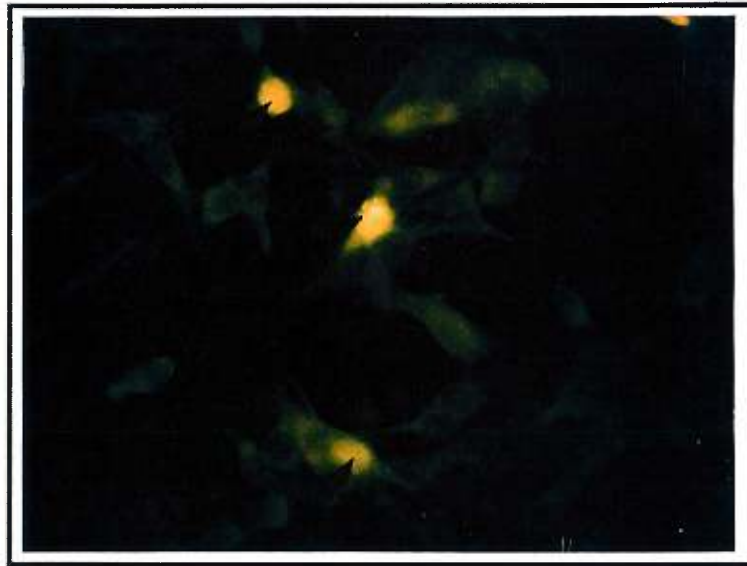


Figure 3. Analyse de l'expression de Vpr par immunofluorescence indirecte chez le clone C1. Les cellules du clone C1 ont été induites pendant trois jours et ont été fixées à l'acétone. Les cellules ont été mises en présence d'un anticorps polyclonal de lapin contre Vpr (R3.7) dilué cent fois et ont été mis en contact par la suite avec un anticorps de chèvre contre les IgG de lapins, couplé à la fluorescéine. Les figures A et B représentent deux exemples de cellules exprimant la protéine Vpr. Les flèches indiquent les cellules exprimant la protéine Vpr.

A)

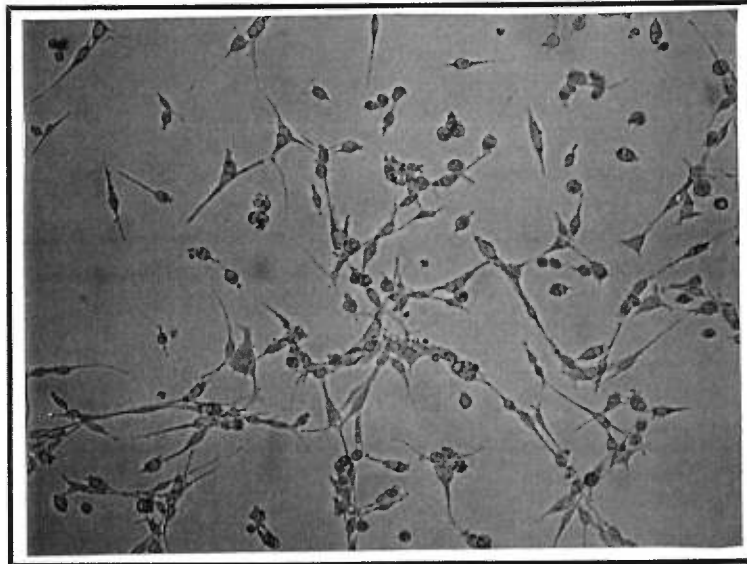


B)



Figure 4. Analyse de la morphologie cellulaire du clone M2. Les cellules M2 ont été induites pendant cinq jours et la morphologie des cellules a été observée par microscopie à contraste de phase A) Cellules M2 non-induites. B) Cellules M2 induites. La flèche no.1 indique les cellules étoilées. La flèche no.2 indique les cellules vacuolisées.

A)



B)

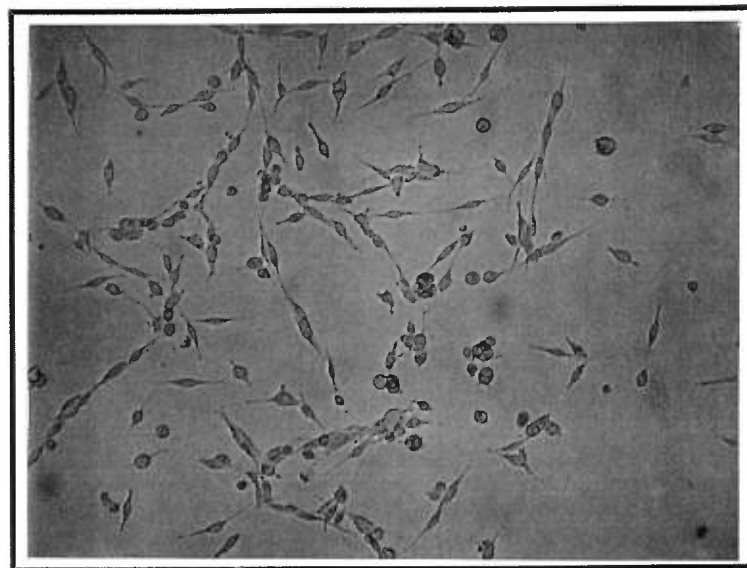
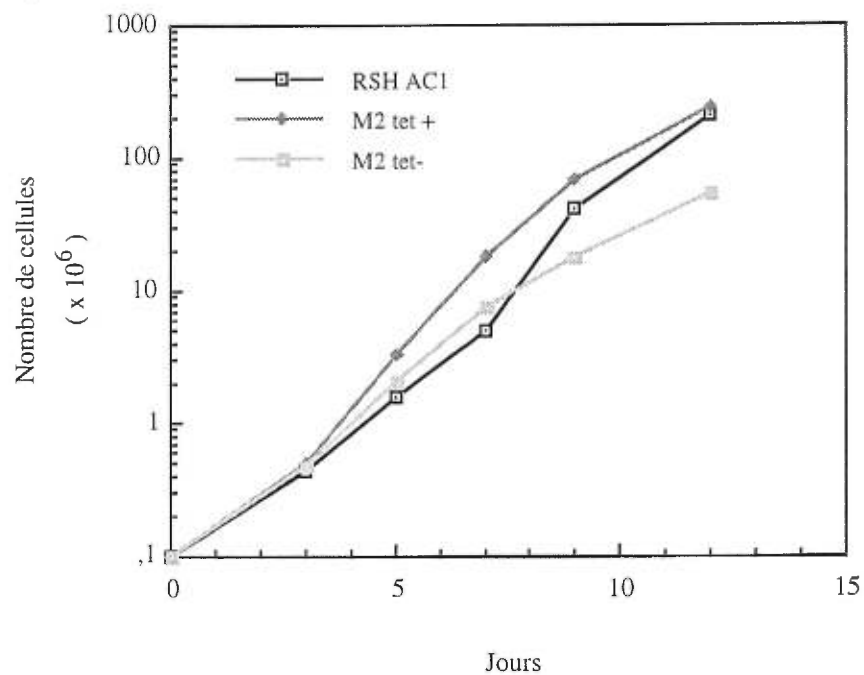


Figure 5. Analyse de la morphologie cellulaire chez le clone C1. Les cellules C1 ont été induites pendant cinq jours et la morphologie des cellules a été observée par microscopie à contraste de phase A) Cellules C1 non-induites. B) Cellules C1 induites.

A)



B)

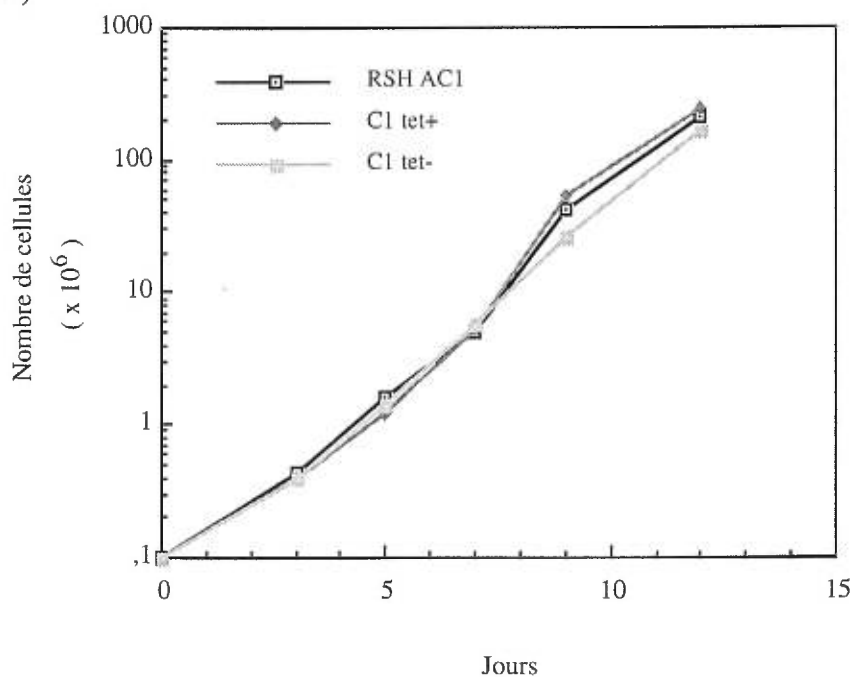


Figure 6. Croissance des clones de rhabdomyosarcome. A) clone M2. B) clone C1. Les cellules ont été ensemencées à une densité de 100 000 cellules dans des plateaux de 6 puits (35mm). Chaque deux ou trois jours, un puit de cellule (induit, non-induit et cellules parentales) a été trypsiné et les cellules ont été comptées par exclusion du bleu de trypan.

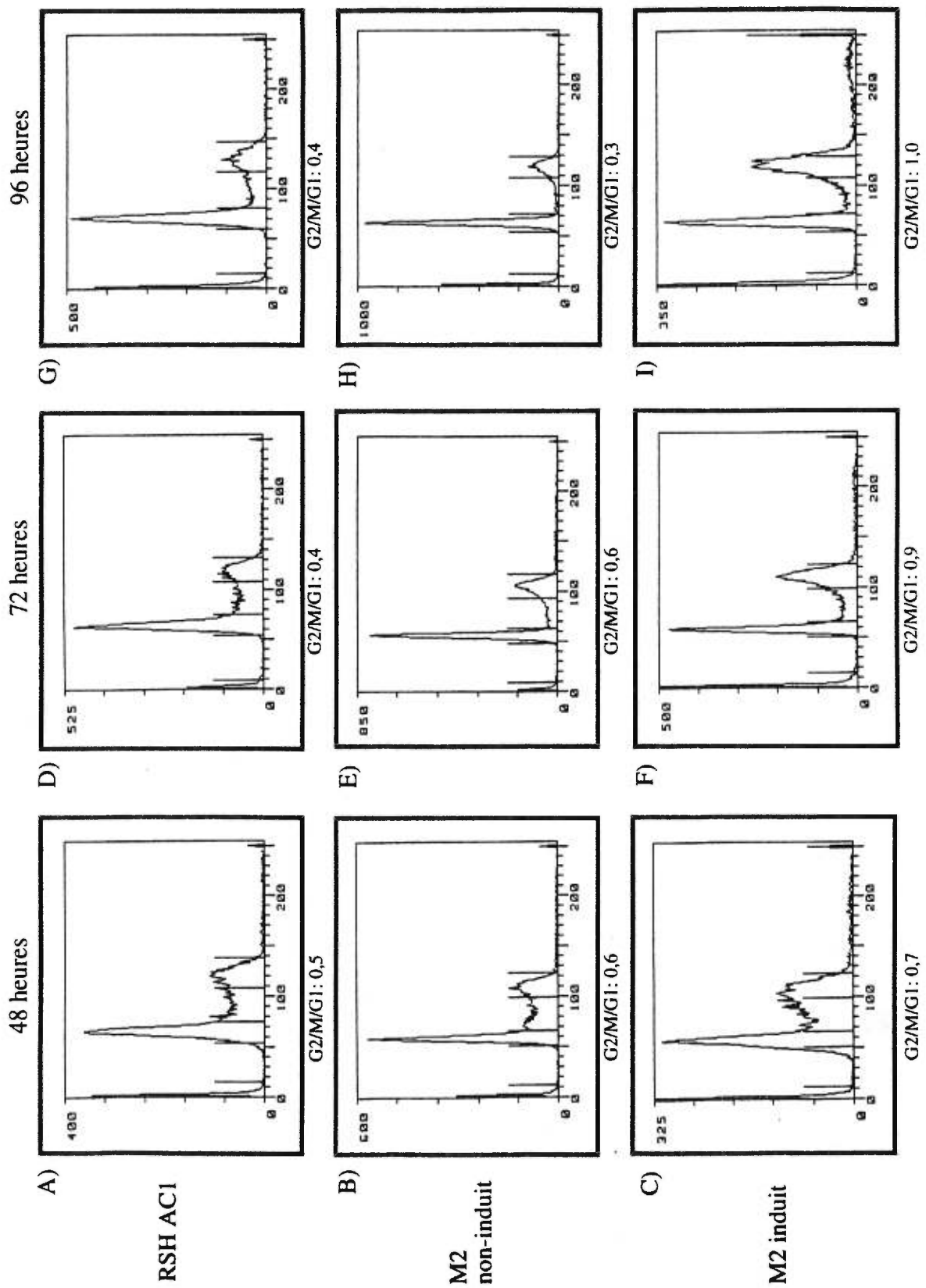


Figure 7. Analyse du cycle cellulaire par FACS chez le clone M2. Les cellules (2,5 million) ont été induites ou gardées en culture pendant le temps décrit ci-haut et ont été perméabilisées par une solution de citrate de sodium contenant du Triton X-100 et de la RNase A. Les cellules ont par la suite été mises en présence d'iodure de propidium et ont été analysées par FACS à l'aide du programme Consort 30.

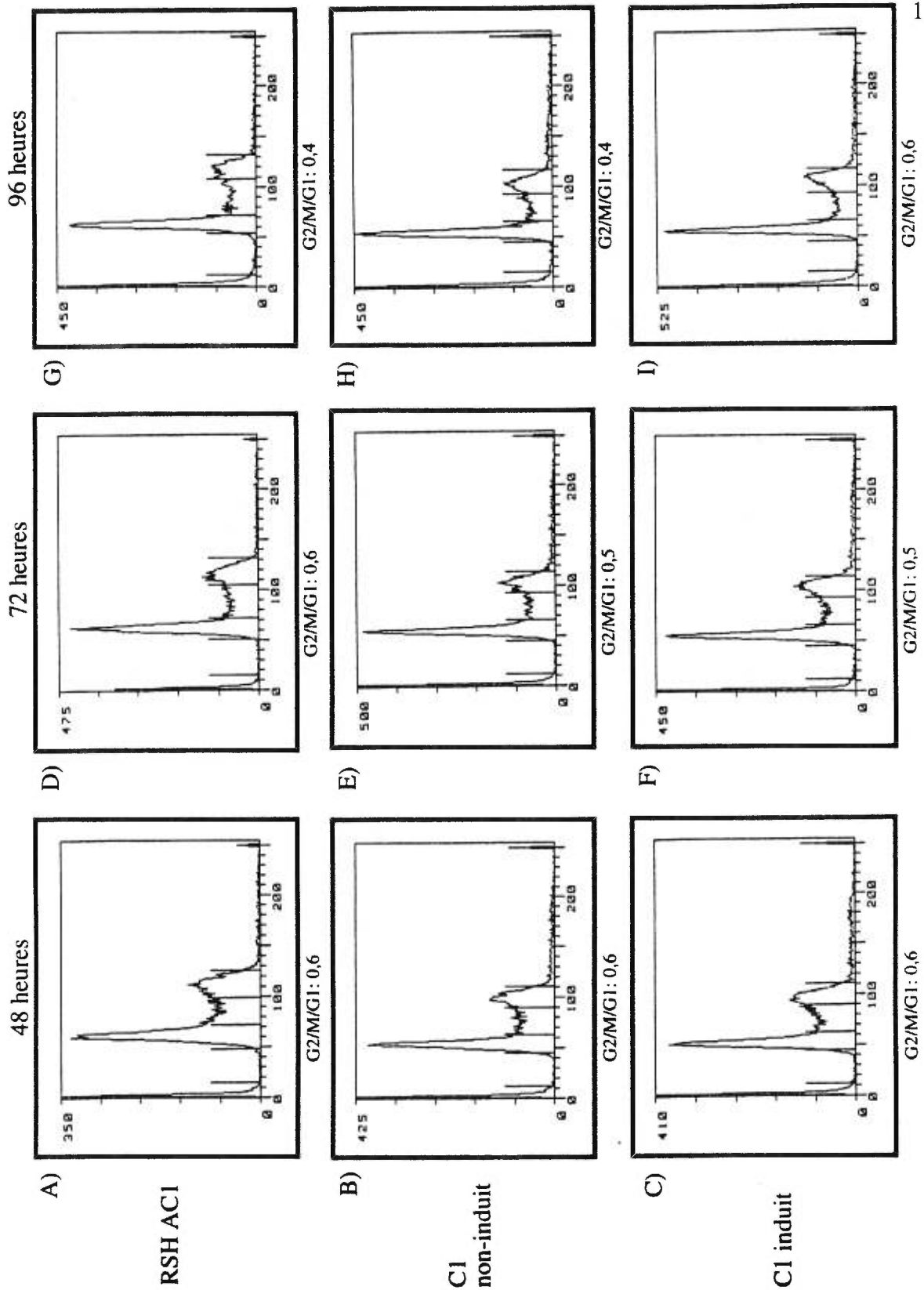


Figure 8. Analyse du cycle cellulaire par FACS chez le clone C1. Les cellules (2,5 million) ont été induites ou gardées en culture pendant le temps décrit ci-haut et ont été perméabilisées par une solution de citrate de sodium contenant du Triton X-100 et de la RNase A. Les cellules ont par la suite été mises en présence d'iodure de propidium et ont été analysées par FACS à l'aide du programme Consort 30.

Les analyses de cytométrie ont été effectuées par M. Serge Sénéchal du département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal.

Chapitre 5
Discussion

La protéine Vpr induit une augmentation de l'expression des gènes se trouvant sous le contrôle de promoteur viraux ne démontrant pas d'homologie entre-eux tel le LTR du VIH-1, le LTR SL3-3 du VLM, le promoteur du CMV et de RSV (Cohen *et al.*, 1990c). Ces observations démontrent que la transactivation exercée par Vpr est générale et ne demande pas de séquences de régulation précises. Les résultats présentés au chapitre 3 clarifient pour la première fois le mécanisme de transactivation du LTR du VIH-1 et des promoteurs hétérologues par la protéine Vpr du virus d'immunodéficience de type 1. Nos résultats indiquent que l'augmentation de l'expression des gènes est la conséquence d'une augmentation des niveaux d'ARN messagers du gène rapporteur CAT. Cet effet est observé *in vivo* pour le LTR du VIH-1 ainsi que pour le LTR SL3-3 du virus de la leucémie murine. Nos données ne nous permettent pas de distinguer, cependant, si l'augmentation du niveau d'ARN messenger est le résultat de l'influence de Vpr sur la transcription ou sur la stabilisation de ceux-ci. Nous avons, par contre, écarté la possibilité d'une stabilisation de l'ADN plasmidique du gène rapporteur CAT. L'activation transcriptionnelle par Vpr a déjà été suggérée auparavant (Levy *et al.*, 1994; Connor *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995). Lors de ces études, l'induction de la production virale chez des cellules infectées de façon latente par la protéine Vpr recombinante a été observée.

Nos résultats indiquent que la transactivation du LTR du VIH-1 et du LTR SL3-3 du VLM par Vpr dépend de leur niveau d'activité basale. Conformément à cette hypothèse, Vpr peut transactiver le LTR du VIH-1 dans les cellules Jurkat mais transactive seulement faiblement dans les cellules HeLa (figures 1A, 4; chapitre 3). Effectivement, les cellules HeLa, contrairement aux cellules Jurkat, ne soutiennent pas un niveau d'activité basale élevé du LTR du VIH-1. Parallèlement, le LTR SL3-3 du VLM démontre un niveau d'activité basale plus élevé que le LTR du VIH-1 dans les cellules Jurkat et est effectivement transactivé de façon plus efficace par Vpr (figure 1A; chapitre 3). Bien qu'il y ait une coopération entre Vpr et les glucocorticoides pour la transactivation du LTR SL3-3 du VLM (figure 2A; chapitre 3), plusieurs promoteurs (RSV, CMV) ne possédant pas d'éléments de réponse aux glucocorticoides peuvent être transactivés de façon efficace par Vpr. Il semble donc que l'activation de la voie des glucocorticoides participe à la transactivation des promoteurs par Vpr dans sa capacité à augmenter le niveau d'activité du promoteur et non dû à une coopération véritable entre Vpr et le récepteur des glucocorticoides.

L'importance du niveau d'activité du promoteur pourrait être reliée à l'interaction entre Vpr et la protéine TFIIB, faisant partie de la machinerie basale de

transcription (Agostini *et al.*, 1996). Cependant, conformément aux résultats présentés à la figure 6 du chapitre 3, la liaison à TFIIB n'est pas suffisante à expliquer la transactivation. Puisque Vpr interagit également avec le facteur de transcription SP1, l'hypothèse voulant que Vpr agisse comme adaptateur entre la machinerie basale, les facteurs de transcription généraux (TFIIA, TFIID, TFIIE, TFIIIF, TFIIH) et les facteurs de transcriptions liés au promoteur peut être envisagée. Ces interactions, si elles se produisent *in vivo*, pourraient se traduire soit par un meilleur recrutement de l'ARN Polymérase II à la boîte TATA, une augmentation de la stabilité du complexe formé par la machinerie basale de transcription ou encore par une augmentation même de l'initiation de la transcription. Cependant, tel que nous le démontrerons lors des études de corrélation entre la structure et les fonctions de Vpr, présentées plus loin dans la discussion, la localisation nucléaire de Vpr n'est pas requise pour la fonction de transactivation. La signification des liaisons avec les facteurs de transcription TFIIB et SP1 devra être analysée à la lumière de ces résultats. Par contre, nous ne pouvons écarter la possibilité qu'une faible quantité de Vpr se rendant au noyau, peut être suffisante à excercer l'effet observé.

Wang et collaborateurs (1995) constatent dans des expériences *in vitro* qu'un promoteur silencieux ne contenant qu'une boîte TATA ne peut être transactivé par Vpr, ce qui est en accord avec nos données (Wang *et al.*, 1995). Les résultats obtenus lors de cette étude indiquent de plus, que le promoteur ayant le niveau d'activité basale le plus faible est transactivé plus efficacement par Vpr (Wang *et al.*, 1995). La différence entre nos résultats et ces derniers est mal comprise mais pourrait être expliquée par la différence entre les systèmes utilisés. Ainsi, dans un système d'expression *in vitro*, la disponibilité des facteurs de transcription de la machinerie basale n'est pas un phénomène aussi limitant.

Vpr est un transactivateur modéré du LTR du VIH-1 lorsque comparé à la protéine Tat. Par contre, les résultats obtenus indiquent que la transactivation exercée par Vpr est tout de même détectable en présence du transactivateur puissant que représente la protéine Tat (figure 4; chapitre 3). Ces expériences de transfection transitoires en présence de Tat reflètent le rôle positif que Vpr exerce lors de l'infection.

Nos résultats indiquent que l'hélice- α amino-terminale n'est pas impliquée dans la fonction de transactivation tel qu'observé pour les protéines mutantes L23F et E25K (figure 5B, tableau 1; chapitre 3). Certains acides aminés hydrophobes de l'hélice- α centrale sont cependant importants pour cette fonction (LI68/70) (figure

5B, tableau 1; chapitre 3). Par contre, la structure même de cette hélice- α n'est pas requise pour la transactivation (R62P) (figure 5B, tableau 1; chapitre 3). La mutation des résidus leucine et isoleucine du domaine LR, qui est partiellement inclus dans l'hélice- α centrale, abolit la liaison de Vpr au facteur de transcription SP1 ainsi qu'à la protéine RIP (Zhao *et al.*, 1994a; Wang *et al.*, 1995). Bien que les résultats décrits concernent principalement le LTR du VIH-1, les protéines mutées au niveau du domaine LR (hélice- α centrale) ont également perdu leur capacité à transactiver le promoteur SL3-3 (tableau 1; chapitre 3). Ce promoteur ne contient pas de séquence de liaison au facteur SP1. L'importance du facteur de transcription SP1 dans la transactivation n'est donc pas générale. Donc, si la transactivation exercée par Vpr passe par la liaison à des protéines cellulaires, les acides aminés de cette région sont probablement impliqués dans la liaison à des protéines cellulaires autres que SP1. Le groupe d'Agostini et collaborateurs (1996) a déterminé que les acides aminés 15 à 77 de Vpr sont impliqués dans la liaison *in vitro* à la protéine TFIIB. Cette étude basée sur la délétion de la protéine Vpr ne précise pas l'apport des acides aminés correspondant à l'hélice- α centrale dans cette liaison. Une collaboration entre notre groupe et cette équipe a permis de déterminer que les protéines mutantes A30F et R80A sont toujours capables de lier la protéine TFIIB lors des essais *in vitro* (figure 6; chapitre 3). Il semblerait que la perte de transactivation ne soit donc pas due à une absence d'interaction entre Vpr et TFIIB. Puisque la transactivation peut s'exercer en absence de SP1 et que la liaison à TFIIB n'est pas le seul critère expliquant la transactivation, il serait intéressant, à cet effet, de déterminer l'implication des autres partenaires de Vpr (RIP et RIP-1) et des autres facteurs généraux de transcription dans la fonction de transactivation.

La mutation de l'acide aminé A30 entraîne une réduction de la transactivation (figure 5B, tableau 1; chapitre 3). La capacité de la protéine à être incorporée dans la particule virale est également perturbée. De plus, l'arrêt du cycle cellulaire induit par cette protéine mutante n'est pas aussi important que celui observé pour la protéine Vpr native (figure 5B, tableau 1; chapitre 3). La perte de fonction de la protéine mutante A30F repose donc probablement sur un changement conformationnel plutôt que sur la mutation d'un acide aminé important pour toutes les fonctions. Cette hypothèse a également été soulevée lors d'une autre étude où l'acide aminé 30 a été substitué pour un résidu leucine (Di Marzio *et al.*, 1995a).

Dans certains cas, la faible stabilité de la protéine peut expliquer la perte de transactivation. Effectivement, la stabilité des protéines altérées dans leur capacité à

transactiver varie entre 40% et 100% (tableau 1; chapitre 3). Par contre, la protéine mutante I63K démontre une faible stabilité (45%) et la fonction de transactivation est préservée. Parallèlement, la protéine mutante R80A démontre une stabilité comparable à la protéine sauvage (100%) et perd tout de même sa capacité à transactiver. Il semble donc que la stabilité de la protéine ne soit pas suffisante à expliquer la perte de transactivation.

Nous avons voulu établir une corrélation entre la transactivation et la localisation cellulaire de la protéine, déterminée par microscopie confocale (Subbramanian *et al.*, 1998b). La protéine Vpr de type sauvage est localisée au niveau périnucléaire et s'accumule également au niveau du nucléoplasme (Subbramanian *et al.*, 1998b). L'analyse des mutants par la même technique indique que la substitution des acides aminés de l'hélice- α amino-terminale et de l'hélice- α centrale (E25K, A30F, V57L, R62P, I63K, I63F, IL68/70) entraîne un changement dans la distribution cellulaire de la protéine (tableau 1; chapitre 3). Une localisation majoritairement périnucléaire accompagnée d'une perte significative de la localisation intra-nucléaire est observée. Par contre, bien que ces mutants perdent leur localisation nucléoplasmique, la plupart d'entre eux (E25K, V57L, R62P, I63F, I63K) conservent la fonction de transactivation. Parallèlement la protéine mutante R80A démontre une distribution cellulaire comparable à celle de la protéine Vpr de type sauvage et est pourtant incapable de transactiver (figure 5B, tableau 1; chapitre 3). La capacité des protéines à transactiver n'est donc pas liée à l'accumulation nucléoplasmique de celles-ci. La dissociation de la localisation nucléoplasmique de Vpr et des fonctions biologiques a été récemment confirmée (Mahalingam *et al.*, 1997a). Nos résultats indiquent également que le domaine responsable de l'incorporation de la protéine dans la particule virale est distinct de celui responsable de la transactivation tel qu'observé lors de l'étude des protéines mutantes L23F et E25K (tableau 1; chapitre 3).

Les protéines mutantes ont également été caractérisées pour leur aptitude à arrêter le cycle cellulaire (tableau 1; chapitre 3) (Yao *et al.*, 1998). Des cellules Jurkat ont été infectées par des virus mutés pour la séquence *vpr* et pseudotypés avec l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculaire (protéine G de VSV). Les résultats obtenus indiquent que la capacité de la protéine Vpr à arrêter le cycle cellulaire corrèle avec sa capacité à transactiver (tableau 1; chapitre 3). Ainsi, les mutants capables de transactiver sont aussi capables d'arrêter le cycle à l'étape G2/M (L23F, E25K, V57L, R62P, I63F, I63K). De plus, le mutant R80A perd la fonction d'arrêt

du cycle cellulaire en même temps que sa fonction de transactivation. Il existe donc un lien entre ces deux fonctions. La relation entre ces deux phénomènes sera discutée plus loin.

Les protéines LI68/70RK, R80A ont été analysées pour leur capacité à agir comme transdominants négatifs (résultats non-présentés). Ces expériences ont été répétées plusieurs fois et bien qu'une grande variation ait été observée entre chaque expérience, les mutants incapables de transactiver ne diminuent pas la capacité de la protéine Vpr de type sauvage à exercer sa fonction. Bien que les mutants LI68/70RK et R80A ne peuvent agir comme transdominants négatifs, il est tout de même possible que de telles protéines puissent exister. L'identification de ces protéines pourraient nous aider à comprendre les mécanismes fondamentaux gouvernant la fonction de transactivation de Vpr.

Nous avons également constaté, lors d'expériences préliminaires, que Vpr exerce un effet positif sur l'expression virale dans les cellules Jurkat infectées. Il semble, selon les expériences présentées ici, que l'effet de Vpr sur le métabolisme cellulaire, soit l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose, entraîne une sous-estimation de la production virale. Ainsi, l'inhibition de croissance cellulaire causée par la fonction d'arrêt du cycle cellulaire de Vpr fait en sorte qu'un nombre plus faible de cellules que celui estimé, soit responsable de la production virale. La normalisation de la production virale, mesurée par l'activité transcriptase inverse sur le nombre de cellules permet ainsi d'évaluer l'effet réel de Vpr. Aucun biais n'est cependant ajouté lors de cette normalisation. En effet, l'augmentation détectée se produit précocément avant qu'il n'y ait trop de nécrose cellulaire (Yao *et al.*, 1998). De plus, les cellules qui meurent par apoptose et les cellules arrêtées dans leur cycle cellulaire n'incorporent pas le bleu de trypan et sont donc comptabilisées comme des cellules vivantes. Dans les données présentées ici, cet effet est mesurable tôt suivant l'infection et est mis en évidence par l'augmentation de l'activité transcriptase inverse présente dans le surnageant de culture des cellules infectées résultant d'une augmentation des niveaux d'ARN viraux dans les cellules. Bien que ces données soient préliminaires, ces analyses ont été poursuivies plus en profondeur par Yao et collaborateurs (Yao *et al.*, 1998). Celles-ci confirment effectivement une augmentation de la production de particules virales par Vpr qui est reflétée par une synthèse accrue des protéines virales dans la cellule. Les résultats de cette étude indiquent de plus que l'augmentation d'ARN viral n'est pas la conséquence d'une entrée accrue des ARNs génomiques dans la cellule mais est bien reliée à une

augmentation d'environ deux fois de la quantité des ARN génomiques et épissés. La capacité de Vpr à augmenter la production virale semble également reliée à l'effet cytotatique de la protéine, tel qu'observé par l'utilisation d'un système d'expression transitoire.

Les effets cytotatiques et cytotoxiques reliés à Vpr n'ont été que récemment compris (He *et al.*, 1995; Jowett *et al.*, 1995; Planelles *et al.*, 1995; Re *et al.*, 1995). Ce phénomène explique probablement l'incapacité de plusieurs équipes, par le passé, à mettre en évidence un rôle positif de Vpr dans la production virale chez les lymphocytes T CD4+. Dans des conditions normales d'infection (virus non-pseudotypé et M.O.I. plus faible), les quantités maximales de virus produit en présence ou en absence de Vpr deviennent similaires. En effet, les cellules infectées par le virus n'exprimant pas Vpr sont en plus grand nombre et plusieurs cycles d'infection peuvent être initiés. L'utilisation des virus pseudotypés et l'infection à haute multiplicité permet d'éviter ce phénomène. Il semble donc que les cellules soient arrêtées dans leur cycle par Vpr et que chacune de celles-ci produise plus de virus. L'influence de Vpr sur la physiologie cellulaire, notamment par l'arrêt du cycle des cellules entraîne un effet positif sur la production virale. Des résultats préliminaires obtenus lors de cette étude et confirmés par Subbramanian et collaborateurs ont également permis de mettre en évidence une augmentation transcriptionnelle chez les macrophages (1998). Effectivement, Subbramanian et collaborateurs (1998) ont observé une augmentation des ARN viraux par hybridation *in situ*, chez les macrophages infectés par des virus exprimant Vpr (Subbramanian *et al.*, 1998a). Bien que ces cellules soient quiescentes et ne soient pas poussées vers l'étape G2/M du cycle cellulaire, Vpr exerce probablement un effet différent sur le métabolisme cellulaire permettant également une augmentation de l'expression virale.

Bien qu'une augmentation des niveaux d'ARN viraux soit détectée, le mécanisme par lequel Vpr augmente l'expression virale n'est toujours pas identifié. Il est possible que l'arrêt du cycle cellulaire soit indirectement responsable de l'augmentation mesurée en permettant un meilleur environnement pour la transcription. Ainsi, l'arrêt du cycle cellulaire pourrait permettre la régulation de facteurs de transcription, ou de co-activateurs tels la p300 et CBP (CREB binding protein) et qui seraient responsables de l'augmentation de la transcription observée (Cullen, 1992). Une étude publiée lors des derniers mois indique que Vpr de par son effet cytotatique, permet l'activation de p300 (Felzien *et al.*, 1998).

Il est également possible que Vpr soit impliqué directement dans l'activation transcriptionnelle. Cette hypothèse repose sur les interactions entre Vpr et des protéines cellulaires impliquées dans la transcription, mises en évidence par plusieurs équipes (Refaeli *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995; Agostini *et al.*, 1996). Cependant cette hypothèse trouve sa limite dans le fait que ces études de liaisons ont été effectuées *in vitro*. Une autre étude très récente a démontré que le LTR du VIH-1 est plus actif lors de la phase G2/M du cycle cellulaire (Goh *et al.*, 1998). Leur explication d'un tel phénomène est que certains facteurs de transcription peuvent être exprimés ou activés durant cette phase précise du cycle cellulaire. Cependant, nous avons démontré l'absence de spécificité dans la fonction de transactivation de Vpr puisque plusieurs promoteurs ne démontrant pas d'homologie de séquence peuvent être transactivés par cette protéine. Il est possible que le LTR du VIH-1 soit plus accessible aux facteurs de transcription de la machinerie basale durant cette étape du cycle cellulaire. Cependant, cette hypothèse reste à vérifier.

Il semble que Vpr agisse sur la physiologie cellulaire entraînant ainsi une augmentation de l'expression des gènes hétérologues tel que démontré par le système d'expression transitoire et des gènes viraux lors de l'infection des lymphocytes T et des macrophages. Nous avons voulu séparer ces deux phénomènes (l'effet sur la physiologie cellulaire et la transactivation) afin de clarifier la manière dont Vpr manipule l'environnement cellulaire. Nous avons utilisé pour ce faire, une lignée primaire de rhabdomyosarcome très peu différenciée, exprimant Vpr, afin de pouvoir observer les effets subtiles que Vpr pourrait avoir sur la différenciation ou sur la morphologie cellulaire.

Les résultats présentés au chapitre 4, ont tenté de clarifier l'effet de Vpr sur la physiologie cellulaire. Les cellules RSH-AC1 ont été utilisées car elles sont d'origine primaire et démontre un faible niveau de différenciation (Babaï *et al.*, 1990). L'expression de Vpr entraîne l'apparition de changements morphologiques importants chez le clone M2. Ces changements morphologiques sont associés à la présence de cellules géantes multinuclées. Par contre, lors de l'analyse de l'expression des marqueurs de différenciation, nous n'avons observé aucune différence entre les cellules parentales (RSH-AC1), les cellules induites et les cellules non-induites pour l'expression de Vpr (résultats non-présentés). Il n'est donc pas clair si les changements morphologiques observés sont effectivement reliés à la différenciation des cellules ou simplement à un dérèglement du cycle cellulaire. Des analyses préliminaires indiquent cependant que les cellules RSH-AC1 ne peuvent être

poussées dans le processus de différenciation par des agents chimiques tels les phorbols ester. Ce phénomène a déjà été observé chez d'autres types de lignées de rhabdomyosarcome (RD, Rh30) et semble relié à un blocage empêchant l'activation transcriptionnelle par MyoD (Tapscott *et al.*, 1988). Afin d'observer, une différenciation cellulaire proprement dite, il serait intéressant d'utiliser la lignée TE671 ou tout autre lignée pluripotente.

L'activité biologique d'arrêt du cycle cellulaire à l'étape G2/M est observé chez le clone M2 exprimant Vpr. Les résultats obtenus pour ce clone montre que leur croissance est ralentie lorsqu'elles expriment la protéine Vpr. La diminution de croissance présentée à la figure 6 est visible dès le jour 5 alors que les résultats de la figure 7 indiquent qu'une proportion des cellules sont arrêtées à l'étape G2/M dès 72 heures. Cette différence peut s'expliquer de deux manières. Premièrement, il peut y avoir eu une variation expérimentale puisque ces résultats proviennent de deux expériences indépendantes. Deuxièmement, avant de détecter une différence au niveau du nombre de cellules, il faut au moins qu'une proportion importante de cellules aient été arrêtées pendant un cycle de division (24 heures).

L'analyse du cycle cellulaire par cytométrie évalue la proportion des cellules à l'étape G2/M à un moment précis. L'arrêt du cycle cellulaire à l'étape G2/M peut, par contre, résulter d'une incapacité des cellules à franchir cette phase dans les temps normalement requis et non d'un blocage proprement dit. Ainsi, selon cette hypothèse, les cellules auraient la possibilité de compléter un cycle cellulaire normal mais dans un temps beaucoup plus long. La seconde hypothèse veut que le blocage des cellules à l'étape G2/M soit causé par une anomalie à la phase S. L'accomplissement d'un cycle cellulaire normal requiert la concertation entre les différentes phases du cycle. Ainsi, la phase M ne peut être amorcé que si la phase S est dûment complétée (Heichman & Roberts, 1994; Nurse, 1994). Ce processus semble reposer, entre autre, sur la protéine p34CDC2 (Handeli & Weintraub, 1992; Hayles *et al.*, 1994). L'hypothèse d'une anomalie à la phase S empêchant l'entrée dans la phase M permet d'expliquer la polyploïdie de la cellule et le blocage à l'étape G2/M. L'expression de Vpr produirait donc une réplication constante de l'ADN sans qu'il n'y ait séparation des cellules-mères en cellules-filles. Un phénomène semblable a déjà été décrit (Handeli & Weintraub, 1992; Hayles *et al.*, 1994). Les raisons de la réplication constante d'ADN en présence de Vpr sont par contre mal comprises.

Un mécanisme de résistance à l'effet de Vpr semble exister. En effet le clone C1 exprime de hauts niveaux de la protéine et ne démontre pourtant pas les

phénotypes observés pour le clone M2. La résistance peut provenir de la mutation ou de la modulation de l'expression d'une protéine cellulaire importante pour l'activité de Vpr, tel les protéines *cdc25C* ou *p34CDC2*. Il serait donc intéressant de déterminer si des changements qualitatifs ou quantitatifs différents se sont produits dans la voie menant à la phosphorylation de la *p34CDC2* chez les clones M2 et C1. Cependant, il est fort possible que l'absence d'un effet de Vpr chez le clone C1 soit dû à un effet clonal.

L'effet négatif de l'expression de Vpr sur la physiologie cellulaire est également observé lors des essais d'immunofluorescence indirecte effectués sur le clone M2. L'analyse de ces résultats indique que la protéine ne peut être détectée dans la majorité des cellules. Puisque les cellules sont résistantes aux antibiotiques, l'absence de signal provient probablement de la faiblesse plutôt que de l'absence d'expression. En effet, le marquage métabolique et l'immunoprécipitation de Vpr dans ces cellules indiquent que la protéine est exprimée efficacement. Contrairement à l'immunofluorescence, la technique d'immunoprécipitation permet de déterminer la quantité de protéines dans la totalité des cellules et non pour des cellules individuelles. Il semble donc que l'expression de Vpr soit maintenue à un niveau minimal dans la cellule. Un signal d'immunofluorescence a, par contre, pu être détecté chez quelques cellules. Dans la majorité des cas, ces cellules possèdent une morphologie anormale. Ces résultats indiquent une fois de plus que Vpr exerce une influence sur le métabolisme cellulaire. Les résultats d'immunofluorescence indiquent également que la localisation de Vpr, chez les quelques cellules observées, est majoritairement périnucléaire chez le clone M2 (figures 2A, 2B; chapitre 4). La capacité de Vpr à exercer son effet physiologique chez le clone M2 est donc indépendante de la capacité de la protéine à entrer à l'intérieur du noyau. L'indépendance de la localisation nucléaire et des fonctions biologiques de la protéine a déjà été observée dans le cas de la transactivation et de l'arrêt du cycle cellulaire au chapitre 4 ainsi que par d'autres équipes (Mahalingam *et al.*, 1997a).

Certains des résultats de Levy et collaborateurs sont quelques peu différents des nôtres. Ce groupe a démontré que Vpr induit la différenciation des cellules TE671, ce qui n'a pu être démontré pour les cellules RSH-AC1 (Levy *et al.*, 1993). De plus, Levy et collaborateurs observent la présence de la myosine chez les TE671 exprimant Vpr, ce que nous n'avons pu faire par l'utilisation des RSH-AC1. La différence entre nos résultats provient vraisemblablement des lignées utilisées. En effet, contrairement à la lignée RSH-AC1 et RD, les TE671 peuvent se différencier

suite à l'induction aux phorbols ester (Tapscott *et al.*, 1988). Lors de cette étude, un changement morphologique chez les cellules RD semblable à celui démontré chez les cellules RSH-AC1 a été observé (Levy *et al.*, 1993). Ceci implique donc que les cellules TE671 peuvent activer leur programme de différenciation, ce qui n'est pas clair pour les cellules RSH-AC1. Nos résultats suggèrent par contre, que les changements morphologiques sont possibles en absence de différenciation. Le mécanisme qui peut être envisagé est que, Vpr arrête le cycle des cellules à l'étape G2/M et ce changement dans la physiologie cellulaire, est responsable de la différenciation de la cellule lorsque celle-ci en est capable. Dans le cas où les cellules de rhabdomyosarcome ne peuvent se différencier, comme cela semble être le cas pour les cellules RSH-AC1, le dérèglement du cycle cellulaire entraîne un changement morphologique important, accompagné d'une réplication constante de l'ADN. Les résultats préliminaires obtenus lors de cette étude sont appuyés par des résultats récents démontrant un lien entre les phénomènes de différenciation observés chez les rhabdomyosarcomes et la fonction d'arrêt du cycle cellulaire (Mahalingam *et al.*, 1997a).

Les clones C1 et M2 donnent à première vue des résultats contradictoires. Ces résultats proviennent probablement de la particularité de chacun des deux clones. Cependant, tel qu'observé pour le clone M2, le phénomène d'arrêt du cycle cellulaire à l'étape G2/M a été constaté chez plusieurs types cellulaires (HeLa, COS., 293T). D'un autre côté, la résistance à l'effet cytotoxique et cytostatique de Vpr, tel qu'observé chez le clone C1, est un phénomène largement observé plus particulièrement chez les lymphocytes T infectés. Il est donc possible que les résultats différents observés reflètent deux phénomènes coexistants. Cependant des expériences supplémentaires doivent être effectuées. Il serait intéressant d'étudier ces mêmes phénomènes chez une population cellulaire non-clonale.

Chapitre 6

Conclusions, perspectives et contribution

1. Conclusions et perspectives

L'effet de Vpr sur l'augmentation des niveaux d'ARN messagers a été observé par l'utilisation du système d'expression transitoire. Ce phénomène se produit également chez les lymphocytes T tel que suggéré par les résultats de la section 3.6 du chapitre 3 qui ont été confirmés par Yao et collaborateurs (1998). Les résultats du chapitre 3 indiquent que la transactivation s'effectue sur les promoteurs ayant un niveau d'expression basale élevé. Ce phénomène explique la capacité de Vpr à transactiver de façon générale la plupart des promoteurs incluant le LTR du VIH-1 et le LTR SL3-3 du virus de la leucémie murine. *In vivo*, les cellules cibles de l'infection (lymphocytes T et macrophages) démontrent un niveau d'expression basale élevé du LTR du VIH-1 lorsqu'elles sont activées. L'infection de ces cellules peut donc être influencée par Vpr. Le premier mécanisme proposé, expliquant la transactivation générale des promoteurs, repose sur l'interaction entre Vpr et les protéines impliquées dans la transcription. A cet effet, il est possible que Vpr exerce son action sur le complexe formé par les facteurs de transcription et la machinerie basale.

Le second mécanisme expliquant la transactivation générale de promoteurs par Vpr repose sur le fait que l'arrêt du cycle à l'étape G2/M puisse permettre une augmentation indirecte de la transcription et/ou une augmentation de la stabilité des ARN messagers. L'hypothèse voulant que l'arrêt du cycle cellulaire induise un environnement favorable à l'expression des gènes a également été émise par le Dr. Emerman (1996). Il semble que l'inactivation de kinases cellulaires, durant la division cellulaire, inhibe la transcription (Hartl *et al.*, 1993). Puisqu'il a été démontré que Vpr agit sur des kinases et phosphatases responsables de la régulation du cycle cellulaire, l'arrêt du cycle cellulaire induit par Vpr favoriserait possiblement la transcription. Nos études ont effectivement démontré une corrélation entre l'arrêt du cycle cellulaire et la transactivation. Etant donné que la transactivation ne dépend pas d'une séquence nucléotidique particulière et que les interactions de Vpr avec les protéines cellulaires identifiées jusqu'ici n'expliquent pas totalement la transactivation, l'hypothèse voulant que la transactivation soit le résultat de l'arrêt du cycle cellulaire, est plus probable.

Les domaines de Vpr responsables de la fonction de transactivation ont été identifiés lors de cette étude. Ces domaines sont situés au niveau de l'hélice- α centrale et impliquent les acides aminés hydrophobes (LI68/70). Les acides aminés de la région carboxy-terminale (R80A) sont également requis pour cette fonction.

Nous avons également pu montrer, lors de nos expériences, l'indépendance de la localisation nucléoplasmique de la protéine sur la fonction de transactivation de même que la différence entre les déterminants responsables de l'incorporation de la protéine dans la particule virale et ceux responsables de la transactivation.

Les résultats présentés au chapitre 4 suggèrent que Vpr cause un important changement dans la physiologie de la cellule. Il est possible que l'expression de Vpr soit régulée négativement afin d'assurer le maintien d'un environnement cellulaire adéquat. Dans le cas du clone M2, l'expression de Vpr cause un changement de morphologie de même qu'une accumulation d'ADN dans la cellule qui semblent être causés, selon les résultats obtenus pour ce clone, par une perturbation du cycle cellulaire. Il semble donc, que Vpr agisse sur la physiologie cellulaire causant un arrêt du cycle à l'étape G2/M.

D'après les analyses corrélationnelles que nous avons effectuées, l'arrêt du cycle cellulaire induit par Vpr est associé de près à l'augmentation des niveaux d'ARN viraux. Les gènes qui peuvent être transactivés par Vpr doivent, par contre, posséder un niveau d'activité basale élevé. Le modèle proposé est que la protéine Vpr, par son activité d'arrêt du cycle cellulaire est capable d'augmenter les niveaux d'ARN viraux. Cette transactivation permet d'obtenir un niveau d'expression des protéines virales plus élevé et optimise ainsi la réplication et la propagation du virus. L'avantage que procure Vpr à la réplication du virus est probablement critique à la propagation et la dissémination du virus avant que les cellules infectées, qui ont une demie-vie très courte, ne soient éliminées par le système immunitaire (Ho *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 1995; Perelson *et al.*, 1996). Si tel est le cas, la protéine Vpr fournie par la particule virale doit jouer un rôle important dans ce phénomène. L'induction de l'arrêt à la phase G2 de façon très précoce lors de l'infection pourrait permettre d'optimiser la transcription basale à partir du provirus intégré avant même l'expression de Tat. Ce rôle précoce de Vpr dans l'infection peut expliquer en partie sa présence dans la particule virale.

Plusieurs phénomènes associés à Vpr restent à clarifier.

1- Clarifier comment l'arrêt du cycle cellulaire par Vpr cause une augmentation de l'expression des gènes.

Ce phénomène pourrait être étudié en analysant l'accessibilité du LTR du VIH-1 à l'étape G2/M du cycle cellulaire par empreinte à la DNase. Il serait

intéressant également de vérifier par librairie différentielle l'induction ou l'inhibition de l'expression de protéines cellulaires par Vpr.

2- Déterminer comment la localisation cytoplasmique de Vpr peut influencer tout de même la transcription des gènes.

Ce phénomène peut être analysé en déterminant si la localisation cellulaire de certaines protéines (facteurs de transcription) est modifiée en présence de Vpr.

3- Identifier la cible de Vpr dans l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire.

L'utilisation du système des deux hybrides, de chromatographie d'affinité et de liaison chimique sont des avenues intéressantes dans l'identification de protéines cibles de Vpr.

4- Clarifier l'effet de Vpr sur la physiologie cellulaire.

Afin d'analyser ce phénomène de façon plus approfondie, il serait important d'étudier une population cellulaire totale exprimant Vpr et non une lignée clonale. L'utilisation de cellules pluripotentes pour la différenciation pourrait donner une bonne indication sur la voie activée par Vpr.

5-Discerner le rôle de Vpr fournie par la particule virale de celui de la protéine synthétisée *de novo*.

Des systèmes permettant l'incorporation de Vpr *en trans*, dans un provirus ne codant pas la protéine Vpr sont déjà en place au laboratoire. Il reste cependant à mettre au point les conditions optimales d'infection pour permettre l'initiation de cette étude.

2. Contribution

Les études présentées au chapitre 3 ont permis pour la première fois de démontrer dans un système *in vivo*, l'implication de Vpr dans les mécanismes reliés à la transcription. Au cours de mon passage au laboratoire du Dr. Cohen, j'ai été responsable du développement du système d'expression des protéines inductible à la tétracycline. Ce système a été utilisé lors de l'analyse présentée au chapitre 4 mais a également été utilisé avec succès par d'autres personnes du laboratoire et du département de microbiologie et d'immunologie. Les lignées ainsi générées ont servi à mettre en évidence pour la première fois au laboratoire, l'implication de Vpr dans le ralentissement de la croissance cellulaire et dans les changements morphologiques. D'ailleurs, les études présentées au chapitre 4 ont pu mettre en évidence pour la première fois le lien entre les changements morphologiques et l'arrêt du cycle des cellules.

J'ai également été responsable de l'introduction du système des deux hybrides au laboratoire de même que du système de surexpression pYes chez la levure ainsi que des techniques de marquage radioactif des protéines de la levure.

Lors des derniers mois de mon doctorat, j'ai participé à la démonstration du lien entre l'arrêt du cycle cellulaire chez les lymphocytes T et l'augmentation de la réplication virale par Vpr. Ces analyses présentées à la section 3.5 du chapitre 3 ont permis au Dr. Yao de faire la démonstration présentée dans l'article intitulé "*Vpr-mediated cytopathic effect and stimulation of HIV-1 viral production in dividing Jurkat T cells*", dont je suis quatrième auteure.

J'ai introduit les techniques de RT-PCR et PCR semi-quantitatif qui ont été utilisés lors de plusieurs études menées au laboratoire et qui continuent d'être couramment utilisées. Grâce à l'élaboration de ces techniques, j'ai pu initier les premières expériences démontrant l'implication de Vpr dans les étapes transcriptionnelles chez les macrophages qui ont été approfondies dans l'article intitulé "*Human immunodeficiency virus type 1 Vpr is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages*" du Dr. Subbramanian où je suis quatrième auteure.

Chapitre 7
Bibliographie

Agostini, I., Navarro, J. M., Rey, F., Bouhamdan, M., Spire, B., Vigne, R. & Sire, J. (1996). The human immunodeficiency virus type 1 Vpr transactivator: cooperation with promoter-bound activator domains and binding to TFIIB. *Journal of Molecular Biology* **261**(5), 599-606.

Aldrovandi, G. M. & Zack, J. A. (1996). Replication and pathogenicity of human immunodeficiency virus type 1 accessory gene mutants in SCID-hu mice. *Journal of Virology* **70**(3), 1505-11.

Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M. & Berger, E. A. (1996). CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**(5270), 1955-8.

Arrigo, S. J. & Chen, I. S. (1991). Rev is necessary for translation but not cytoplasmic accumulation of HIV-1 vif, vpr, and env/vpu 2 RNAs. *Genes & Development* **5**(5), 808-19.

Arya, S. K., Gallo, R. C., Hahn, B. H., Shaw, G. M., Popovic, M., Salahuddin, S. Z. & Wong-Staal, F. (1984). Homology of genome of AIDS-associated virus with genomes of human T-cell leukemia viruses. *Science* **225**(4665), 927-30.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. G. & Struhl, K. (1991). *Current protocols in molecular biology* (Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. G. & Struhl, K., Eds.). 2 vols, Greene Publishing associates and John Wiley & sons, New-York.

Ayyavoo, V., A., M., Mahalingam, S., Ramalingam, R., Kudchodkar, S., Williams, W. V., Green, D. R. & Weiner, D. B. (1997a). HIV-1 suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor kappa-B. *Nature Medicine* **3**(10), 1117-1122.

Ayyavoo, V., Mahalingam, S., Rafaeli, Y., Kudchodkar, S., Chang, D., Nagashunmugam, T., Williams, W. V. & Weiner, D. B. (1997b). HIV-1 viral protein

- R (Vpr) regulates viral replication and cellular proliferation in T cells and monocytoïd cells in vitro. *Journal of Leukocyte Biology* **62**(1), 93-9.
- Baba, T. W., Jeong, Y. S., Pennick, D., Bronson, R., Greene, M. F. & Ruprecht, R. M. (1995). Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques [see comments]. *Science* **267**(5205), 1820-5.
- Babai, F., Musevi-Aghdam, J., Schurch, W., Royal, A. & Gabbiani, G. (1990). Coexpression of alpha-sarcomeric actin, alpha-smooth muscle actin and desmin during myogenesis in rat and mouse embryos I. Skeletal muscle. *Differentiation* **44**(2), 132-42.
- Badley, A. D., McElhinny, J. A., Leibson, P. J., Lynch, D. H., Alderson, M. R. & Paya, C. V. (1996). Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *Journal of Virology* **70**(1), 199-206.
- Baeuerle, P. A. & Henkel, T. (1994). Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annual Review of Immunology* **12**, 141-79.
- Balliet, J. W., Kolson, D. L., Eiger, G., Kim, F. M., McGann, K. A., Srinivasan, A. & Collman, R. (1994). Distinct effects in primary macrophages and lymphocytes of the human immunodeficiency virus type 1 accessory genes vpr, vpu, and nef: mutational analysis of a primary HIV-1 isolate. *Virology* **200**(2), 623-31.
- Balotta, C., Lusso, O., Crowley, R., Gallo, R. C. & Franchini, G. (1993). Antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides targeted to the vpr Gene inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in primary human macrophages. *Journal of Virology* **67**, 4409-4414.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**(252), 1209-11.
- Banda, N. K., Bernier, J., Kurahara, D. K., Kurrle, R., Haigwood, N., Sekaly, R. P. & Finkel, T. H. (1992). Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120

primes T cells for activation-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* **176**(4), 1099-106.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**(4599), 868-71.

Bartz, S. R., Rogel, M. E. & Emerman, M. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 cell cycle control: Vpr is cytostatic and mediates G2 accumulation by a mechanism which differs from DNA damage checkpoint control. *Journal of Virology* **70**(4), 2324-31.

Beg, A. A. & Baltimore, D. (1996). An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death [see comments]. *Science* **274**(5288), 782-4.

Benezra, R., Davis, R. L., Lockshon, D., Turner, D. L. & Weintraub, H. (1990). The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* **61**(1), 49-59.

Berkner, K. L. & Folk, W. R. (1977). Polynucleotide kinase exchange reaction: quantitative assay for restriction endonuclease-generated 5'-phosphoryl termini in DNA. *Journal of Biological Chemistry* **252**(10), 3176-84.

Berson, J. F., Long, D., Doranz, B. J., Rucker, J., Jirik, F. R. & Doms, R. W. (1996). A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *Journal of Virology* **70**(9), 6288-95.

Bhat, S., Spitalnik, S. L., Gonzalez-Scarano, F. & Silberberg, D. H. (1991). Galactosyl ceramide or a derivative is an essential component of the neural receptor for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(16), 7131-4.

Bodéus, M., Margottin, F., Durand, H., Rouer, E. & Benarous, R. (1997). Inhibition of prokaryotic cell growth by HIV-1 Vpr. *Res. Virol.* **148**, 207-213.

Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Blair, W. S. & Cullen, B. R. (1993). Genetic evidence that the Tat proteins of human immunodeficiency virus types 1 and 2 can multimerize in the eukaryotic cell nucleus. *Journal of Virology* **67**(8), 5030-4.

Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Madore, S. & Cullen, B. R. (1995). Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell* **82**(3), 485-94.

Borman, A. M., Quillent, C., Charneau, P., Dauguet, C. & Clavel, F. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Vif- mutant particles from restrictive cells: role of Vif in correct particle assembly and infectivity. *Journal of Virology* **69**(4), 2058-67.

Bouhamdan, M., Benichou, S., Rey, F., Navarro, J. M., Agostini, I., Spire, B., Camonis, J., Slupphaug, G., Vigne, R., Benarous, R. & Sire, J. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein binds to the uracil DNA glycosylase DNA repair enzyme. *Journal of Virology* **70**(2), 697-704.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E. & Arnold, H. H. (1989). A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO Journal* **8**(3), 701-9.

Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M. & Stevenson, M. (1993a). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells [see comments]. *Nature* **365**(6447), 666-9.

Bukrinsky, M. I., Sharova, N., Dempsey, M. P., Stanwick, T. L., Bukrinskaya, A. G., Haggerty, S. & Stevenson, M. (1992). Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(14), 6580-4.

- Bukrinsky, M. I., Sharova, N., McDonald, T. L., Pushkarskaya, T., Tarpley, W. G. & Stevenson, M. (1993b). Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(13), 6125-9.
- Buratowski, S. (1994). The basics of basal transcription by RNA polymerase II. *Cell* **77**(1), 1-3.
- Calkhoven, C. F. & Ab, G. (1996). Multiple steps in the regulation of transcription factor level and activity. *Biochemical Journal* **317**, 329-342.
- Cao, Y. Z., Friedman-Kien, A. E., Huang, Y. X., Li, X. L., Mirabile, M., Moudgil, T., Zucker-Franklin, D. & Ho, D. D. (1990). CD4-independent, productive human immunodeficiency virus type 1 infection of hepatoma cell lines in vitro. *Journal of Virology* **64**(6), 2553-9.
- Celander, D. & Haseltine, W. A. (1984). Tissue-specific transcription preference as a determinant of cell tropism and leukaemogenic potential of murine retroviruses. *Nature* **312**(5990), 159-62.
- Celander, D., Hsu, B. L. & Haseltine, W. A. (1988). Regulatory elements within the murine leukemia virus enhancer regions mediate glucocorticoid responsiveness. *Journal of Virology* **62**(4), 1314-22.
- Charneau, P. & Clavel, F. (1991). A single-stranded gap in human immunodeficiency virus unintegrated linear DNA defined by a central copy of the polypurine tract. *Journal of Virology* **65**(5), 2415-21.
- Checroune, F., Yao, X. J., Gottlinger, H. G., Bergeron, D. & Cohen, E. A. (1995). Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1: role of conserved regions within the P6 domain of Pr55gag. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirology* **10**(1), 1-7.

Chen, C. A. & Okayama, H. (1988). Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* **6**(7), 632-8.

Chen, G., Shi, L., Litchfield, D. W. & Greenberg, A. H. (1995). Rescue from granzyme B-induced apoptosis by Wee1 kinase. *Journal of Experimental Medicine* **181**(6), 2295-300.

Cheng-Mayer, C., Quiroga, M., Tung, J. W., Dina, D. & Levy, J. A. (1990). Viral determinants of human immunodeficiency virus type 1 T-cell or macrophage tropism, cytopathogenicity, and CD4 antigen modulation. *Journal of Virology* **64**(9), 4390-8.

Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. & Sodroski, J. (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**(7), 1135-48.

Chou, P. Y. & Fasman, G. D. (1974). Prediction of protein conformation. *Biochemistry* **13**, 222-245.

Chou, P. Y. & Fasman, G. D. (1978). Empirical predictions of protein conformation. *Annual Review of Biochemistry* **47**, 251-76.

Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C. & *et al.* (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**(4761), 343-6.

Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P. & *et al.* (1986). Human immunodeficiency viruses [letter]. *Science* **232**(4751), 697.

Cohen, E. A., Dehni, G., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. (1990a). Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *Journal of Virology* **64**(6), 3097-9.

Cohen, E. A., Terwilliger, E. F., Jalinoos, Y., Proulx, J., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. (1990b). Identification of HIV-1 vpr product and function. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **3**(1), 11-8.

Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W. & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**(11), 3240-4.

Collette, Y., Dutartre, H., Benziene, A. & Olive, D. (1997). The role of HIV1 Nef in T-cell activation: Nef impairs induction of Th1 cytokines and interacts with the Src family tyrosine kinase Lck. *Research in Virology* **148**(1), 52-8.

Connor, R. I., Chen, B. K., Choe, S. & Landau, N. R. (1995). Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* **206**(2), 935-44.

Cooper, D. A., Gold, J., Maclean, P., Donovan, B., Finlayson, R., Barnes, T. G., Michelmore, H. M., Brooke, P. & Penny, R. (1985). Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* **1**(8428), 537-40.

Coppola, J. A., Lewis, B. A. & Cole, M. D. (1990). Increased retinoblastoma gene expression is associated with late stages of differentiation in many different cell types. *Oncogene* **5**(11), 1731-3.

Cosson, P. (1996). Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO Journal* **15**(21), 5783-8.

Courey, A. J. & Tjian, R. (1988). Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* **55**(5), 887-98.

Crabtree, G. R. (1989). Contingent genetic regulatory events in T lymphocyte activation. *Science* **243**(4889), 355-61.

Cullen, B. R. (1992). Mechanism of action of regulatory protein encoded by complex retroviruses. *Microbiological Reviews* **56**, 375-394.

Daly, T. J., Cook, K. S., Gray, G. S., Maione, T. E. & Rusche, J. R. (1989). Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. *Nature* **342**(6251), 816-9.

Davis, B. R., Schwartz, D. H., Marx, J. C., Johnson, C. E., Berry, J. M., Lyding, J., Merigan, T. C. & Zander, A. (1991). Absent or rare human immunodeficiency virus infection of bone marrow stem/progenitor cells in vivo. *Journal of Virology* **65**(4), 1985-90.

Davis, R. L., Cheng, P. F., Lassar, A. B. & Weintraub, H. (1990). The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* **60**(5), 733-46.

De Luca, A., Teofili, L., Antinori, A., Iovino, M. S., Mencarini, P., Visconti, E., Tamburrini, E., Leone, G. & Ortona, L. (1993). Haemopoietic CD34+ progenitor cells are not infected by HIV-1 in vivo but show impaired clonogenesis. *British Journal of Haematology* **85**(1), 20-4.

Debatin, K. M., Fahrig-Faissner, A., Enenkel-Stoodt, S., Kreuz, W., Benner, A. & Krammer, P. H. (1994). High expression of APO-1 (CD95) on T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1-infected children [letter]. *Blood* **83**(10), 3101-3.

Dedera, D., Hu, W., Vander Heyden, N. & Ratner, L. (1989). Viral protein R of human immunodeficiency virus types 1 and 2 is dispensable for replication and cytopathogenicity in lymphoid cells. *Journal of Virology* **63**(7), 3205-8.

Demarchi, F., D'Agaro, P., Falaschi, A. & Giacca, M. (1993). In vivo footprinting analysis of constitutive and inducible protein-DNA interactions at the long terminal repeat of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* **67**(12), 7450-60.

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R. & Landau, N. R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1 [see comments]. *Nature* **381**(6584), 661-6.

Di Marzio, P., Choe, S., Ebright, M., Knoblauch, R. & Landau, N. R. (1995a). Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *Journal of Virology* **69**(12), 7909-16.

Doranz, B. J., Berson, J. F., Rucker, J. & Doms, R. W. (1997). Chemokine receptors as fusion cofactors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Immunologic Research* **16**(1), 15-28.

Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G. & Doms, R. W. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**(7), 1149-58.

Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P. & Paxton, W. A. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5 [see comments]. *Nature* **381**(6584), 667-73.

Earl, P. L., Doms, R. W. & Moss, B. (1990). Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(2), 648-52.

el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**(4), 817-25.

Embretson, J., Zupancic, M., Ribas, J. L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K. & Haase, A. T. (1993). Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS [see comments]. *Nature* **362**(6418), 359-62.

- Emerman, M. (1996). HIV-1 Vpr and the cell cycle. *Current Biology* **6**, 1096-1103.
- Endo, T. & Goto, S. (1992). Retinoblastoma gene product Rb accumulates during myogenic differentiation and is deinduced by the expression of SV40 large T antigen. *Journal of Biochemistry* **112**(4), 427-30.
- Farnet, C. M. & Haseltine, W. A. (1991). Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *Journal of Virology* **65**(4), 1910-5.
- Fassler, J. S. & Gussin, G. N. (1996). Promoters and basal transcription machinery in eubacteria and eukaryotes: concepts, definitions, and analogies. *Methods in enzymology* **273**, 3-29.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* **132**(1), 6-13.
- Felzien, L. K., Woffendin, C., Hottinger, M. O., Subbramanian, R., Cohen, E. A. & Nabel, G. J. (1998). HIV transcriptional activation by the accessory protein, Vpr, is mediated by the p-300 co-activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 5281-5286.
- Fields, B. N. & Knipe, D. M. (1990). Retroviridae. In *Fields Virology* (Fields, B. N. & Knipe, D. M., eds.), Vol. 2, pp. 1435-1589. 2 vols. Raven Press, New-York.
- Fields, S. & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**(6230), 245-6.
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W. & Luhrmann, R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* **82**(3), 475-83.

Fletcher, T. M., Brichacek, B., Sharova, N., McPherson, S., Stivathis, G. L., Sharp, P., Emerman, M., Hahn, B. H. & Stevenson, M. (1996a). Segregation of nuclear import and cell cycle arrest function of HIV-1 vpr between Vpx and Vpr proteins of SIV. *EMBO J.* **15**, 6155-6165.

Fletcher, T. M. r., Brichacek, B., Sharova, N., Newman, M. A., Stivahtis, G., Sharp, P. M., Emerman, M., Hahn, B. H. & Stevenson, M. (1996b). Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV(SM). *EMBO Journal* **15**(22), 6155-65.

Folks, T. M., Clouse, K. A., Justement, J., Rabson, A., Duh, E., Kehrl, J. H. & Fauci, A. S. (1989). Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**(7), 2365-8.

Fort, P., Marty, L., Piechaczyk, M., el Sabrouy, S., Dani, C., Jeanteur, P. & Blanchard, J. M. (1985). Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Research* **13**(5), 1431-42.

Freed, E. O., Englund, G., Maldarelli, F. & Martin, M. A. (1997). Phosphorylation of residue 131 of HIV-1 matrix is not required for macrophage infection. *Cell* **88**(2), 171-3; discussion 173-4.

Freed, E. O., Englund, G. & Martin, M. A. (1995). Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *Journal of Virology* **69**(6), 3949-54.

Gaines, H., von Sydow, M., Parry, J. V., Forsgren, M., Pehrson, P. O., Sonnerborg, A., Mortimer, P. P. & Strannegard, O. (1988). Detection of immunoglobulin M antibody in primary human immunodeficiency virus infection. *Aids* **2**(1), 11-5.

Gallaher, W. R. (1987). Detection of a fusion peptide sequence in the transmembrane protein of human immunodeficiency virus. *Cell* **50**(3), 327-8.

Gallay, P., Hope, T., Chin, D. & Trono, D. (1997). HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(18), 9825-30.

Gallay, P., Stitt, V., Mundy, C., Oettinger, M. & Trono, D. (1996). Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *Journal of Virology* **70**(2), 1027-32.

Gallay, P., Swingler, S., Aiken, C. & Trono, D. (1995). HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* **80**(3), 379-88.

Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B. & *et al.* (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**(4648), 500-3.

Garnier, J., Osguthorpe, D. J. & Robson, B. (1978a). Analysis of the accuracy and implications of simple method for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.*, 97-120.

Garrett, E. D., Tiley, L. S. & Cullen, B. R. (1991). Rev activates expression of the human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr gene products. *Journal of Virology* **65**(3), 1653-7.

Gartel, A. L., Serfas, M. S. & Tyner, A. L. (1996). p21--negative regulator of the cell cycle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* **213**(2), 138-49.

Gaynor, R. (1992). Cellular Transcription Factors Involved in The Regulation of HIV-1 Gene Expression. *AIDS.*, 347-363.

Gaynor, R. B. (1995). Regulation of HIV-1 gene expression by the transactivator protein Tat. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **193**, 51-77.

Geleziunas, R., Bour, S. & Wainberg, M. A. (1994). Human immunodeficiency virus type 1-associated CD4 downmodulation. *Advances in Virus Research* **44**, 203-66.

Ghosh, D. (1992). Glucocorticoid receptor-binding site in the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *Journal of Virology* **66**(1), 586-90.

Gibbs, J. S., Lackner, A. A., Lang, S. M., Simon, M. A., Sehgal, P. K., Daniel, M. D. & Desrosiers, R. C. (1995). Progression to AIDS in the absence of a gene for vpr or vpx. *Journal of Virology* **69**(4), 2378-83.

Goh, W. C., Rogel, M. E., Kinsey, M., Michael, S. F., Fultz, P. N., Nowak, M. A., Hahn, B. & Emerman, M. (1998). HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr *in vivo*. *Nature Medicine* **4**, 65-71.

Goldfarb, D. S. (1997). Whose finger is on the switch? [comment]. *Science* **276**(5320), 1814-6.

Gonzalez-Scarano, F., Waxham, M. N., Ross, A. M. & Hoxie, J. A. (1987). Sequence similarities between human immunodeficiency virus gp41 and paramyxovirus fusion proteins. *AIDS Research & Human Retroviruses* **3**(3), 245-52.

Gorman, C. M., Moffat, L. F. & Howard, B. H. (1982). Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Molecular & Cellular Biology* **2**(9), 1044-51.

Gossen, M. & Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(12), 5547-51.

Gottlinger, H. G., Dorfman, T., Cohen, E. A. & Haseltine, W. A. (1993). Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(15), 7381-5.

- Gowda, S. D., Stein, B. S., Mohaghehpour, N., Benike, C. J. & Engleman, E. G. (1989). Evidence that T cell activation is required for HIV-1 entry in CD4+ lymphocytes. *Journal of Immunology* **142**(3), 773-80.
- Gras-Masse, H., Ameisen, J. C., Boutillon, C., Gesquiere, J. C., Vian, S., Neyrinck, J. L., Drobecq, H., Capron, A. & Tartar, A. (1990). A synthetic protein corresponding to the entire vpr gene product from the human immunodeficiency virus HIV-1 is recognized by antibodies from HIV-infected patients. *International Journal of Peptide & Protein Research* **36**(3), 219-26.
- Greenberg, A. H. & Litchfield, D. W. (1995). Granzymes and apoptosis: targeting the cell cycle. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **198**, 95-119.
- Gu, J., Emerman, M. & Sandmeyer, S. (1997). Small heat shock protein suppression of Vpr-induced cytoskeletal defects in budding yeast. *Molecular & Cellular Biology* **17**(7), 4033-42.
- Gu, W., Schneider, J. W., Condorelli, G., Kaushal, S., Mahdavi, V. & Nadal-Ginard, B. (1993a). Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell* **72**(3), 309-24.
- Gu, Y., Turck, C. W. & Morgan, D. O. (1993b). Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* **366**(6456), 707-10.
- Guatelli, J. C. (1997). The positive influence of Nef on viral infectivity. *Research in Virology* **148**(1), 34-7.
- Halevy, O., Novitch, B. G., Spicer, D. B., Skapek, S. X., Rhee, J., Hannon, G. J., Beach, D. & Lassar, A. B. (1995). Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD [see comments]. *Science* **267**(5200), 1018-21.
- Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H. D. & Garten, W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**(6402), 358-61.

Handeli, S. & Weintraub, H. (1992). The ts41 mutation in Chinese hamster cells leads to successive S phases in the absence of intervening G2, M, and G1. *Cell* **71**(4), 599-611.

Harouse, J. M., Bhat, S., Spitalnik, S. L., Laughlin, M., Stefano, K., Silberberg, D. H. & Gonzalez-Scarano, F. (1991). Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* **253**(5017), 320-3.

Harouse, J. M., Kunsch, C., Hartle, H. T., Laughlin, M. A., Hoxie, J. A., Wigdahl, B. & Gonzalez-Scarano, F. (1989). CD4-independent infection of human neural cells by human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* **63**(6), 2527-33.

Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**(4), 805-16.

Harrich, D., Garcia, J., Wu, F., Mitsuyasu, R., Gonzalez, J. & Gaynor, R. (1989). Role of SP1-binding domains in in vivo transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *Journal of Virology* **63**(6), 2585-91.

Hartl, P., Gottesfeld, J. & Forbes, D. J. (1993). Mitotic repression of transcription in vitro. *Journal of Cellular Biology* **120**, 613-624.

Haseltine, W. A. (1991). Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB Journal* **5**(10), 2349-60.

Hattori, N., Michaels, F., Fagnoli, K., Marcon, L., Gallo, R. C. & Franchini, G. (1990). The human immunodeficiency virus type 2 vpr gene is essential for productive infection of human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(20), 8080-4.

Hayles, J., Fisher, D., Woollard, A. & Nurse, P. (1994). Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2-mitotic B cyclin complex. *Cell* **78**(5), 813-22.

He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D. O. & Landau, N. R. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *Journal of Virology* **69**(11), 6705-11.

Heichman, K. A. & Roberts, J. M. (1994). Rules to replicate by [see comments]. *Cell* **79**(4), 557-62.

Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M. A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M. & Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(15), 7311-5.

Herrman, C. H. & Mathews, M. B. (1989). The Adenovirus E1B 19-Kilodalton Protein Stimulates Gene Expression by Increasing DNA Levels. *Mol. Cell. Biol.* **9**(12), 5412-5423.

Herwig, S. & Strauss, M. (1997). The retinoblastoma protein: a master regulator of cell cycle, differentiation and apoptosis. *European Journal of Biochemistry* **246**(3), 581-601.

Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M. & Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection [see comments]. *Nature* **373**(6510), 123-6.

Hoch, J., Lang, S. M., Weeger, M., Stahl-Hennig, C., Coulibaly, C., Dittmer, U., Hunsmann, G., Fuchs, D., Muller, J., Sopper, S. & *et al.* (1995). vpr deletion mutant of simian immunodeficiency virus induces AIDS in rhesus monkeys. *Journal of Virology* **69**(8), 4807-13.

- Hoglund, S., Ohagen, A., Lawrence, K. & Gabuzda, D. (1994). Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* **201**(2), 349-55.
- Horak, I. D., Popovic, M., Horak, E. M., Lucas, P. J., Gress, R. E., June, C. H. & Bolen, J. B. (1990). No T-cell tyrosine protein kinase signalling or calcium mobilization after CD4 association with HIV-1 or HIV-1 gp120. *Nature* **348**(6301), 557-60.
- Horton, R., Spearman, P. & Ratner, L. (1994). HIV-2 viral protein X association with the GAG p27 capsid protein. *Virology* **199**(2), 453-7.
- Housset, C., Lamas, E., Courgnaud, V., Boucher, O., Girard, P. M., Marche, C. & Brechot, C. (1993). Presence of HIV-1 in human parenchymal and non-parenchymal liver cells in vivo. *Journal of Hepatology* **19**(2), 252-8.
- Hurt, E. C. (1996). Importins/karyopherins meet nucleoporins. *Cell* **84**(4), 509-15.
- Igarashi, T., Ami, Y., Yamamoto, H., Shibata, R., Kuwata, T., Mukai, R., Shinohara, K., Komatsu, T., Adachi, A. & Hayami, M. (1997). Protection of monkeys vaccinated with vpr- and/or nef-defective simian immunodeficiency virus strain mac/human immunodeficiency virus type 1 chimeric viruses: a potential candidate live-attenuated human AIDS vaccine. *Journal of General Virology* **78**(Pt 5), 985-9.
- Jabbar, M. A. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: roles in virus release and CD4 downregulation. *Current Topics in Microbiology & Immunology* 107-20.
- Jowett, J. B., Planelles, V., Poon, B., Shah, N. P., Chen, M. L. & Chen, I. S. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *Journal of Virology* **69**(10), 6304-13.
- Kamine, J. & Chinnadurai, G. (1992). Synergistic activation of the human immunodeficiency virus type 1 promoter by the viral Tat protein and cellular transcription factor Sp1. *Journal of Virology* **66**(6), 3932-6.

Kamine, J., Subramanian, T. & Chinnadurai, G. (1991). Sp1-dependent activation of a synthetic promoter by human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(19), 8510-4.

Karczewski, M. K. & Strebel, K. (1996). Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *Journal of Virology* **70**(1), 494-507.

Kaufman, J. D., Valandra, G., Roderiquez, G., Bushar, G., Giri, C. & Norcross, M. A. (1987). Phorbol ester enhances human immunodeficiency virus-promoted gene expression and acts on a repeated 10-base-pair functional enhancer element. *Molecular & Cellular Biology* **7**(10), 3759-66.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26**(4), 239-57.

Kewalramani, V. N., Park, C. S., Gallombardo, P. A. & Emerman, M. (1996). Protein stability influences human immunodeficiency virus type 2 Vpr virion incorporation and cell cycle effect. *Virology* **218**(2), 326-34.

Kimpton, J. & Emerman, M. (1992). Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *Journal of Virology* **66**(4), 2232-9.

Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M. D., Martin, M. A. & Orenstein, J. M. (1990). The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *Journal of Virology* **64**(2), 621-9.

Kobayashi, N., Hamamoto, Y., Yamamoto, N., Ishii, A., Yonehara, M. & Yonehara, S. (1990). Anti-Fas monoclonal antibody is cytotoxic to human immunodeficiency virus-infected cells without augmenting viral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(24), 9620-4.

Koenig, S., Gendelman, H. E., Orenstein, J. M., Dal Canto, M. C., Pezeshkpour, G. H., Yungbluth, M., Janotta, F., Aksamit, A., Martin, M. A. & Fauci, A. S. (1986). Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. *Science* **233**(4768), 1089-93.

Kolesnitchenko, V. & Snart, R. S. (1992). Regulatory elements in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat LTR (HIV-1) responsive to steroid hormone stimulation [see comments]. *AIDS Research & Human Retroviruses* **8**(12), 1977-80.

Kollmann, T. R., Pettoello-Mantovani, M., Zhuang, X., Kim, A., Hachamovitch, M., Smarnworawong, P., Rubinstein, A. & Goldstein, H. (1994). Disseminated human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) infection in SCID-hu mice after peripheral inoculation with HIV-1. *Journal of Experimental Medicine* **179**(2), 513-22.

Kondo, E. & Gottlinger, H. G. (1996). A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *Journal of Virology* **70**(1), 159-64.

Kondo, E., Mammano, F., Cohen, E. A. & Gottlinger, H. G. (1995). The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *Journal of Virology* **69**(5), 2759-64.

Kornfeld, H., Cruikshank, W. W., Pyle, S. W., Berman, J. S. & Center, D. M. (1988). Lymphocyte activation by HIV-1 envelope glycoprotein. *Nature* **335**(6189), 445-8.

Lai, S., Page, J. B. & Lai, H. (1995). HIV results in the frame. Paradox remains [letter]. *Nature* **375**(6528), 196-7; discussion 198.

Lang, S. M., Weeger, M., Stahl-Hennig, C., Coulibaly, C., Hunsmann, G., Muller, J., Muller-Hermelink, H., Fuchs, D., Wachter, H., Daniel, M. M. & *et al.* (1993). Importance of vpr for infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *Journal of Virology* **67**(2), 902-12.

Larder, B. A., Darby, G. & Richman, D. D. (1989). HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. *Science* **243**(4899), 1731-4.

Lassar, A. B., Buskin, J. N., Lockshon, D., Davis, R. L., Apone, S., Hauschka, S. D. & Weintraub, H. (1989). MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* **58**(5), 823-31.

Lassar, A. B., Davis, R. L., Wright, W. E., Kadesch, T., Murre, C., Voronova, A., Baltimore, D. & Weintraub, H. (1991). Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* **66**(2), 305-15.

Lavallee, C. & Cohen, E. A. (1993). HIV-1 HxBc2 strain encodes a truncated vpr gene product of 78 amino acids [letter]. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **6**(5), 529-30.

Lavallee, C., Yao, X. J., Ladha, A., Gottlinger, H., Haseltine, W. A. & Cohen, E. A. (1994). Requirement of the Pr55gag precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. *Journal of Virology* **68**(3), 1926-34.

Leonard, J., Parrott, C., Buckler-White, A. J., Turner, W., Ross, E. K., Martin, M. A. & Rabson, A. B. (1989). The NF-kappa B binding sites in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat are not required for virus infectivity. *Journal of Virology* **63**(11), 4919-24.

Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**(3), 323-31.

Levy, D. N., Fernandes, L. S., Williams, W. V. & Weiner, D. B. (1993). Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus 1 vpr. *Cell* **72**(4), 541-50.

Levy, D. N., Refaeli, Y., MacGregor, R. R. & Weiner, D. B. (1994). Serum Vpr regulates productive infection and latency of human immunodeficiency virus type 1.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**(23), 10873-7.

Levy, D. N., Refaeli, Y. & Weiner, D. B. (1995). Extracellular Vpr protein increases cellular permissiveness to human immunodeficiency virus replication and reactivates virus from latency. *Journal of Virology* **69**(2), 1243-52.

Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M. & Oshiro, L. S. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**(4664), 840-2.

Lewis, P., Hensel, M. & Emerman, M. (1992). Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle [published erratum appears in *EMBO J* 1992 Nov;11(11):4249]. *EMBO Journal* **11**(8), 3053-8.

Lewis, P. F. & Emerman, M. (1994). Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *Journal of Virology* **68**(1), 510-6.

Li, C. J., Friedman, D. J., Wang, C., Metelev, V. & Pardee, A. B. (1995). Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* **268**(5209), 429-31.

Li, M. S., Garcia-Asua, G., Bhattacharyya, U., Mascagni, P., Austen, B. M. & Roberts, M. M. (1996). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 binds to nucleocapsid protein p7 in vitro. *Biochemical & Biophysical Research Communications* **218**(1), 352-5.

Lifson, J. D., Feinberg, M. B., Reyes, G. R., Rabin, L., Banapour, B., Chakrabarti, S., Moss, B., Wong-Staal, F., Steimer, K. S. & Engleman, E. G. (1986a). Induction of CD4-dependent cell fusion by the HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* **323**(6090), 725-8.

Lifson, J. D., Reyes, G. R., McGrath, M. S., Stein, B. S. & Engleman, E. G. (1986b). AIDS retrovirus induced cytopathology: giant cell formation and involvement of CD4 antigen. *Science* **232**(4754), 1123-7.

Lim Tung, H. Y., De Rocquigny, H., Zhao, L.-J., Cayla, X., Roques, B. P. & Ozon, R. (1997). Direct activation of protein phosphatase-2A0 by HIV-1 encoded protein complex NCp7:vpr. *FEBS Letters* **401**, 197-201.

Lodge, R., Lalonde, J. P., Lemay, G. & Cohen, E. A. (1997). The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO Journal* **16**(4), 695-705.

Lopata, M. A., Cleveland, D. W. & Sollner-Webb, B. (1984). High level transient expression of a chloramphenicol acetyl transferase gene by DEAE-dextran mediated DNA transfection coupled with a dimethyl sulfoxide or glycerol shock treatment. *Nucleic Acids Research* **12**(14), 5707-17.

Lori, F., di Marzo Veronese, F., de Vico, A. L., Lusso, P., Reitz, M. S., Jr. & Gallo, R. C. (1992). Viral DNA carried by human immunodeficiency virus type 1 virions. *Journal of Virology* **66**(8), 5067-74.

Lu, Y. L., Bennett, R. P., Wills, J. W., Gorelick, R. & Ratner, L. (1995). A leucine triplet repeat sequence (LXX)₄ in p6gag is important for Vpr incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles. *Journal of Virology* **69**(11), 6873-9.

Lu, Y. L., Spearman, P. & Ratner, L. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *Journal of Virology* **67**(11), 6542-50.

Luo, T. & Garcia, J. V. (1997). Regulation of Nef function. *Research in Virology* **148**(1), 64-8.

Macreadie, I. G., Arunagiri, C. K., Hewish, D. R., White, J. F. & Azad, A. A. (1996). Extracellular addition of a domain of HIV-1 Vpr containing the amino acid sequence

motif H(S/F)RIG causes cell membrane permeabilization and death. *Molecular Microbiology* **19**(6), 1185-92.

Macreadie, I. G., Castelli, L. A., Hewish, D. R., Kirkpatrick, A., Ward, A. C. & Azad, A. A. (1995). A domain of human immunodeficiency virus type 1 Vpr containing repeated H(S/F)RIG amino acid motifs causes cell growth arrest and structural defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(7), 2770-4.

Macreadie, I. G., Thorburn, D. R., Kirby, D. M., Castelli, L. A., de Rozario, N. L. & Azad, A. A. (1997). HIV-1 protein Vpr causes gross mitochondrial dysfunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **410**(2-3), 145-9.

Mahalingam, S., Ayyavoo, V., Patel, M., Kieber-Emmons, T. & Weiner, D. B. (1997a). Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *Journal of Virology* **71**(9), 6339-47.

Mahalingam, S., MacDonald, B., Ugen, K. E., Ayyavoo, V., Agadjanyan, M. G., Williams, W. V. & Weiner, D. B. (1997b). In vitro and in vivo tumor growth suppression by HIV-1 Vpr. *DNA & Cell Biology* **16**(2), 137-43.

Mahalingam, S., Collman, R. G., Patel, M., Monken, C. E. & Srinivasan, A. (1995a). Functional analysis of HIV-1 Vpr: identification of determinants essential for subcellular localization. *Virology* **212**(2), 331-9.

Mahalingam, S., Collman, R. G., Patel, M., Monken, C. E. & Srinivasan, A. (1995b). Role of the conserved dipeptide Gly75 and Cys76 on HIV-1 Vpr function. *Virology* **210**(2), 495-500.

Mahalingam, S., Khan, S. A., Jabbar, M. A., Monken, C. E., Collman, R. G. & Srinivasan, A. (1995c). Identification of residues in the N-terminal acidic domain of HIV-1 Vpr essential for virion incorporation. *Virology* **207**(1), 297-302.

Mahalingam, S., Khan, S. A., Murali, R., Jabbar, M. A., Monken, C. E., Collman, R. G. & Srinivasan, A. (1995d). Mutagenesis of the putative alpha-helical domain of the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1: effect on stability and virion incorporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(9), 3794-8.

Mahalingam, S., Patel, M., Collman, R. G. & Srinivasan, A. (1995e). The carboxy-terminal domain is essential for stability and not for virion incorporation of HIV-1 Vpr into virus particles. *Virology* **214**(2), 647-52.

Maldarelli, F., Sato, H., Berthold, E., Orenstein, J. & Martin, M. A. (1995). Rapid induction of apoptosis by cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* **69**(10), 6457-65.

Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V. & Cullen, B. R. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**(6212), 254-7.

Mansky, L. M. (1996). The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene. *Virology* **222**(2), 391-400.

Martin, S. J., Matear, P. M. & Vyakarnam, A. (1994). HIV-1 infection of human CD4+ T cells in vitro. Differential induction of apoptosis in these cells. *Journal of Immunology* **152**(1), 330-42.

McCune, J. M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L. D., Lieberman, M. & Weissman, I. L. (1988). The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* **241**(4873), 1632-9.

McDonell, M. W., Simon, M. N. & Studier, F. W. (1977). Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *Journal of Molecular Biology* **110**(1), 119-46.

- Miller, M. D., Wang, B. & Bushman, F. D. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes containing discontinuous plus strands are competent to integrate in vitro. *Journal of Virology* **69**(6), 3938-44.
- Modrow, S., Kattenbeck, B., von Poblitzki, A., Niedrig, M., Wagner, R. & Wolf, H. (1994). The gag proteins of human immunodeficiency virus type 1: mechanisms of virus assembly and possibilities for interference. *Medical Microbiology & Immunology* **183**(4), 177-94.
- Molina, J. M., Scadden, D. T., Sakaguchi, M., Fuller, B., Woon, A. & Groopman, J. E. (1990). Lack of evidence for infection of or effect on growth of hematopoietic progenitor cells after in vivo or in vitro exposure to human immunodeficiency virus. *Blood* **76**(12), 2476-82.
- Moore, J. P. (1997). Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science* **276**(5309), 51-2.
- Morikawa, Y., Barsov, E. & Jones, I. (1993). Legitimate and illegitimate cleavage of human immunodeficiency virus glycoproteins by furin. *Journal of Virology* **67**(6), 3601-4.
- Murray, A. & Hunt, T. (1993). *The cell cycle: an introduction*, W.H. Freeman and company, New-York.
- Murre, C., McCaw, P. S. & Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* **56**(5), 777-83.
- Mustafa, F. & Robinson, H. L. (1993). Context-dependent role of human immunodeficiency virus type 1 auxiliary genes in the establishment of chronic virus producers. *Journal of Virology* **67**(11), 6909-15.
- Myers, L., Rabson, A. B., Josephs, S. F., Smith, T. F. & Wong-Staal, F. (1989). *Human retroviruses and AIDS: a compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences.*, 2, Los Alamos National laboratory.

- Nabel, G. & Baltimore, D. (1987). An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells [published erratum appears in *Nature* 1990 Mar 8;344(6262):178]. *Nature* **326**(6114), 711-3.
- Nagata, S. & Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science* **267**(5203), 1449-56.
- Nakaya, T., Fujinaga, K., Kishi, M., Oka, S., Kurata, T., Jones, I. M. & Ikuta, K. (1994). Nonsense mutations in the vpr gene of HIV-1 during in vitro virus passage and in HIV-1 carrier-derived peripheral blood mononuclear cells. *FEBS Letters* **354**(1), 17-22.
- Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **17**(6), 471-80.
- Nishino, Y., Kishi, M., Sumiya, M., Ogawa, K., Adachi, A., Maotani-Imai, K., Kato, S., Hirai, K. & Ikuta, K. (1991). Human immunodeficiency virus type 1 vif, vpr, and vpu mutants can produce persistently infected cells. *Archives of Virology* **120**(3-4), 181-92.
- Nishino, Y., Nakaya, T., Fujinaga, K., Kishi, M., Azuma, I. & Ikuta, K. (1994). Persistent infection of MT-4 cells by human immunodeficiency virus type 1 becomes increasingly likely with in vitro serial passage of wild-type but not nef mutant virus. *Journal of General Virology* **75**(Pt 9), 2241-51.
- Nurse, P. (1994). Ordering S phase and M phase in the cell cycle [comment]. *Cell* **79**(4), 547-50.
- Ogawa, K., Shibata, R., Kiyomasu, T., Higuchi, I., Kishida, Y., Ishimoto, A. & Adachi, A. (1989). Mutational analysis of the human immunodeficiency virus vpr open reading frame. *Journal of Virology* **63**(9), 4110-4.
- Orenstein, J. M., Fox, C. & Wahl, S. M. (1997). Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science* **276**(5320), 1857-61.

Ozel, M., Pauli, G. & Gelderblom, H. R. (1988). The organization of the envelope projections on the surface of HIV. *Archives of Virology* **100**(3-4), 255-66.

Pang, S., Koyanagi, Y., Miles, S., Wiley, C., Vinters, H. V. & Chen, I. S. (1990). High levels of unintegrated HIV-1 DNA in brain tissue of AIDS dementia patients. *Nature* **343**(6253), 85-9.

Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J. F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C. H., Orenstein, J. M., Kotler, D. P. & Fauci, A. S. (1993). HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease [see comments]. *Nature* **362**(6418), 355-8.

Parrott, C., Seidner, T., Duh, E., Leonard, J., Theodore, T. S., Buckler-White, A., Martin, M. A. & Rabson, A. B. (1991). Variable role of the long terminal repeat Sp1-binding sites in human immunodeficiency virus replication in T lymphocytes. *Journal of Virology* **65**(3), 1414-9.

Pascal, E. & Tjian, R. (1991). Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes & Development* **5**(9), 1646-56.

Paxton, W., Connor, R. I. & Landau, N. R. (1993). Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *Journal of Virology* **67**(12), 7229-37.

Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M. & Ho, D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**(5255), 1582-6.

Perkins, N. D., Edwards, N. L., Duckett, C. S., Agranoff, A. B., Schmid, R. M. & Nabel, G. J. (1993). A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *EMBO Journal* **12**(9), 3551-8.

Piller, S. C., Ewart, G. D., Premkumar, A., Cox, G. B. & Gage, P. W. (1996). Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective channels in

planar lipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(1), 111-5.

Planelles, V., Bachelierie, F., Jowett, J. B., Haislip, A., Xie, Y., Banooni, P., Masuda, T. & Chen, I. S. (1995). Fate of the human immunodeficiency virus type 1 provirus in infected cells: a role for vpr. *Journal of Virology* **69**(9), 5883-9.

Planelles, V., Jowett, J. B., Li, Q. X., Xie, Y., Hahn, B. & Chen, I. S. (1996). Vpr-induced cell cycle arrest is conserved among primate lentiviruses. *Journal of Virology* **70**(4), 2516-24.

Poon, B., Jowett, J. B., S.A., S., Armstrong, R. W., Rishton, G. M. & Chen, I. S. (1997). Human Immunodeficiency Virus Type 1 vpr Gene Induces Phenotypic Effects Similar to Those of the DNA Alkylating Agent, Nitrogen Mustard. *J. Virol* **71**, 3961-3971.

Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E. & Gallo, R. C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**(4648), 497-500.

Price, R. W., Brew, B., Sidtis, J., Rosenblum, M., Scheck, A. C. & Cleary, P. (1988). The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science* **239**(4840), 586-92.

Purvis, S. F., Jacobberger, J. W., Sramkoski, R. M., Patki, A. H. & Lederman, M. M. (1995). HIV type 1 Tat protein induces apoptosis and death in Jurkat cells. *AIDS Research & Human Retroviruses* **11**(4), 443-50.

Ratner, L. & Niederman, T. M. (1995). Nef. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **193**, 169-208.

Re, F., Braaten, D., Franke, E. K. & Luban, J. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *Journal of Virology* **69**(11), 6859-64.

- Refaeli, Y., Levy, D. N. & Weiner, D. B. (1995). The glucocorticoid receptor type II complex is a target of the HIV-1 vpr gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(8), 3621-5.
- Rich, E. A., Chen, I. S., Zack, J. A., Leonard, M. L. & O'Brien, W. A. (1992). Increased susceptibility of differentiated mononuclear phagocytes to productive infection with human immunodeficiency virus-1 (HIV-1). *Journal of Clinical Investigation* **89**(1), 176-83.
- Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G. & Brown, P. O. (1993). Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO Journal* **12**(5), 2099-108.
- Rogel, M. E., Wu, L. I. & Emerman, M. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *Journal of Virology* **69**(2), 882-8.
- Rosen, C., Sodroski, J. & Haseltine, W. (1985). The Location of Cis-Acting Regulatory Sequences in the Human T Cell Lymphotropic Virus Type III (HTLV-III/LAV) Long Terminal Repeat. , 813-823.
- Ross, E. K., Buckler-White, A. J., Rabson, A. B., Englund, G. & Martin, M. A. (1991). Contribution of NF-kappa B and Sp1 binding motifs to the replicative capacity of human immunodeficiency virus type 1: distinct patterns of viral growth are determined by T-cell types. *Journal of Virology* **65**(8), 4350-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edit (Ford, N. & C., N., Eds.). 3 vols, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., Coulson, A. R., Barrell, B. G., Smith, A. J. & Roe, B. A. (1980). Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *Journal of Molecular Biology* **143**(2), 161-78.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**(12), 5463-7.

Sarngadharan, M. G., Popovic, M., Bruch, L., Schupbach, J. & Gallo, R. C. (1984). Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* **224**(4648), 506-8.

Sato, A., Igarashi, H., Adachi, A. & Hayami, M. (1990). Identification and localization of vpr gene product of human immunodeficiency virus type 1. *Virus Genes* **4**(4), 303-12.

Sattentau, Q. J. & Moore, J. P. (1991). Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *Journal of Experimental Medicine* **174**(2), 407-15.

Schuitemaker, H., Koot, M., Kootstra, N. A., Dercksen, M. W., de Goede, R. E., van Steenwijk, R. P., Lange, J. M., Schattenkerk, J. K., Miedema, F. & Tersmette, M. (1992a). Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytopathic to T-cell-tropic virus population. *Journal of Virology* **66**(3), 1354-60.

Schuitemaker, H., Kootstra, N. A., de Goede, R. E., de Wolf, F., Miedema, F. & Tersmette, M. (1991). Monocytopathic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture. *Journal of Virology* **65**(1), 356-63.

Schuitemaker, H., Kootstra, N. A., Fouchier, R. A., Hooibrink, B. & Miedema, F. (1994). Productive HIV-1 infection of macrophages restricted to the cell fraction with proliferative capacity. *EMBO Journal* **13**(24), 5929-36.

Schuitemaker, H., Kootstra, N. A., Koppelman, M. H., Bruisten, S. M., Huisman, H. G., Tersmette, M. & Miedema, F. (1992b). Proliferation-dependent HIV-1 infection

of monocytes occurs during differentiation into macrophages. *Journal of Clinical Investigation* **89**(4), 1154-60.

Schupbach, J., Popovic, M., Gilden, R. V., Gonda, M. A., Sarngadharan, M. G. & Gallo, R. C. (1984). Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science* **224**(4648), 503-5.

Schwartz, S., Felber, B. K. & Pavlakis, G. N. (1991). Expression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 vif and vpr mRNAs is Rev-dependent and Regulated by Splicing. *Virology* **183**, 677-686.

Selig, L., Benichou, S., Rogel, M. E., Wu, L. I., Vodicka, M. A., Sire, J., Benarous, R. & Emerman, M. (1997). Uracil DNA glycosylase specifically interacts with Vpr of both human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus of sooty mangabeys, but binding does not correlate with cell cycle arrest. *Journal of Virology* **71**(6), 4842-6.

Sharp, P. M., Bailes, E., Stevenson, M., Emerman, M. & Hahn, B. H. (1996). Gene acquisition in HIV and SIV [letter]. *Nature* **383**(6601), 586-7.

Sherr, C. J. (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**(6), 1059-65.

Sherr, C. J. (1994). G1 phase progression: cycling on cue [see comments]. *Cell* **79**(4), 551-5.

Siebenlist, U., Franzoso, G. & Brown, K. (1994). Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annual Review of Cell Biology* **10**, 405-55.

Skapek, S. X., Rhee, J., Spicer, D. B. & Lassar, A. B. (1995). Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase [see comments]. *Science* **267**(5200), 1022-4.

Sodroski, J., Patarca, R., Rosen, C., Wong-Staal, F. & Haseltine, W. (1985). Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* **229**(4708), 74-7.

Sonza, S., Kiernan, R. E., Maerz, A. L., Deacon, N. J., McPhee, D. A. & Crowe, S. M. (1994). Accumulation of unintegrated circular viral DNA in monocytes and growth-arrested T cells following infection with HIV-1. *Journal of Leukocyte Biology* **56**(3), 289-93.

Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**(3), 503-17.

Stanley, S. K., Kessler, S. W., Justement, J. S., Schnittman, S. M., Greenhouse, J. J., Brown, C. C., Musongela, L., Musey, K., Kapita, B. & Fauci, A. S. (1992). CD34+ bone marrow cells are infected with HIV in a subset of seropositive individuals. *Journal of Immunology* **149**(2), 689-97.

Stanley, S. K., McCune, J. M., Kaneshima, H., Justement, J. S., Sullivan, M., Boone, E., Baseler, M., Adelsberger, J., Bonyhadi, M., Orenstein, J. & *et al.* (1993). Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse. *Journal of Experimental Medicine* **178**(4), 1151-63.

Stein, B. S., Gowda, S. D., Lifson, J. D., Penhallow, R. C., Bensch, K. G. & Engleman, E. G. (1987). pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* **49**(5), 659-68.

Stevenson, M., Stanwick, T. L., Dempsey, M. P. & Lamonica, C. A. (1990). HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO Journal* **9**(5), 1551-60.

Stewart, S. A., Poon, B., Jowett, J. B. & Chen, I. S. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest. *Journal of Virology* **71**(7), 5579-92.

Stivahtis, G. L., Soares, M. A., Vodicka, M. A., Hahn, B. H. & Emerman, M. (1997). Conservation and host specificity of Vpr-mediated cell cycle arrest suggest a

fundamental role in primate lentivirus evolution and biology. *Journal of Virology* **71**(6), 4331-8.

Stutz, F., Neville, M. & Rosbash, M. (1995). Identification of a novel nuclear pore-associated protein as a functional target of the HIV-1 Rev protein in yeast. *Cell* **82**(3), 495-506.

Subbramanian, R., Kessous-Elbaz, A., Lodge, R., Forget, J. & Cohen, E. A. (1998a). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages. *Journal of Experimental Medicine* **187**, 1103-1111.

Subbramanian, R., Yao, X.-J., Dilhuydy, H., Rougeau, N., Bergeron, D., Robitaille, Y. & Cohen, E. A. (1998b). Human Immunodeficiency virus type 1 Vpr localization: nuclear transport of a viral protein modulated by a putative amphipathic helical structure and its relevance to biological activity. *Journal of Molecular Biology* **278**, 13-30.

Subbramanian, R. & Cohen, E. A. (1994). Molecular biology of HIV accessory genes. *Journal of Virology* **68**, 6831-6835.

Tan, X., Pearce-Pratt, R. & Phillips, D. M. (1993). Productive infection of a cervical epithelial cell line with human immunodeficiency virus: implications for sexual transmission. *Journal of Virology* **67**(11), 6447-52.

Tang, S., Poulin, L. & Levy, J. A. (1992). Lack of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication and accumulation of viral DNA in HIV-1-infected T cells blocked in cell replication. *Journal of General Virology* **73**(Pt 4), 933-9.

Tapscott, S. J., Davis, R. L., Thayer, M. J., Cheng, P. F., Weintraub, H. & Lassar, A. B. (1988). MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science* **242**(4877), 405-11.

Tersmette, M., Lange, J. M., de Goede, R. E., de Wolf, F., Eeftink-Schattenkerk, J. K., Schellekens, P. T., Coutinho, R. A., Huisman, J. G., Goudsmit, J. & Miedema, F.

(1989). Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* **1**(8645), 983-5.

Thanos, D. & Maniatis, T. (1995). NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* **80**(4), 529-32.

Tong-Starksen, S. E., Luciw, P. A. & Peterlin, B. M. (1987). Human immunodeficiency virus long terminal repeat responds to T-cell activation signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**(19), 6845-9.

Treco, D. (1989). Preparation of genomic DNA. In *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, pp. 292-299. John Wiley, Brooklin, N.Y.

Tristem, M., Marshall, C., Karpas, A. & Hill, F. (1992). Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr. *EMBO Journal* **11**(9), 3405-12.

Tristem, M., Marshall, C., Karpas, A., Petrik, J. & Hill, F. (1990). Origin of vpx in lentiviruses [letter]. *Nature* **347**(6291), 341-2.

Trono, D. (1992). Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses. *Journal of Virology* **66**(8), 4893-900.

Trono, D. (1995). HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. *Cell* **82**(2), 189-92.

Valentin, A., Von Gegerfelt, A., Matsuda, S., Nilsson, K. & Asjo, B. (1991). In vitro maturation of mononuclear phagocytes and susceptibility to HIV-1 infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **4**(8), 751-9.

Van Antwerp, D. J., Martin, S. J., Kafri, T., Green, D. R. & Verma, I. M. (1996). Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB [see comments]. *Science* **274**(5288), 787-9.

Volsky, D. J., Potash, M. J., Simm, M., Sova, P., Ma, X. Y., Chao, W. & Shahabuddin, M. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 vif gene: the road from an accessory to an essential role in human immunodeficiency virus type 1 replication. *Current Topics in Microbiology & Immunology* **193**, 157-68.

von Schwedler, U., Kornbluth, R. S. & Trono, D. (1994). The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**(15), 6992-6.

von Schwedler, U., Song, J., Aiken, C. & Trono, D. (1993). Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *Journal of Virology* **67**(8), 4945-55.

Voronova, A. & Baltimore, D. (1990). Mutations that disrupt DNA binding and dimer formation in the E47 helix-loop-helix protein map to distinct domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(12), 4722-6.

Wang, J. J., Lu, Y. & Ratner, L. (1994). Particle assembly and Vpr expression in human immunodeficiency virus type 1-infected cells demonstrated by immunoelectron microscopy. *Journal of General Virology* **75**(Pt 10), 2607-14.

Wang, L., Mukherjee, S., Jia, F., Narayan, O. & Zhao, L. J. (1995). Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. *Journal of Biological Chemistry* **270**(43), 25564-9.

Wang, L., Mukherjee, S., Narayan, O. & Zhao, L. J. (1996). Characterization of a leucine-zipper-like domain in Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* **178**(1-2), 7-13.

Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., Bonhoeffer, S., Nowak, M. A., Hahn, B. H. & *et al.* (1995). Viral

dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection [see comments]. *Nature* **373**(6510), 117-22.

Weiss, A., Wiskocil, R. L. & Stobo, J. D. (1984). The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *Journal of Immunology* **133**(1), 123-8.

Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y. & Taylor, S. S. (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**(3), 463-73.

Westervelt, P., Henkel, T., Trowbridge, D. B., Orenstein, J., Heuser, J., Gendelman, H. E. & Ratner, L. (1992). Dual regulation of silent and productive infection in monocytes by distinct human immunodeficiency virus type 1 determinants. *Journal of Virology* **66**(6), 3925-31.

Whiters-Ward, E. S., Jowett, J. B., Stewart, S. A., Xie, Y. M., Garfinkel, A., Shibagaki, Y., Show, S. A., Shah, N., Hanaoka, F., Sawitz, D. G., Armstrong, R. W., Souza, L. M. & Chen, I. S. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with HHR23A, a cellular protein implicated in nucleotide excision repair. *Journal of Virology* **71**, 9732-9742.

Wild, C., Oas, T., McDanal, C., Bolognesi, D. & Matthews, T. (1992). A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**(21), 10537-41.

Wong-Staal, F., Chanda, P. K. & Ghayeb, J. (1987). Human immunodeficiency virus: the eighth gene. *AIDS Research & Human Retroviruses* **3**(1), 33-9.

Wong-Staal, F. & Haseltine, W. A. (1992). Regulatory genes of human immunodeficiency viruses. *Molecular Genetic Medicine* **2**, 189-219.

Wu, F., Garcia, J., Mitsuyasu, R. & Gaynor, R. (1988). Alterations in binding characteristics of the human immunodeficiency virus enhancer factor. *Journal of Virology* **62**(1), 218-25.

Wu, X., Conway, J. A., Kim, J. & Kappes, J. C. (1994). Localization of the Vpx packaging signal within the C terminus of the human immunodeficiency virus type 2 Gag precursor protein. *Journal of Virology* **68**(10), 6161-9.

Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. & Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases [see comments]. *Nature* **366**(6456), 701-4.

Yao, X.-J., Mouland, A. J., Subbramanian, R., Forget, J., Rougeau, N., Bergeron, D. & Cohen, E. A. (1998). Vpr stimulates viral expression and induces cell killing in human immunodeficiency virus type 1 infected dividing Jurkat T cells. *Journal of Virology* **72**, 4712-4720.

Yao, X.-J., Subbramanian, R., Rougeau, N., Boisvert, F., Bergeron, D. & Cohen, E. A. (1995). Mutagenic analysis of HIV-1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure on Vpr nuclear localization and virion incorporation. *Journal of Virology* **69**, 7032-7044.

Yao, X. J., Garzon, S., Boisvert, F., Haseltine, W. A. & Cohen, E. A. (1993). The effect of vpu on HIV-1-induced syncytia formation. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **6**(2), 135-41.

Yao, X. J., Subbramanian, R. A., Rougeau, N., Boisvert, F., Bergeron, D. & Cohen, E. A. (1995). Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *Journal of Virology* **69**(11), 7032-44.

York-Higgins, D., Cheng-Mayer, C., Bauer, D., Levy, J. A. & Dina, D. (1990). Human immunodeficiency virus type 1 cellular host range, replication, and cytopathicity are linked to the envelope region of the viral genome. *Journal of Virology* **64**(8), 4016-20.

- Yu, X. F., Matsuda, M., Essex, M. & Lee, T. H. (1990). Open reading frame vpr of simian immunodeficiency virus encodes a virion-associated protein. *Journal of Virology* **64**(11), 5688-93.
- Yuan, X., Matsuda, Z., Matsuda, M., Essex, M. & Lee, T. H. (1990). Human immunodeficiency virus vpr gene encodes a virion-associated protein. *AIDS Research & Human Retroviruses* **6**(11), 1265-71.
- Zack, J. A., Arrigo, S. J., Weitsman, S. R., Go, A. S., Haislip, A. & Chen, I. S. (1990). HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* **61**(2), 213-22.
- Zapp, M. L. & Green, M. R. (1989). Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* **342**(6250), 714-6.
- Zauli, G., Gibellini, D., Milani, D., Mazzoni, M., Borgatti, P., La Placa, M. & Capitani, S. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein protects lymphoid, epithelial, and neuronal cell lines from death by apoptosis. *Cancer Research* **53**(19), 4481-5.
- Zhang, C., Rasmussen, C. & Chang, L. J. (1997). Cell cycle inhibitory effects of HIV and SIV Vpr and Vpx in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology* **230**(1), 103-12.
- Zhao, L. J., Mukherjee, S. & Narayan, O. (1994a). Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function. Specific interaction with a cellular protein. *Journal of Biological Chemistry* **269**(22), 15577-82.
- Zhao, L. J., Wang, L., Mukherjee, S. & Narayan, O. (1994b). Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function. Oligomerization mediated by the N-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry* **269**(51), 32131-7.
- Zhao, Y., Cao, J., O'Gorman, M. R., Yu, M. & Yogev, R. (1996). Effect of human immunodeficiency virus type 1 protein R (vpr) gene expression on basic cellular

function of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Virology* **70**(9), 5821-6.

Zhu, T., Mo, H., Wang, N., Nam, D. S., Cao, Y., Koup, R. A. & Ho, D. D. (1993). Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* **261**(5125), 1179-81.

Chapitre 8

Annexe

**Human Immunodeficiency Virus type 1 Vpr protein Transactivation Function:
Mechanism and Identification of Domains involved.**

Running title: HIV-1 Vpr transactivation function

Janique Forget, Xiao-Jian Yao, Johanne Mercier and Éric A. Cohen*.

Laboratoire de Rétrovirologie Humaine
Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine
Université de Montréal
Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

*To whom correspondence should be addressed.

Telephone: (514) 343-5967.

Fax: (514) 343-5995.

Electronic mail address: cohenea@ere.umontreal.ca

ABSTRACT

The Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1) Vpr protein is a virion-associated protein that localizes in the nucleus of infected cells. Vpr has been shown to facilitate HIV infection of non-dividing cells such as macrophages by contributing to the nuclear translocation of the pre-integration complex. More recently, Vpr expression has been shown to induce an accumulation of cells at the G2 phase of the cell cycle. We have previously reported that Vpr stimulates reporter gene expression directed from the HIV-1 long terminal repeat (LTR) as well as from heterologous viral promoters. However, the mode of action of Vpr-mediated transactivation remains to be precisely defined. We report here that, for a constant amount of transfected DNA, the level of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) mRNA is increased in Vpr-expressing cells using either HIV-1 or Murine Leukemia Virus (MLV) SL3-3 LTR-CAT reporter construct. Moreover, this Vpr-mediated transactivation requires that promoters direct a minimal level of basal expression. Our mutagenic analysis indicates that the transactivation mediated by Vpr is not dependent on the ability of the protein to localize in the nucleus or to be packaged in the virions. Interestingly, all transactivation-competent Vpr mutants were still able to induce a cell cycle arrest. Conversely, transactivation-defective mutants lost the ability to mediate cell-cycle arrest implying a functional relationship between these two functions. Overall, our results indicate that the G2 cell cycle arrest mediated by Vpr creates a cellular environment where the HIV-1 LTR is transcriptionally more active.

Key words: Vpr / transactivation / transcriptional activation / cell-cycle arrest

INTRODUCTION

Extensive efforts have recently been made to decipher the function and mechanism of action of Human Immunodeficiency Virus (HIV) accessory proteins. Of particular interest is Vpr, a 96 amino acid product which is well conserved among HIV and Simian Immunodeficiency Virus (SIV) subtypes (Tristem *et al.*, 1990). This protein is expressed from a singly spliced mRNA whose expression is dependent on Rev (Schwartz *et al.*, 1991). The role of Vpr in the HIV-1 infection cycle is not clear, although an array of associated-phenotypes have been identified over the years (Subbramanian & Cohen, 1994; Trono, 1995; Emerman, 1996). An important property of Vpr is its ability to be incorporated into viral particles (Cohen *et al.*, 1990a) suggesting a role in the early steps of infection. Vpr has been shown to increase viral production. This effect was first observed in transformed T cells (Cohen *et al.*, 1990b) but is more pronounced in non-dividing cells such as macrophages (Westervelt *et al.*, 1992; Connor *et al.*, 1995; Subbramanian *et al.*, 1998a). In non-dividing cells, Vpr appears to be involved in the nuclear translocation of the pre-integration complex (Heinzinger *et al.*, 1994) but seems also to influence post-integration events (Connor *et al.*, 1995; Subbramanian *et al.*, 1998b).

A recently identified biological activity associated with Vpr is its ability to prevent the passage of cells through mitosis at the G2 stage of the cell cycle (Rogel *et al.*, 1995; Jowett *et al.*, 1995). Indeed, Vpr expression results in the inactivation of the cyclin dependent kinase p34cdc2 and of its upstream regulator cdc25 (He *et al.*, 1995; Re *et al.*, 1995). The exact target of Vpr in the regulation of the cell cycle *in vivo* is not known. The cell cycle arrest phenomenon has also been observed in various yeast strains and prokaryotic cells thus, indicating that the pathway targeted by Vpr is conserved among various cell types (Bodéus *et al.*, 1997; Macreadie *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997). In addition, the cell cycle arrest function is well conserved among HIV and SIV Vpr alleles and is relatively species-specific (Fletcher *et al.*, 1996; Planelles *et al.*, 1996; Stivahtis *et al.*, 1997). Eventually, Vpr-induced G2 arrest leads to cell death by apoptosis (Stewart *et al.*, 1997; Subbramanian *et al.*, 1998a; Yao *et al.*, 1998). Progress in elucidating the functional role of Vpr-mediated cell cycle arrest during HIV-1 infection have been made recently. Accumulating evidence indicates that G2 arrest creates a favorable environment for maximizing viral expression and production (Goh *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 1998)

We have previously shown that Vpr is a moderate transactivator of the HIV-1 long terminal repeat (LTR) as well as of other heterologous promoters such as the Murine Leukemia Virus (MLV) SL3-3 long terminal repeat (Cohen *et al.*, 1990b). These studies as well as those of Agostini *et al.*, (1996) have demonstrated that the transactivation ability of Vpr does not depend on specific responsive promoter sequences. Moreover, Vpr was shown to interact with several cellular proteins (Zhao *et al.*, 1994; Refaeli *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995; Agostini *et al.*, 1996; Bouhamdan *et al.*, 1996; Withers-Ward *et al.*, 1997). Studies from Wang *et al.* (1995) have shown *in vitro* an association of Vpr with the promoter bound transcription factor Sp1. This interaction was further supported in *in vitro* transcription assays where Vpr was able to transactivate a minimal LTR containing only the TATA box and Sp1 binding sites. Recent data published by Agostini *et al.* (1996) have also identified TFIIB, a protein which is part of the basal machinery of transcription, as a cellular partner for Vpr *in vitro*. An interaction of Vpr with a 41kDa (RIP-1) protein which associates with the glucocorticoid receptor has also been reported (Refaeli *et al.*, 1995). Taking into account the ability of Vpr to interact with these cellular proteins, transactivation could therefore be the result of interactions with specific transcription factors and/or the basal transcription machinery. In this study, we have investigated the mechanism of Vpr-mediated transactivation. We report here that Vpr stimulates LTR-directed reporter gene expression *in vivo* by increasing mRNA levels. Vpr was found to transactivate promoters only when their basal expression reached a minimal level. Using mutagenic analysis, we provide evidence confirming that Vpr-mediated transactivation of gene expression and cell cycle arrest are functionally related. Moreover, the capacity of Vpr to transactivate does not require the same determinants as those involved in viral incorporation or protein nuclear localization.

RESULTS

Vpr transactivates gene expression by increasing mRNA levels.

Although Vpr increases gene expression, the mechanism by which Vpr mediates this effect *in vivo* has not been clearly determined. We used the ability of Vpr to increase reporter gene expression driven by either the HIV-1 LTR or the heterologous MLV SL3-3 LTR to clarify its mechanism of action. Briefly, Jurkat cells were co-transfected with either a plasmid expressing Vpr from the Bru strain of HIV-1 (SVCMVBruR) or an ATG-minus version of this construct (SVCMVBruRATG-), and a plasmid encoding the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene under the control of either the HIV-1 LTR (IICAT) or the MLV SL3-3 LTR (pSU3CAT). 72 hours post-transfection, proteins were isolated from one third of the cells to measure CAT activity. Total mRNA and total DNA was isolated from the remaining two thirds to quantify CAT mRNA levels by semi-quantitative RT-PCR and levels of CAT plasmid DNA by semi-quantitative PCR.

Data of figure 1A shows the transactivation of the HIV-1 LTR and of the MLV SL3-3 LTR by Vpr. The Vpr-mediated increase in CAT expression driven by the HIV-1 LTR ranges from 3.0 to 7.0 fold whereas the increase measured with the MLV SL3-3 LTR varies from 5.0 to 12.0 fold. To determine whether mRNA levels were affected by Vpr, RT-PCR analysis was performed on CAT and Glyceraldehyde-3 Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) mRNAs as described in materials and methods. In each experiment, the levels of CAT mRNA were normalized with those of the cellular GAPDH mRNA whose levels are known to remain constant. Figure 1B reveals that the level of CAT mRNA is higher in Vpr-transfected cells than in cells transfected with the ATG-minus construct. The increase in CAT mRNA level was approximately 2 fold with the HIV-1 LTR and 4.2 fold with the MLV SL3-3 LTR. From the data of figure 1 A and B we can conclude that the increase in CAT activity mediated by Vpr correlates with a proportional increase at the mRNA level.

Since we observed an increase of CAT mRNA levels in the presence of Vpr, we investigated the possibility that this effect would be the result of an increased stability of plasmid DNA mediated by Vpr. This phenomenon has been described before for the 19kDa product of the E1B gene of adenovirus (Herrman & Mathews, 1989). We performed semi-quantitative PCR on total DNA, using oligonucleotides specific for the SL3-3 promoter and the adrenergic receptor β 2-subtype (β 2-AR) cellular gene. The result of this experiment reveals that the amount of plasmid DNA

in Vpr and ATG-minus transfected cells are comparable with a SL3-3/ β 2-AR ratio of 0.9 for Vpr and 1.3 for the ATG-minus plasmid and rules out the possibility of a stabilization of plasmid DNA mediated by Vpr (Figure 1C).

The level of basal expression from MLV SL3-3 and HIV-1 LTRs determines their responsiveness to Vpr transactivation.

Since it was reported that Vpr interacts with a component of the glucocorticoid receptor pathway (Refaeli *et al.*, 1995), we initially examined the importance of the glucocorticoid response elements of the SL3-3 LTR in Vpr-mediated transactivation. For this purpose, we obtained constructs where the first (AB7), second (AB2) and third (AB3) glucocorticoid response elements (GRE) were disrupted by either introducing *Bgl*III linkers or by increasing their relative distance (AB16 and AB17) (Figure 2A). These mutated promoter - CAT constructs were co-transfected with Vpr or ATG-minus control plasmids in Jurkat cells and their ability to be transactivated was determined by measuring CAT activity 72 hours post-transfection.

In the presence of Vpr, the AB3 and AB17 mutants exhibited a 7.3 and 7.2 fold increase in CAT expression which is comparable to the 7.7 fold increase observed with the wild-type SL3-3 promoter, indicating that GREs were not responsive to the Vpr-mediated transactivation effect (figure 2B). However, we observed that in AB7-, AB2- and AB16-transfected cells, CAT expression was not stimulated by Vpr (Figure 2B). Interestingly, these mutated promoters exhibited a 7 fold decrease in basal CAT activity as compared to their wild type counterpart (Figure 2C), suggesting that Vpr mediated transactivation of gene expression is dependent on the basal activity of the promoter.

In order to determine whether transactivation of the HIV-1 LTR is also influenced by the promoter basal activity, we performed transfection experiments in HeLa cells. The HIV-1 LTR has previously been shown to be a weak promoter in HeLa cells (Rosen *et al.*, 1985). Indeed, Vpr-mediated transactivation of the HIV-1 LTR could not be detected when SVCMVBruR and IICAT plasmids were co-transfected (Figure 2D). However, when the HIV LTR was activated by Tat, a nine fold increase of CAT activity was detected in presence of Vpr (Figure 2D). These results indicate that Vpr-mediated transactivation of the HIV-1 LTR is also dependent on the promoter basal activity.

Structural domains of Vpr involved in transactivation.

Computer analysis of Vpr's structure has revealed the presence of an amphipathic alpha-helical motif from amino acids 17 to 34 in its N-terminal region (Figure 3A). This region is involved in the stability and the incorporation of Vpr into viral particles (Di Marzio *et al.*, 1995; Mahalingam *et al.*, 1995a; Mahalingam *et al.*, 1995b; Yao *et al.*, 1995). The region encompassing amino acids 60 to 81 contains several conserved leucine/isoleucine residues which forms an hydrophobic domain termed the LR-domain (leucine/isoleucine- rich domain). This domain has recently been shown to act as a leucine-zipper (Wang *et al.*, 1996) and is partially included in a second predicted amphipathic alpha-helical motif which includes amino acids 53 to 74 (Mahalingam *et al.*, 1995a; Subbramanian *et al.*, 1998a) (Figure 3A). This region appears to be important for nuclear localization (Zhao *et al.*, 1994; Mahalingam *et al.*, 1997; Subbramanian *et al.*, 1998a) as well as interaction with a 180kDa unidentified cellular protein (RIP) (Zhao *et al.*, 1994) and the Sp1 transcription factor (Wang *et al.*, 1995). Finally, the C-terminal domain (amino acids 77 to 96), which partially overlaps the LR-domain, contains several basic amino acids and is involved in the Vpr cell cycle arrest function (Di Marzio *et al.*, 1995; Macreadie *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 1998) (Figure 3A).

The N-terminal and central alpha-helices as well as the C-terminal region were targeted by site directed mutagenesis in order to define their importance in transactivation (Figure 3A). Mutations were introduced at amino acid residues that were conserved in HIV-1, HIV-2 and SIV Vpr. As summarized in table 1, all mutants have previously been described for their stability, nuclear localization, virion incorporation as well as their ability to impair cell growth (Yao *et al.*, 1995; Subbramanian *et al.*, 1998a; Subbramanian *et al.*, 1998b; Yao *et al.*, 1998). Jurkat cells were co-transfected with either Vpr or mutated Vpr constructs and the IICAT or pSU3CAT reporter plasmids. Cells were collected 72 hours later and CAT activity was measured. Mutant proteins L23F and E25K which have been designed to change the amphipathicity of the N-terminal helix without changing its structure (Yao *et al.*, 1995) transactivate the HIV-1 LTR to similar levels as the wild-type protein with an approximately five fold increase in CAT activity, respectively (Figure 3B, Table 1). In contrast, mutant A30F exhibited a partial transactivation impairment with less than a two fold increase in CAT activity (Figure 3B, Table 1). Mutations that were design to disrupt the central alpha-helix by introduction of a proline residue (R62P) did not affect Vpr transactivation. Similar results were obtained when Val 57 was

substituted for a branched amino acid (V57L,) or when the uncharged glutamine residue at position 65 was mutated for charged glutamic acid amino acid (Q65E) (Figure 3B, Table 1 and data not shown for Q65E). Vpr-mediated transactivation was not substantially affected when hydrophobic isoleucine 63 was substituted for aromatic or polar amino acids (I63F and I63K) to interfere with the amphipaticity of the alpha-helix. In contrast, substitution of leucine 68 and isoleucine 70 in the LR-region for polar amino acids (LI68/70RK) resulted in a significant impairment of Vpr-mediated transactivation ability (Figure 3B and Table 1). The C-terminal domain was targeted by altering the charged arginine 80 (R80A: arginine 80 was replaced by an alanine) . This alteration reduced substantially the transactivation function of the protein since a three fold decrease in CAT activity relative to wild type Vpr was observed (Figure 3B, Table 1).

DISCUSSION

In this study we have investigated the mechanism by which HIV-1 Vpr transactivates homologous as well as heterologous promoter-directed gene expression. Our results provide evidence indicating that Vpr expression increases the levels of mRNA transcribed from the HIV-1 and MLV SL3-3 LTRs in transfected Jurkat T cell line. From our data, we cannot distinguish whether the modulation of mRNA levels mediated by Vpr is the result of an effect at the level of transcription initiation or mRNA stabilization. We have, however, ruled out the possibility that Vpr-mediated transactivation of gene expression occurs by stabilization of transfected plasmid DNA.

The ability of Vpr to transactivate HIV-1 and MLV SL3-3 LTRs appears to be dependent on the promoter basal activity. Vpr is able to transactivate the HIV-1 LTR in Jurkat CD4⁺ T cells but not in HeLa cells which do not support HIV-1 LTR-directed gene expression as efficiently in the absence of Tat (Rosen *et al.*, 1985; Cohen *et al.*, 1990b). Furthermore, the SL3-3 LTR which is a stronger promoter in transformed T cells as compared to the HIV-1 LTR is indeed transactivated more efficiently by Vpr. Finally, mutations that impair the SL3-3 LTR basal activity in T cells, also abrogate Vpr-mediated transactivation. However, there remains the possibility that under conditions of low promoter basal activity, the Vpr transactivation effect is not detectable with the sensitivity of our assays.

Using mutagenic analysis we have investigated the structural domain of Vpr which are involved in transactivation. Our results indicate that the N-terminal alpha-helix is not required for Vpr-mediated transactivation as observed with mutant proteins L23F and E25K. Since the integrity of this N-terminal alpha-helix is important for Vpr virion incorporation (Mahaligham *et al.*, 1995b; Yao *et al.*, 1995), this result suggests that the capacity of Vpr to transactivate gene expression does not require the same determinants as those involved in virion incorporation. Surprisingly, substitution of alanine residue 30 to phenylalanine decreased Vpr-mediated transactivation. However, it is very likely that this effect results from an overall conformational change of the protein induced by this mutation since virion incorporation, nuclear localization and cell cycle arrest were severely affected by this mutation (Table 1). Thus, the absence of biological activity exhibited by this mutant may be more related to structural defects rather than the importance of this amino acid, as observed also by Di Marzio *et al.* (1995). Furthermore, the integrity of the central alpha-helical structure is not required for Vpr-mediated transactivation as

supported by the data obtained with Vpr mutants R62P, V57L, I63F, I63K or Q65E (Table 1). In contrast, mutations interfering with the LR-region (LI68/70)RK or the C-terminal basic amino acids (R80A) greatly impaired Vpr-mediated transactivation (Table 1). At the structural level, these mutations affect the leucine/isoleucine-rich region that presumably constitute a leucine-zipper.

We also have tried to correlate transactivation and nuclear localization by comparing the transactivation activity of the mutants with cellular localization data obtained by scanning confocal microscopy as summarized in table 1 (Subbramanian *et al.*, 1998a). Our results suggest that Vpr-mediated transactivation is not dependent on the ability of the protein to localize inside the nucleus. Indeed, our data reveals that even if Vpr mutants E25K, V57L, R62P, I63F, I63K are not detected in the nucleoplasm, they retain wild-type transactivation ability (Table 1). However, we cannot rule out the possibility that low levels of Vpr mutants, undetectable by our assay, may still reach the nucleoplasm. Conversely, the C-terminal basic region mutants R80A exhibits a cellular distribution comparable to the wild type Vpr (Di Marzio *et al.*, 1995, our unpublished results) but still is not able to transactivate (Table 1). Interestingly, recent studies have reported a distinctiveness between nuclear localization and cell cycle arrest/differentiation functions (Mahalingam *et al.*, 1997; Subbramanian *et al.*, 1998a). Mutants presented here were also characterized for their cell cycle arrest function by FACS analysis of cells infected for 72 hours by pseudotyped HIV viruses harboring the Vesicular Stomatitis Virus G glycoprotein (VSV-G) (Subbramanian *et al.*, 1998a, Yao *et al.*, 1998). Results, described in table 1, indicate that the ability of the protein to transactivate is related to its ability to mediate cell cycle arrest. Our data clearly indicate that mutants such as L23F, E25K, V57L, R62P, I63F, I63K which are able to transactivate are also able to mediate cell cycle arrest (Subbramanian *et al.*, 1998a, Yao *et al.*, 1998). In contrast Vpr mutants R80A and LI68/70RK, which are impaired in their ability to transactivate, lost their ability to mediate cell cycle arrest (Di Marzio *et al.*, 1995, Yao *et al.*, 1998). These results are in agreement with data recently published by Goh *et al.* (1998) and Felzien *et al.* (1998) that demonstrate a close correlation between Vpr's ability to induce a cell cycle arrest in G2 and the ability to transactivate HIV-1 or HIV-2 gene expression. Remarkably, expression of a transdominant form of Cdc2, which also delays or arrests cell in G2, increased expression of the HIV-1 LTR to levels similar to those found after transactivation by Vpr (Goh *et al.* 1998, Felzien *et al.* 1998). As postulated by Emerman *et al.* (1996) Vpr-mediated cell cycle arrest at the G2 stage

of the cell cycle may be a novel mechanism for indirectly increasing viral gene expression and viral production. Indeed, accumulating data, including ours, indicate that the HIV-1 LTR is most active at the G2 stage of the cell cycle (Goh *et al.* 1998). Increased LTR expression in G2 may be related to the availability of transcription factors that act on the LTR. Alternatively, as shown by Felzien *et al.* (1998), Vpr may modulate the transcriptional coactivator p300 which promotes cooperative interactions between the RelA subunit of NF- κ B and cyclin B1.Cdc2. However, we cannot rule out that Vpr may also have a direct effect on viral gene expression by interacting with the basal transcriptional machinery. Indeed several studies have reported *in vitro* interactions of Vpr with transcription factors such as TFIIB (Agostini *et al.* 1996) and Sp1 (Wang *et al.* 1995). More studies will be required to elucidate the functional relevance of these interactions especially in light of our data that indicates a lack of dependence between Vpr-mediated transactivation and Vpr nuclear localization.

If one of Vpr's biological function in HIV infection is to retain HIV-infected cells in the G2 stage of the cell cycle where the HIV LTR is most active, then the proteins needs to be available very early during the infection cycle. It is currently unclear whether virion-associated Vpr can induce cell cycle arrest and transactivate LTR-directed gene. expression. The establishment of a G2 arrest soon after viral entry would optimize basal transcription from the the integrated provirus before the expression of Tat. The presence of Vpr in the virion may reflect, in part, this requirement.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and DNA transfection.

The Jurkat CD4⁺ T-cell line was obtained from the ATCC and maintained in RPMI (GIBCO BRL, Burlington, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% of penicillin-streptomycin (P/S). HeLa cells were maintained in Dulbecco modified Eagle's Medium (DMEM) (GIBCO BRL, Burlington, Canada) supplemented with 10% FBS and 1% P/S. Jurkat cells were transfected by the DEAE-dextran method as described previously (Cohen *et al.*, 1990b). HeLa cells were transfected using the calcium-phosphate method (Cohen *et al.*, 1990b).

Plasmids.

The SVCMVBruR, SVCMVBruRATG- and SVCMVBruR mutant plasmids were constructed as described elsewhere by PCR amplification of the Vpr sequence from the HIV-1 proviral clone HxBru (Yao *et al.*, 1995; Subbramanian *et al.* 1998a). pSU3CAT, mutated pSU3CAT (Celander *et al.*, 1988), IICAT and IIExTat (Rosen *et al.*, 1985) constructs have been described in detail elsewhere.

CAT enzymatic assays.

CAT assays were performed essentially as described previously (Cohen *et al.*, 1990b). Briefly, cells were collected 68 to 72 hours post-transfection and were lysed by repeated cycles of freezing and thawing in Tris 250mM pH7.5. Protein concentration was determined using the Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada). After clarification of cell lysates, enzymatic activity was determined on 150 to 400µg of total protein. The enzymatic reactions were performed at two incubation times to ensure the linearity of the assay. CAT activity was expressed as the mean activity per minute for the two points. Transactivation are expressed as fold increase in CAT activity, which represents the CAT activity per minute measured in Vpr-expressing cells divided by the CAT activity measured in Vpr ATG-minus-transfected cells which has been given a value of one.

Semi-quantitative RT PCR.

Total RNA was extracted from 10⁷ transfected Jurkat cells by the Trizol reagent method (GIBCO BRL, Burlington, Canada). RNA was incubated with RNase free RQ1 DNase (Promega, Madison, WI, USA) for removal of contaminating

DNA. A reverse transcription reaction was performed on 20µg of RNA in 60µl of reaction mix containing: 1.7U/µl of MuLV RT, 5mM MgCl₂, 1X PCR buffer II (0.5M KCl, 0.1M Tris, pH 8.3), 1mM of each dNTP, 0.5U/µl of RNase inhibitor (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) and 10pmol of each anti-sense CAT oligonucleotide (5'-CAGCTGA-ACGGTCTGGTTA-3') and anti-sense GAPDH oligonucleotide (5'-CAAAGGTGGAGG-AGTGGGTGT-3') which is used as an internal control. cDNA was synthesized by incubating the RNA for 30 minutes at 42°C and 5 minutes at 99°C. Amplification of CAT and GAPDH cDNA was done separately, using a common stock solution containing 2mM MgCl₂, 1XPCR buffer, 2.5U of Ampli Taq Polymerase which has been divided into two before the addition of their respective 5' and 3' oligos (5'CAT: 5'-AAGGAATCTAGAATGGAGAAAAAATC-3', 5'GAPDH: 5'-GCTGATGCCCCATGTTTCGT-3'). The amplification step was performed on 6µl of cDNA using a denaturation step of 2 minutes at 95°C for 1 cycle followed by 35 cycles of 1 minute at 95°C, 1 minute at 60°C and 2 minute at 72°C. Final elongation of products was done for 7 minutes at 72°C. Five microliters of amplified product was loaded on a 1% agarose gel in 0,5X TBE and run for 2 hours. Southern blots were conducted as previously described (Trecu, 1989) and hybridation was done using internal probes. For CAT sequence detection, an internal sense oligonucleotide (5'-CCACCGTTGATATATCCCAATCGCATCGT-3') was labeled with T4 Polynucleotide Kinase using [γ ³²P]-dATP (4000Ci/mmol) (ICN Radiochemicals, Irvine, CA, U.S.A.). For GAPDH sequence detection, a probe covering the entire GAPDH sequence was generated by *Pst*I digestion of pGEMGAPDH using a [α ³²P]-dCTP-random-primed DNA fragment (3000Ci/mmol) (ICN Radiochemicals, Irvine, CA, U.S.A.). Quantification of signal on autoradiograms was performed with a Molecular Dynamics Personal Densitometer using ImageQuant software.

Semi-quantitative PCR.

Cells were lysed in a buffer containing 20mM Tris-HCl pH8.5, 100mM KCl and 0.8% of NP-40 and incubated at 55°C with proteinase K (0.1mg/ml) for 4 hours. Proteinase K was inactivated by boiling the samples. Samples were diluted one tenth in lysis buffer and 15µl of this crude lysate was amplified in a total volume of 50µl of reaction mix containing: 2.5mM MgCl₂, 1X PCR buffer II, 0.25mM of each dNTP and 1.25U of Ampli Taq Polymerase (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Amplification required 35 cycles of 1 minute at 94°C, 30 seconds at 55°C and 1

minute at 72°C followed by a final step of 7 minutes at 72°C for final elongation. The fragment amplified from SL3-3 overlaps -432 to +27 sequence (+1: initiation of transcription) (5' primer: 5'-GCCATTTTCGCGAGGCATG-3') (3' primer: 5'-CTCAGTCAAGCTTAGGACTGG-3'). Detection of SL3-3 sequence was performed by Southern blotting and hybridation with a probe covering the entire SL3-3 sequence and generated by random priming. We used the gene for human adrenergic receptor- β 2-subtype (β 2-AR) as an internal control in our PCR amplification reaction. The 399 base pair amplified fragment covers nucleotides 1465 to 1821 of the human β 2-AR (Gene Bank accession number: Y00106) (5' primer: 5'-TAGGCCTTCAAAG-AAGACCTGC-3'; 3' primer: 5'-CGTCTACTCCAGGGTCTTTCAG-3'). Detection of the β 2-AR fragment was performed using a sense oligonucleotide covering nucleotides 1514 to 1548 (5'-CATGTCCAGAACCTTAGCCAGGTGGAGCAGGATG-3') labeled with the T4 Polynucleotide Kinase using [γ^{32} P]-ATP (4000Ci/mmol) (ICN Radiochemicals, Irvine, CA, U.S.A.).

Figure 1. Vpr transactivates gene expression by increasing mRNA levels. Jurkat T cells were co-transfected with either SVCMVBruR or SVCMVBruRATG- and a plasmid encoding the CAT gene under the control of the HIV-1 LTR (IIICAT) or the MLV SL3-3 LTR (pSU3CAT). Seventy two hours post-transfection, **A**) CAT expression was analyzed. Transactivation is expressed as fold increase in CAT activity as compared to the ATG-minus control. Values obtained for the ATG-minus were arbitrarily set at one. Data presented here are derived from four (HIV-1 LTR), or nine (MLV SL3-3 LTR) independent experiments. **B**) Total RNA was isolated from transfected Jurkat cells. RT-PCR was performed on CAT and GAPDH mRNAs. The table shows the values of densitometric analysis and is presented as the ratio of the CAT mRNA signal over the GAPDH mRNA signal. **C**) For the pSU3CAT experiment, total DNA was isolated and semi-quantitative PCR was performed. Plasmid DNA was amplified using SL3-3 specific primers. The β 2-AR gene was amplified in parallel as an internal control. The table shows the values obtained by densitometric analysis and is presented as the ratio of the signal obtained for SL3-3 over the signal obtained for β 2-AR gene. Panels B and C of figure 1 show the data of a representative experiment. Similar results were observed in three independent experiments.

Figure 2. The level of basal expression from MLV SL3-3 and HIV-1 LTRs determine their responsiveness to Vpr transactivation. **A**) Schematic representation of the pSU3CAT reporter plasmid promoter indicating relative positions of *Bgl*III linker insertions. X (*Xho*I), H (*Hind*III), Av (*Ava*II), Ap (*Apa*I), B (*Bgl*II), light grey box: enhancer region, dark grey box: glucocorticoid response element. **B**) Transactivation of pSU3CAT or mutated pSU3CAT by Vpr as measured by CAT activity. Fold activation is calculated relatively to the value obtained with the Vpr-ATG- control **C**) Level of basal expression of Vpr-responsive and -unresponsive MLV SL3-3 promoters. Data are expressed as the percentage of acetylation/min for the wild-type (pSU3CAT) and mutated SL3-3 promoters co-transfected with the Vpr-ATG-minus construct. **D**) Transactivation of the HIV-1 LTR by Vpr or Vpr ATG-minus mutant in HeLa cells in the presence or absence of Tat. Values obtained with the Vpr-ATG- control have been arbitrarily set at one. The results presented are representative of the data obtained in two independent experiments. Standard deviation varied by less than 10%.

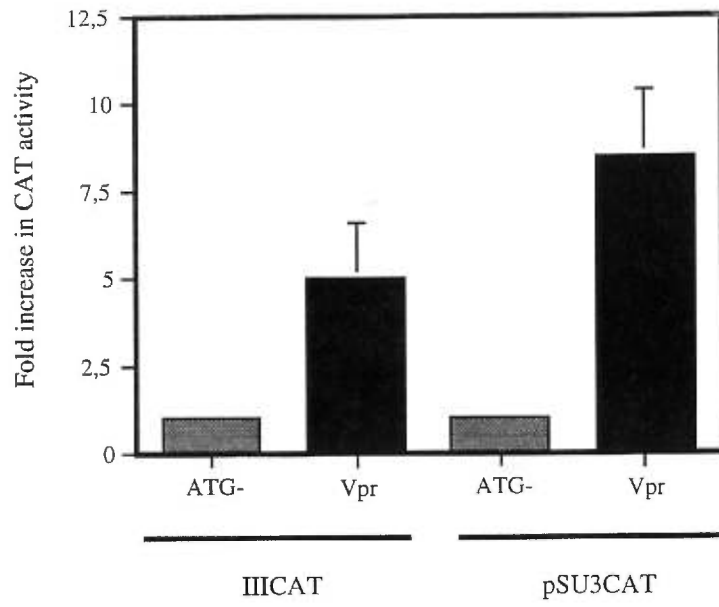
Figure 3. Identification of the regions of Vpr responsible for transactivation. A) Structural features of HIV-1 Vpr. The amino acid sequence of HxBru Vpr is indicated. Highlighted amino acids represent substitution mutations in the Vpr sequence. B) Jurkat cells were co-transfected with IIIICAT and Vpr expression vectors. Transactivation is expressed as fold increase in CAT activity of Vpr or Vpr mutants-expressing cells as compared to the ATG-minus control which was set arbitrarily at one. The transactivation data of the HIV-1 LTR is a representative experiment which has been reproduced twice.

Table 1. Summary of Vpr mutants phenotypes . Stability of the proteins, expressed as a percentage of wild-type Vpr stability, has been determined by pulse-chase experiments in COS-7 cells or MT4 cells transiently transfected with either plasmid expressors or proviral DNAs. Nuclear localization has been determined by confocal laser microscopy analysis of COS-7 transfected cells immunolabelled with a Vpr specific antiserum. Virion incorporation of the proteins was determined by transfection of MT4 cells with either wild type or mutated proviral DNAs and immunoprecipitation of the proteins from labelled virions. The level of incorporation was determined by the ratio of virus-associated Vpr to p66 RT relative to total Vpr expression. The wild-type Vpr/p66 RT ratio has been arbitrarily set at 100%. The transactivation data of the HIV-1 LTR is a representative experiment which has been reproduced twice. The transactivation data of the MLV SL3-3 LTR is a representative experiment which has been reproduced in four independent experiments. Standard deviation varied by less than 10%. (N=Nuclear, P=Perinuclear signal analyzed by confocal laser microscopy, ND=Not Determined; ++ wild type, - loss, +/- impairment of Vpr-mediated cell cycle arrest). The phenotypic analysis (stability, nuclear localization, virion incorporation and cell cycle arrest) of the Vpr mutants was previously described (Yao *et al.*, 1995; Subbramanian *et al.*, 1998a; Subbramanian *et al.*, 1998b; Yao *et al.*, 1998).

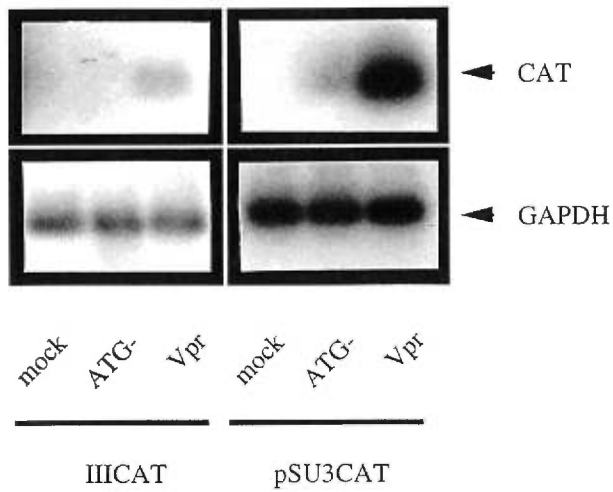
ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Daniel Celander for providing the mutated pSU3CAT constructs, Christian Lemaire for his helpful discussions on semi-quantitative PCR and Ramu Subbramanian for the design of the Vpr mutants as well as helpful discussions and Robert Lodge for critical reading of the manuscript. J.F. is a recipient of a studentship from the National Health Research and Development Program (NHRDP) of Health and Welfare Canada. É.A.C. is a recipient of a Medical Research Council of Canada (MRC) Scientist award. This work was supported by grants from the MRC and the Fonds pour la Formation de Chercheur et l'Aide à la Recherche (FCAR) to É.A.C.

A)

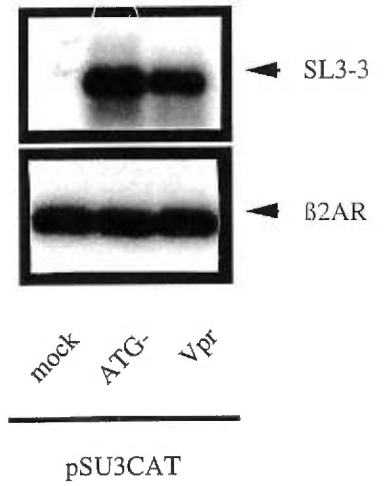


B)



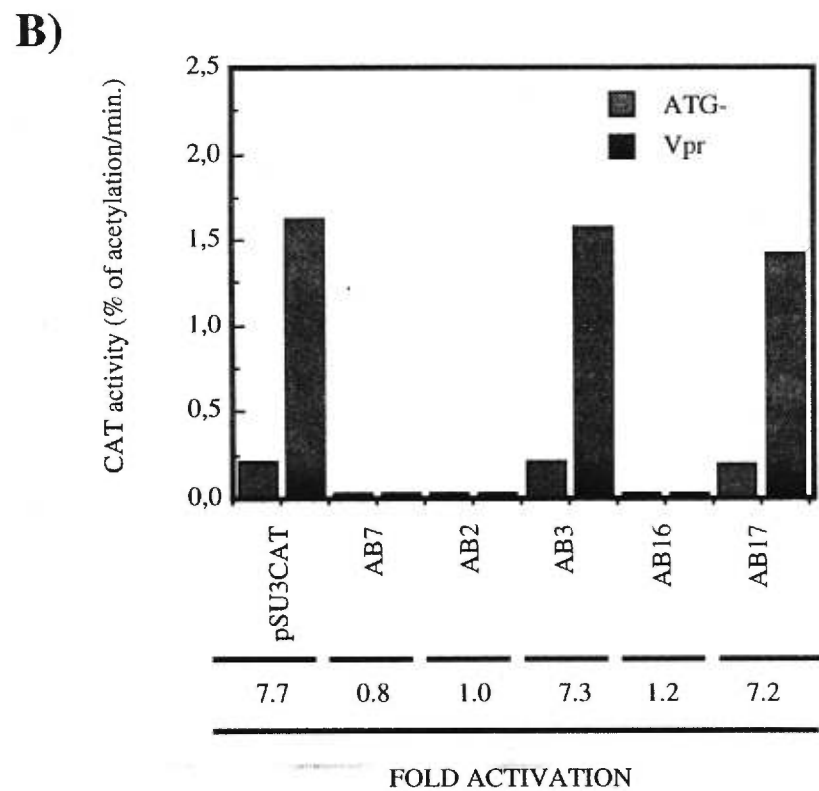
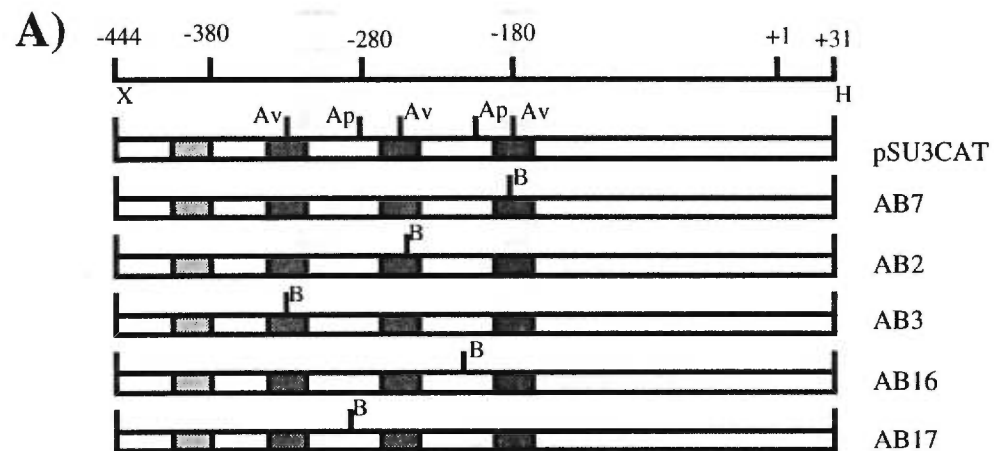
IICAT		pSU3CAT	
ATG-	Vpr	ATG-	Vpr
0.06	0.12	0.34	1.43

C)



ATG-	Vpr
1.26	0.86

figure 1



C)

CAT activity (% of acetylation/min.)					
pSU3	AB7	AB2	AB3	AB16	AB17
0.21	0.03	0.03	0.22	0.03	0.20

D)

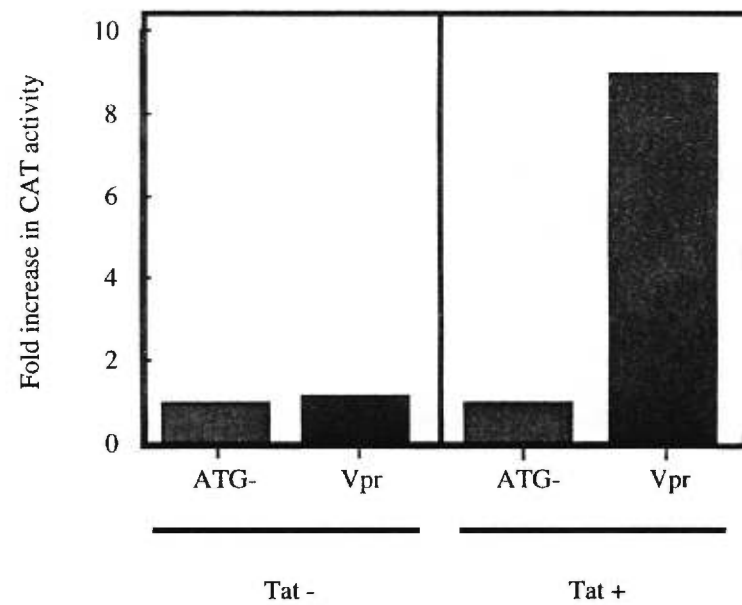
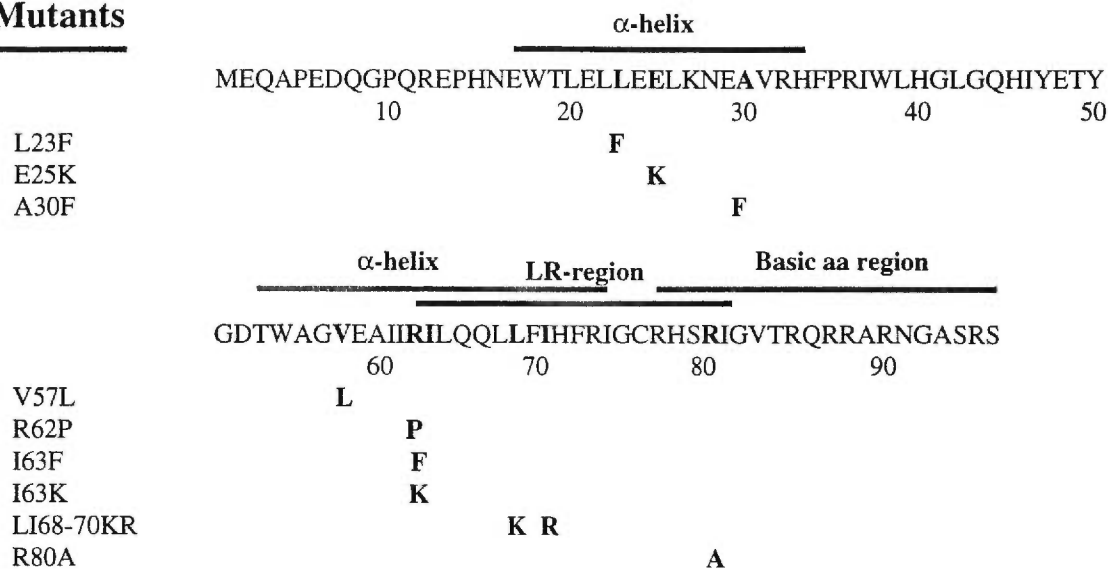


Figure 2.

A)

Mutants

B)

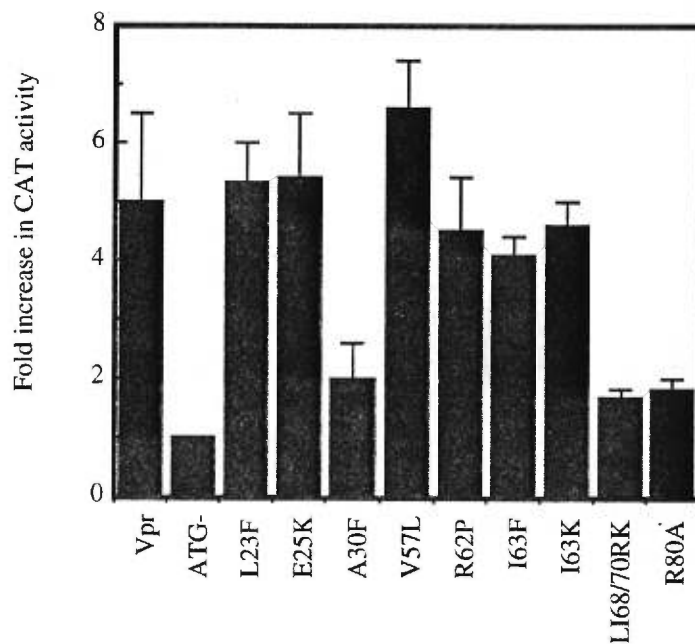


Figure 3.

Mutants	Stabilité (% de Vpr sauvage)	Localisation nucléaire	Incorporation (% de Vpr sauvage)	Arrêt en G2/M	Transactivation du LTR du VIH-1 (% de Vpr sauvage)	Transactivation du LTR SL3-3 du VLM (% de Vpr sauvage)
Vpr sauvage	100	N	100	++	100	100
L23F	85	ND	20	++	90	100
E25K	70	P	25	++	100	88
A30F	80	P	20	+/-	44	39
V57L	100	P	75	++	100	100
R62P	80	P	70	++	92	100
I63F	100	P	90	++	69	82
I63K	45	P	65	++	78	100
LI68/70RK	80	N	ND	-	30	14
R80A	100	N	100	-	34	30

REFERENCES

- Agostini, I, Navarro, J.-M, Rey, F, Bouhamdan, M, Spire, B, Vigne, R. & Sire, J. (1996). The human immunodeficiency virus type 1 Vpr transactivator: cooperation with promoter-bound activator domains and binding to TFIIB. *Journal of Molecular Biology* **261**, 599-606.
- Bodéus, M, Margottin, F, Durand, H, Rouer, E. & Benarous, R. (1997). Inhibition of prokaryotic cell growth by HIV-1 Vpr. *Research in Virology* **148**, 207-213.
- Bouhamdan, M, Benichou, S, Rey, F, Navarro, J.-M, Agostini, I, Spire, B, Camonis, J, Slupphaug, G, Vigne, R, Benarous, R. & Sire, J. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein binds to the uracil DNA glycosylase DNA repair enzyme. *Journal of Virology* **70**, 697-704.
- Celander, C. & Haseltine, W. A. (1984). Tissue-specific transcription preferences as a determinant of cell tropism and leukaemogenic potential of murine retroviruses. *Nature* **312**, 159-163.
- Celander, D, Hsu, B. & Haseltine, W. A. (1988). Regulatory elements within the murine leukemia virus enhancer region mediate glucocorticoid responsiveness. *Journal of Virology* **62**, 1314-1322.
- Cohen, E. A., Dehni, G., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. (1990a). Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *Journal of Virology* **64**(6), 3097-9.
- Cohen, E. A, Terwilliger, E. F, Jalinoos, Y, Proulx, J, Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. (1990b). Identification of HIV-1 vpr product and function. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirology* **3**, 11-18.
- Connor, R. I, Kuan Chen, K, Choe, S. & Landau, N. (1995). Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in mononuclear phagocytes. *Virology* **206**, 935-944.

Di Marzio, P, Choe, S, Ebright, M, Knoblauch, R. & Landau, N. R. (1995). Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization, and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *Journal of Virology* **69**, 7909-7916.

Emerman, M. (1996). HIV-1 Vpr and the cell cycle. *Current Biology* **6**, 1096-1103.

Felzien, L. K., Woffendin, C., Hottinger, M. O., Subbramanian, R., Cohen, E. A. & Nabel, G. J. (1998). HIV transcriptional activation by the accessory protein, Vpr, is mediated by the p-300 co-activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **95**, 5281-5286.

Fletcher, T. M, Brichachek, B, Sharova, N, McPherson, S, Stivathis, G. L, Sharp, P, Emerman, M, Hahn, B. H. & Stevenson, M. (1996). Segregation of nuclear import and cell cycle arrest function of HIV-1 Vpr between Vpx and Vpr proteins of SIV. *EMBO Journal* **15**, 6155-6165.

Goh, W. C., Rogel, M. E., Kinsey, M., Michael, S. F., Fultz, P. N., Nowak, M. A., Hahn, B. & Emerman, M. (1998). HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr *in vivo*. *Nature Medicine* **4**, 65-71.

He, J, Choe, S, Walker, R, Di Marzio, P, Morgan, D. O. & Landau, N. R. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34-cdc2 activity. *Journal of Virology* **69**, 6705-6711.

Heinzinger, N. K, Bukrinsky, M. I, Haggerty, S. A, Ragland, A. M, Kewalramani, V, Lee, M.-A, Gendelman, H. E, Ratner, L, Stevenson, M. & Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**, 7311-7315.

Herrman, C. H. & Mathews, M. B. (1989). The adenovirus E1B 19-kilodalton protein stimulates gene expression by increasing DNA levels. *Molecular and Cellular Biology* **9**, 5412-5423.

Jowett, J. B. M, Planelles, V, Poon, B, Shah, N. P, Chen, M.-L. & Chen, I. S. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 *vpr* gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *Journal of Virology* **69**, 6304-6313.

Macreadie, I. G, Castelli, L. A, Hewish, D. R, Kirkpatrick, A, Ward, A. C. & Azad, A. A. (1995). A domain of human immunodeficiency virus type 1 Vpr containing repeated H(S/F)RIG amino acid motifs causes cell growth arrest and structural defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**, 2770-2774.

Mahalingam, S, Ayyavoo, V, Patel, M, Kieber-Emmons, T. & Weiner, D. B. (1997). Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *Journal of Virology* **71**, 6339-6347.

Mahalingam, S, Collman, R. G, Patel, M, Monken, C. E. & Srinivasan, A. (1995a). Functional analysis of HIV-1 Vpr: identification of determinants essential for subcellular localization. *Virology* **212**, 331-339.

Mahalingam, S. A, Khan, S. A, Murali, R, Jabbar, M. A, Monken, C. E, Collman, R. G. & Srinivasan, A. (1995b). Mutagenesis of the putative alpha helical domain of the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 : effect on stability and virion incorporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**, 3794-3798.

Paxton, W, Connor, R. I. & Landau, N. R. (1993). Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *Journal of Virology* **67**, 7229-7237.

Planelles, V, Jowett, J. B. M, Li, Q.-X, Xie, Y, Hahn, B. & Chen, I. S. Y. (1996). Vpr-induced cell cycle arrest is conserved among primate lentiviruses. *Journal of Virology* **70**, 2516-2524.

Re, F, Braaten, D, Franke, E. K. & Luban, J. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34-cdc2-cyclinB. *Journal of Virology* **69**, 6859-6864.

Refaeli, Y, Levy, D. N. & Weiner, D. B. (1995). The glucocorticoid receptor type II complex is a target of the HIV-1 *vpr* gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **92**, 3621-3625.

Rogel, M. E., Wu, L. I. & Emerman, M. (1995b). The human immunodeficiency virus type *vpr* gene prevents cell proliferation during chronic infection. *Journal of Virology* **69**, 882-888.

Rosen, C., Sodroski, J. & Haseltine, W. (1985). The Location of Cis-Acting Regulatory Sequences in the Human T Cell Lymphotropic Virus Type III (HTLV-III/LAV) Long Terminal Repeat. *Cell* **41**, 813-823.

Schwartz, S, Felber, B. K. & Pavlakis, G. N. (1991). Expression of human immunodeficiency virus type 1 *vif* and *vpr* mRNAs is Rev-dependent and regulated by splicing. *Virology* **183**, 677-686.

Stewart, S. A, Poon, B, Jowett, J. B. & Chen, I. S. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 *vpr* induces apoptosis following cell cycle arrest. *Journal of Virology* **71**, 5579-5592.

Stivahtis, G. L, Soares, M. A, Vodicka, M. A, Hahn, B. H. & Emerman, M. (1997). Conservation and host specificity of Vpr-mediated cell cycle arrest suggests a fundamental role in primate lentivirus evolution and biology. *Journal of Virology* **71**, 4331-4338.

Subbramanian, R. & Cohen, E. A. (1994). Molecular biology of HIV accessory genes. *Journal of Virology* **68**, 6831-6835.

Subbramanian, R., Kessous-Elbaz, A., Lodge, R., Forget, J. & Cohen, E. A. (1998a). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages. *Journal of Experimental Medicine* **187**, 1103-1111.

Subbramanian, R., Yao, X.-J., Dilhuydy, H., Rougeau, N., Bergeron, D., Robitaille, Y. & Cohen, E. A. (1998b). Human Immunodeficiency virus type 1 Vpr localization: nuclear transport of a viral protein modulated by a putative amphipathic helical structure and its relevance to biological activity. *Journal of Molecular Biology* **278**, 13-30.

Treco, D. (1989). Preparation of genomic DNA. In *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, pp. 292-299. John Wiley, Brooklin, N.Y.

Tristem, M, Marshall, C, Karpas, A, Petrik, J. & Hill, F. (1990). Origin of *vpx* in lentiviruses. *Nature* **347**, 341-342.

Trono, D. (1995). HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. *Cell* **82**, 189-192.

Wang, L, Mukherjee, S, Jia, F, Narayan, O. & Zhao, L.-J. (1995). Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor SP1 and trans-activation of viral long terminal repeat. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 25564-25569.

Wang, L, Mukherjee, S, Narayan, O. & Zhao, L. J. (1996). Characterization of a leucine-zipper-like domain in Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* **178**, 7-13.

Westervelt, P, Henkel, T, Trowbridge, D. B, Orenstein, J, Heuser, J, Gendelman, H. E. & Ratner, L. (1992). Dual regulation of silent and productive infection in monocytes by distinct human immunodeficiency virus type 1 determinants. *Journal of Virology* **66**, 3925-3931.

Whiters-Ward, E. S., Jowett, J. B., Stewart, S. A., Xie, Y. M., Garfinkel, A., Shibagaki, Y., Show, S. A., Shah, N., Hanaoka, F., Sawitz, D. G., Armstrong, R. W., Souza, L. M. & Chen, I. S. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with HHR23A, a cellular protein implicated in nucleotide excision repair. *Journal of Virology* **71**, 9732-9742.

Yao, X.-J., Mouland, A. J., Subbramanian, R., Forget, J., Rougeau, N., Bergeron, D. & Cohen, E. A. (1998). Vpr stimulates viral expression and induces cell killing in human immunodeficiency virus type 1 infected dividing Jurkat T cells. *Journal of Virology* **72**, 4712-4720.

Yao, X.-J., Subbramanian, R., Rougeau, N., Boisvert, F., Bergeron, D. & Cohen, E. A. (1995). Mutagenic analysis of HIV-1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure on Vpr nuclear localization and virion incorporation. *Journal of Virology* **69**, 7032-7044.

Zhang, C., Rasmussen, C. & Chang, L.-J. (1997). Cell cycle inhibitory effects of HIV and SIV Vpr and Vpx in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology* **230**, 103-112.

Zhao, L.-J., Mukherjee, S. & Narayan, O. (1994). Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function: specific interaction with a cellular protein. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 15827-15832.

Zhao, Y., Cao, J., O'Gorman, M. R. G., Yu, M. & Yogev, R. (1996). Effect of human immunodeficiency virus type 1 protein R (*vpr*) gene expression on basic cellular function of fission yeast *Schizosaccharomyces*. *Journal of Virology* **70**, 5821-5826.