

2m11.2623.3

Université de Montréal

**Étude des effets pathologiques du gène *vpr* du virus de  
l'immunodéficience humaine 1 dans un modèle  
de souris transgéniques.**

par

Julie Lacaille

Département de pathologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.SC.)  
en biopathologie cellulaire

Juillet, 1997

© Julie Lacaille, 1997

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures.



W 4 U58 1998 V.066

W  
4  
U58  
1998  
V.066

Université de Montréal

Étude des effets pathologiques du gène vpr du virus de  
l'immunodéficience humaine 1 dans un modèle  
de souris transgéniques.

par  
M. L. Lacombe

Département de pathologie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
maîtrise en sciences (M.Sc.)  
en biologie cellulaire

juillet 1997

Dr. Louis Lacombe, 1997

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures



Ce mémoire intitulé :

Étude des effets pathologiques du gène *vpr* du virus de l'immunodéficience humaine 1 dans un modèle de souris transgéniques.

présenté par

Julie Lacaille

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Louis Lamarre

Directeur de recherche : Allegría Kessous

Codirecteur : François Coullée

Membre du jury : Francine Gervais

*Louis Lamarre  
Allegría Kessous  
François Coullée  
Francine Gervais (me Gill)*

Mémoire accepté le : 29.06.1998

---

## SOMMAIRE

Le virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1) entraîne une dégénérescence du système immunitaire et dans certains cas une atteinte du système nerveux central chez les patients infectés. Ce virus, comme tous les autres rétrovirus, possède les gènes *gag*, *pol* et *env* codant pour les protéines de structure et de réplication du virus. De plus, il possède 2 gènes régulateurs *tat* et *rev* ainsi que 4 gènes auxiliaires, *vif*, *vpu*, *vpr* et *nef*, contribuant à la physiopathogénèse de l'infection par le VIH-1. Le rôle de chacun de ces gènes dans la pathologie induite par le virus est difficile à déterminer à cause du manque de modèles animaux naturels susceptibles à l'infection. Pour dépasser ces limites, plusieurs modèles de souris transgéniques portant des gènes uniques ou l'ADN proviral du VIH-1 ont été développés.

Le but de cette étude était de générer des souris transgéniques porteuses du gène *vpr* et d'évaluer les effets pathologiques qu'elles développent. Nous avons donc généré deux transgènes sous le contrôle de promoteurs différents. Le premier, sous le contrôle du promoteur SL3-3, ciblait l'expression aux organes lymphoïdes. Aucun des fondateurs obtenus avec ce transgène n'a permis l'établissement d'une lignée. Pour cette raison nous n'avons pas pu analyser les effets de *vpr* avec ce promoteur.

Le second transgène, sous le contrôle du promoteur ubiquitaire RSV, a permis de générer plusieurs lignées dont trois ont été retenues pour analyse. Les investigations anatomo-pathologiques systématiques de plus de 40 souris transgéniques provenant des différentes lignées, ont révélé une atteinte des



organes lymphoïdes qui se traduit surtout par une hyperplasie des follicules lymphoïdes de la rate. Des réactions immuno-histochimiques et de cytofluorométrie utilisant plusieurs anticorps ont été effectuées afin de caractériser les différentes populations cellulaires présentes dans les rates de ces souris. Ces analyses nous ont permis de démontrer une augmentation de la population des lymphocytes B, alors que la population des lymphocytes T nous est apparue normale ou légèrement abaissée. De plus, cette étude nous a permis de constater que la population des macrophages était augmentée comparativement au contrôle normal.

Enfin, une étude de l'expression des messagers a été effectuée pour les trois lignées étudiées. Nous avons ainsi déterminé les organes exprimant les messagers de *vpr* par la technique de rétro-transcription suivie d'une amplification par PCR (RT-PCR). Cette étude semi-quantitative nous a permis de comparer le niveau d'expression d'un tissu à l'autre pour une même lignée.

## TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE .....	I
TABLE DES MATIÈRES .....	III
LISTE DES TABLEAUX.....	V
LISTE DES FIGURES .....	VI
LISTE DES ABBRÉVIATIONS .....	VIII
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 CLASSIFICATION DES VIRUS .....	1
1.2 PROPRIÉTÉS MORPHOLOGIQUES DU VIRUS.....	3
1.3 ORGANISATION DU GÉNOME VIRAL .....	5
1.3.1 LTRs .....	5
1.3.2 Les gènes de structure .....	6
1.3.2.1 Le gène <i>gag</i> .....	6
1.3.2.2 Le gène <i>pol</i> .....	6
1.3.2.3 Le gène <i>env</i> .....	7
1.3.3 Les gènes auxiliaires et de régulation .....	9
1.3.3.1 Le gène <i>tat</i> .....	9
1.3.3.2 Le gène <i>rev</i> .....	11
1.3.3.3 Le gène <i>vif</i> .....	12
1.3.3.4 Le gène <i>vpu</i> .....	13
1.3.3.5 Le gène <i>nef</i> .....	14
1.3.3.6 Le gène <i>vpr</i> .....	16
1.4 CYCLE DE RÉPLICATION DU VIRUS .....	20
1.4.1 Phase précoce.....	20
1.4.2 Phase tardive.....	21
1.5 ÉVOLUTION DE LA MALADIE ET SYMPTÔMES CLINIQUES .....	22
1.5.1 Atteintes tissulaires spécifiques.....	24
1.6 MODÈLES D'ÉTUDE DU VIH-1 .....	26
1.6.1 Le modèle de souris transgéniques .....	28
1.7 OBJECTIFS .....	32
<b>2. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>	<b>35</b>
2.1 PLASMIDES .....	35
2.1.1 Transformation bactérienne .....	37

2.1.2	Micro-méthode d'extraction plasmidique .....	39
2.1.3	Maxi-préparation .....	40
2.2	PRÉPARATION DU TRANSGÈNE .....	41
2.3	PRODUCTION DE SOURIS TRANSGÉNIQUES .....	42
2.3.1	Extraction de l'ADN génomique de souris .....	42
2.3.2	Hybridation sur filtre de type southern. ....	43
2.4	ÉTUDES ANATOMO-PATHOLOGIQUES .....	44
2.4.1	Prélèvement des organes .....	44
2.4.2	Coupes et coloration des tissus .....	45
2.5	IMMUNOHISTOCHIMIE .....	46
2.5.1	Réactions immunohistochimiques .....	46
2.5.2	Immunohistochimie pour marqueurs lymphoïdes et macrophagiques .....	47
2.6	CYTOFLUOROMÉTRIE SUR CELLULES DE RATES .....	48
2.7	EXPRESSION DES ARNm DE <i>vpr</i> .....	49
2.7.1	Extraction d'ARNs totaux à partir de tissus .....	50
2.7.2	Traitement des ARNs totaux à la DNase .....	50
2.7.3	Réaction de réverse transcriptase .....	51
2.7.4	Amplification par polymérisation en chaîne (PCR) .....	51
<b>3.</b>	<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>53</b>
3.1	DESCRIPTION DES CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES ET DES TRANSGÈNES .....	53
3.2	DÉVELOPPEMENT DES LIGNÉES TRANSGÉNIQUES .....	53
3.3	EXPRESSION DU GÈNE <i>vpr</i> .....	59
3.4	ÉTUDES ANATOMO-PATHOLOGIQUES .....	63
3.5	CARACTÉRISATION DES POPULATIONS CELLULAIRES DE LA RATE .....	69
3.6	COLORATION DE L'HÉMOSIDÉRINE .....	75
<b>4.</b>	<b>DISCUSSION</b> .....	<b>79</b>
4.1	CONCLUSION .....	89
	BIBLIOGRAPHIE .....	90
	REMERCIEMENTS .....	XI

---

## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** Classification des virus capables d'infecter les cellules de mammifères, selon les caractéristiques de leur génome.
- Tableau 2** Incidence des changements pathologiques de la rate observés chez des animaux provenant des trois lignées étudiées.
- Tableau 3** Caractérisation des cellules de la rate par immunophosphatase.
- Tableau 4** Décompte des populations lymphocytaires et macrophagiques par cytofluorométrie.
- Tableau 5** Étude comparative de la coloration de l'hémosidérine sur des coupes de rates de souris contrôles et transgéniques.

---

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1** a) Représentation schématique d'une particule virale du VIH-1.  
b) Organisation génomique du VIH-1.
- Figure 2** a) Représentation schématique du plasmide RSV-ER.  
b) Représentation schématique du plasmide SL3-ER.
- Figure 3** a) Représentation schématique du plasmide R-ER.  
b) Représentation schématique du plasmide SL-ER.
- Figure 4** Représentation des transgènes utilisés pour la microinjection.
- Figure 5** a) Visualisation sur gel d'agarose de l'ADN plasmidique R-ER après digestion avec les enzymes de restriction NdeI-XhoI.  
b) Hybridation sur filtre de type Southern d'ADN génomique de queues des souris transgéniques fondatrices R-ER
- Figure 6** Hybridation sur filtre de type Southern d'ADN de queues de souris des lignées R-ER 6, 14 et 1189.
- Figure 7** Analyse de l'expression du gène *vpr* dans les souris transgéniques par la méthode de RT-PCR.

---

**LISTE DES FIGURES (suite)**

- Figure 8** Coloration HPS de coupes de rates transgéniques présentant une hyperplasie lymphoïde.
- Figure 9** Coloration HPS de coupes de rates transgéniques présentant une hyperplasie myéloïde.
- Figure 10** Réactions d'immunophosphatase sur des coupes de rates à l'aide d'anticorps spécifiques aux lymphocytes T CD4 et CD8, aux lymphocytes B et aux macrophages.
- Figure 10A** Profil des colorations obtenu par cytofluorométrie.
- Figure 11** Coloration de l'hémosidérine (coloration de Perl) sur des coupes de rates de souris transgéniques et de souris contrôles.

---

**LISTE DES ABBRÉVIATIONS**

ADN :	acide désoxyribonucléique
ARN :	acide ribonucléique
	ARNm : ARN messenger
	ARNt : ARN de transfert
ATP :	adénosine triphosphate
BSA :	albumine sérique de bovin
CAT :	chloramphénicol acétyltransférase
CTP :	cytosine triphosphate
DTT :	dithiotreitol
EDTA :	acide éthylène diamine tétra-acétique
EtBr :	bromure d'éthidium
g :	gramme
GAPDH :	glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase
HPS :	hématoxyline phloxine safran
kb :	kilobase
KDa :	Kilo Dalton
kg :	kilogramme

---

L :	litre
LTR :	répétition terminale
M :	molaire
ml :	millilitre
mM :	millimolaire
μg :	microgramme
μl :	microlitre
μm :	micromètre
MA :	protéine de la matrice
MMTV :	mouse mammary tumor virus
ng :	nanogramme
nm :	nanomètre
NF-L :	neurofilament léger
ORF :	cadre de lecture ouvert
PCR :	amplification en chaîne utilisant la polymérase
pg :	picogramme
REG :	reticulum endoplasmique rugueux
rpm :	rotation par minute



---

RRE :	<i>rev</i> responsive element
RSV :	Rous sarcoma virus
RT :	transcriptase inverse
SCID :	déficiencé immunitaire héréditaire sévère
SDS :	dodecyl sulfate de sodium
SIDA :	syndrome d'immunodéficiencé humaine
SIV :	virus d'immunodéficiencé simienne
SNC :	système nerveux central
SV-40 :	virus simien 40
TAR :	transactivation response element
VIH :	virus de l'immunodéficiencé humaine

---

## 1. INTRODUCTION

### 1.1 CLASSIFICATION DES VIRUS

Les virus sont des micro-organismes parmi les plus petits de toutes formes vivantes. Même si ceux-ci existent depuis plusieurs dizaines de milliers d'années, leur découverte remonte à un peu plus de 100 ans. Ces micro-organismes sont des parasites obligatoires pouvant infecter une variété d'hôtes, tels les spiroplasmés, les mycoplasmes, les bactéries, les algues, les protozoaires, les champignons, les invertébrés, les plantes et les vertébrés. En tant que parasites, ils nécessitent la machinerie cellulaire de l'hôte pour assurer leur réplication. Leur matériel génétique est composé soit d'ADN ou d'ARN, à l'exception des prions. (Fields et al., 1990)

Outre le type de matériel génétique, la classification est basée sur les différentes caractéristiques virales. Notamment, celles concernant spécifiquement la réplication du virus ou encore les propriétés physico-biologiques. En se basant sur les caractéristiques du génome viral, une classification des virus capables d'infecter les cellules de mammifères est proposée au tableau 1.

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) fait partie de la famille des *retroviridae* de la sous-famille des *lentivirinae*. Le tableau révèle que les rétrovirus sont caractérisés par une étape ADN dans leur cycle de réplication. En effet une enzyme appelée transcriptase inverse permet à leur génome ARN d'être transcrit en ADN. Ce dernier peut ensuite intégrer le génome de l'hôte in-

**Tableau 1** : Classification des virus capables d'infecter les cellules de mammifères, selon les caractéristiques de leur génome.

			FAMILLE	
			ENVELOPPÉ	NON-ENVELOPPÉ
VIRUS ADN	DOUBLE- BRINS	CIRCULAIRE		<i>Papovaviridae</i>
		LINEAIRE	<i>Poxviridae</i>	<i>Adenoviridae</i>
	<i>Iridoviridae</i>		<i>Hepadnaviridae</i>	
	<i>Herpesviridae</i>			
SIMPLE- BRIN	LINEAIRE		<i>Parvoviridae</i>	
VIRUS ARN	DOUBLE- BRINS			<i>Reoviridae</i> <i>Birnaviridae</i>
	SIMPLE- BRIN	POSITIF	<i>Retroviridae</i> (étape ADN dans la réplication)	<i>Picornaviridae</i> <i>Caliciviridae</i>
			<i>Coronaviridae</i>	
			<i>Togaviridae</i>	
			<i>Flaviridae</i>	
	SIMPLE- BRIN	NEGATIF	<i>Paramyxoviridae</i>	
			<i>Rhabdoviridae</i>	
			<i>Filoviridae</i>	
<i>Orthomyxoviridae</i>				
<i>Bunyaviridae</i>				
		<i>Arenaviridae</i> (circulaire ou linéaire)		

fecté et induire diverses atteintes pathologiques. Cette forme intégrée est appelée provirus.

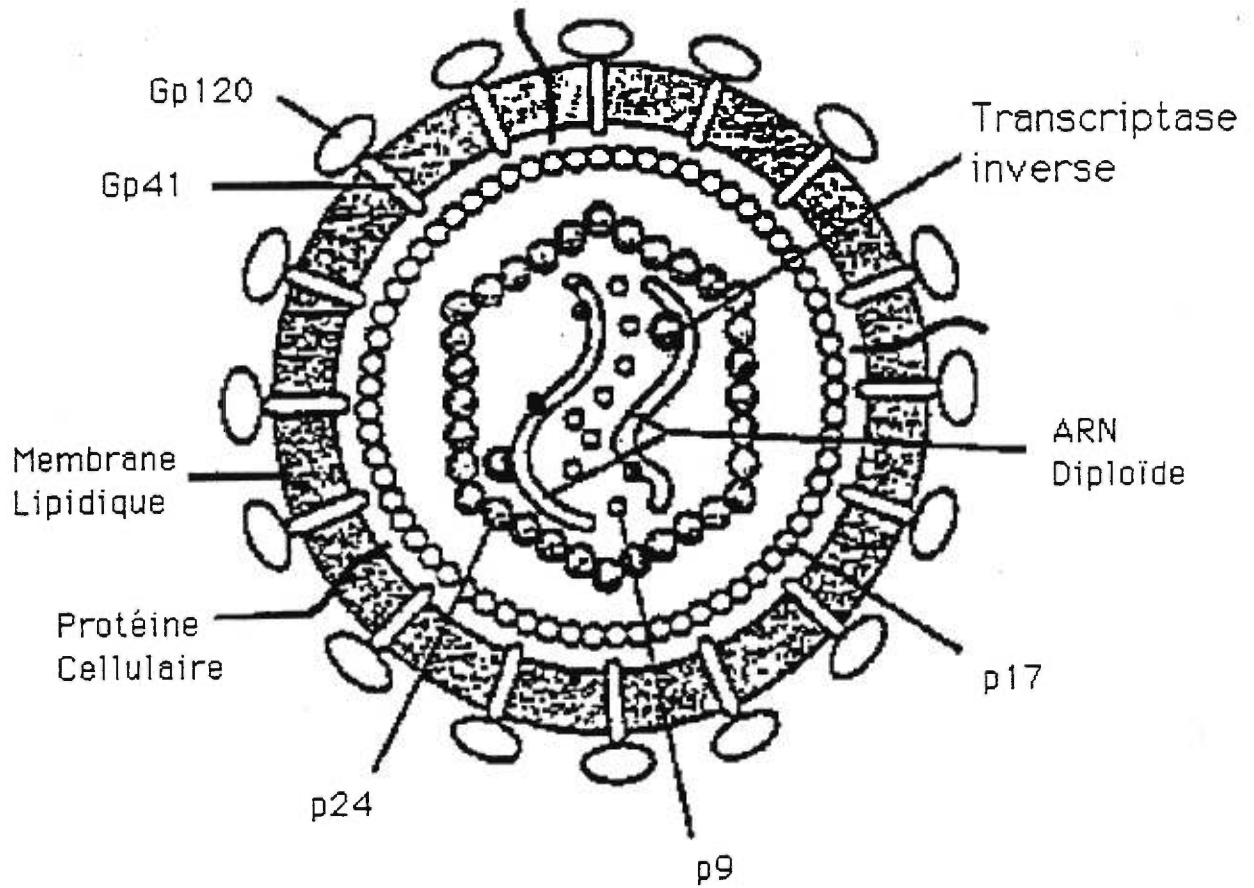
## 1.2 PROPRIETES MORPHOLOGIQUES DU VIRUS

Le rétrovirus VIH-1 est un petit virus enveloppé. Cette enveloppe consiste en une double couche lipidique provenant de la membrane cellulaire de la cellule hôte qu'il acquiert lors du bourgeonnement. Au niveau de l'enveloppe, on retrouve deux glycoprotéines virales : la gp120 à sa surface et la protéine transmembranaire gp 41 (Aloia et al., 1988; Gelderblom et al., 1987). De plus, on retrouve plusieurs protéines cellulaires provenant de la membrane de l'hôte, dont les antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité, la  $\beta$ 2-microglobuline, l'actine et l'ubiquitine (Arthur et al., 1992). Associée à la surface interne de cette enveloppe, se trouve la protéine de la matrice (p17). Le nucléoïde viral contient quant à lui la protéine de la capsid (p24) qui en est la composante principale, la protéine de la nucléocapsid (p9) qui est associée au génome viral et la protéine p6 présente à l'intérieur du virion, mais dont la localisation précise est inconnue. De plus, il contient 3 protéines fonctionnelles: la protéase, la polymérase virale ARN-dépendante ou transcriptase inverse et l'intégrase. Finalement, on y retrouve le génome viral constitué de deux(2) molécules d'ARN simple-brin identiques, ainsi que des molécules d'ARNt responsable de l'initiation de la transcription inverse. (Morrow et al., 1994; Greene, 1991) (figure 1a)

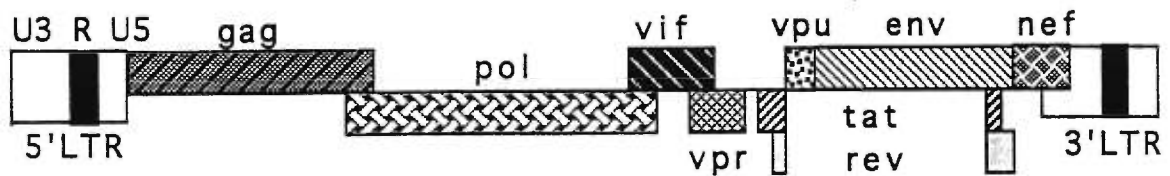
**Figure 1a :** Représentation schématique d'une particule virale du VIH-1. Le génome viral est constitué de deux molécules d'ARN simple-brin identiques. À la surface externe, on retrouve les glycoprotéines de l'enveloppe gp120 (surface) et gp41 (transmembranaire). Associée à la surface interne, se trouve la protéine de la matrice p17. De plus, on retrouve la protéine de la capsid p24 et la protéine de la nucléocapsid p9.

**Figure 1b :** Organisation génomique du VIH-1. On retrouve les 3 gènes de structure constitutifs *gag*, *pol* et *env* ainsi que les gènes auxiliaires et de régulation *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* et *nef*. Les séquences terminales répétitives (LTR) sont représentées aux extrémités 5' et 3'.

**A**



**B**



### 1.3 ORGANISATION DU GÉNOME VIRAL

Le génome de VIH-1 est d'une longueur d'environ 9,2 kb. Comme tous les autres rétrovirus, il contient des séquences terminales répétitives (LTRs) à chacune de ces extrémités et les gènes de structure constitutifs des rétrovirus : *gag*, *pol* et *env* (Varmus, 1988). De plus, il possède 6 cadres de lecture ouverts (ORFs) ("open reading frame") qui codent pour les gènes auxiliaires ou de régulation *vif*, *vpr*, *vpr*, *tat*, *rev*, et *nef*. (Figure 1b)

#### 1.3.1 LTRs

Les LTRs communs à tous les rétrovirus sont subdivisés en 3 régions chez le virus intégré, soient U3, R et U5. Ces séquences jouent un rôle important dans l'intégration et la transcription virale. Dans l'ARN viral, la région U5 est située à l'extrémité 5' alors que la région U3 est à l'extrémité 3'. Suite à la transcription inverse, nécessaire à l'intégration virale, ces séquences sont dupliquées pour générer les régions terminales répétées ou LTRs. On les retrouve aux extrémités 3' et 5' du génome proviral intégré dans les chromosomes cellulaires (Varmus, 1988). Le LTR en 5' contient une série d'au moins 12 éléments cis-régulateurs pouvant lier une variété de facteurs de transcription cellulaires. Ces séquences, dont 3 sites Sp1, une boîte TATA, 2 sites de liaison pour le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B et 3 sites de liaison pour la protéine d'activation AP-1, sont localisées dans la région U3 en amont du site d'initiation de la transcription. Elles sont d'ailleurs suffisantes pour stimuler un haut niveau de transcription. D'autre part, on retrouve dans ce LTR une séquence appelée TAR (Transactivation responsive element) situé dans la région R, qui lie la protéine TAT. Cette liaison entraîne une transactivation de la



transcription et est absolument essentielle à l'infectivité virale (Gatignol et al., 1989). De plus, on retrouve dans la région R du LTR de l'extrémité 3' le signal de polyadénylation et de l'arrêt de la transcription (Cherrington et al., 1992).

### **1.3.2 Les gènes de structure**

#### **1.3.2.1 Le gène *gag***

Le gène *gag* code pour les protéines de structure de la particule virale. Il est traduit à partir d'un ARNm viral non-épissé sous forme d'une polyprotéine précurseur ,Pr55<sup>gag</sup>, qui joue un rôle important dans l'assemblage et le relarguage des particules virales. Ce précurseur est ensuite clivé en plusieurs protéines par la protéase p10: la protéine de la matrice p17, la protéine de la capsid p24 et les protéines de la nucléocapsid p9 et p6. (Mervis et al., 1988)

#### **1.3.2.2 Le gène *pol***

Le gène *pol* est traduit à partir de l'ARNm du gène *gag* non-épissé. L'expression de la protéine Pol se produit quand le ribosome dérape d'un nucléotide durant la traduction (ribosomal frameshift) entraînant la synthèse d'une protéine-fusion entre les protéines Gag et Pol, Pr160<sup>gag-pol</sup>. Ce déphasage du cadre de lecture (slippage) se produit dans une région contenant une séquence homopolymérique ainsi qu'une boucle en tête d'épingle (séquence de slippage), comprises dans les 241 nucléotides chevauchant les 2 gènes (Jacks et al., 1988; Wilson et al., 1988). La fréquence de ce changement est cependant faible, on estime le ratio gag/gag-pol à 9/1. Le clivage de cette polyprotéine *gag-*

*pol* génère différents produits de *gag*, mais aussi les protéines encodées par *pol*. Celui-ci code pour les enzymes virales suivantes : protéase, transcriptase inverse et intégrase. La protéase virale p10 (PR) résulte d'un mécanisme d'autoprocession (Park et al., 1991; Peng et al., 1989; Mous et al., 1988). La dimérisation de celle-ci est requise pour son activité enzymatique (Meek et al., 1989; Pearl et al., 1987). Celle-ci est responsable du clivage de la Pr160<sup>gag-pol</sup> en RT, intégrase et protéase. De plus, elle clive la Pr55<sup>gag</sup> en ses différents produits (Wills et al., 1991). La transcriptase inverse (RT) est composée de 2 sous-unités, un polypeptide de 66 KDa et un de 51 KDa (p66/p51) (Di marzo Veronese et al., 1986). Initialement, un homodimère p66/p66 subit un clivage endoprotéolytique assymétrique, grâce à la protéase p10, pour donner la sous-unité p51 (Mous et al., 1988; Graves et al., 1990). La transcriptase inverse a plusieurs activités catalytiques dont une activité ADN polymérase qui copie les matrices ADN aussi bien que les matrices ARN, et une activité ribonucléase H qui dégrade le brin d'ARN des complexes ARN-ADN (Hansen et al., 1987). Finalement, l'intégrase p32 est une protéine essentielle à l'intégration de l'ADN rétroviral dans les chromosomes cellulaires (Grandgenett et al., 1990). On lui accorde aussi d'autres propriétés dont une activité endonucléase ADN (Sherman et al., 1990).

### 1.3.2.3 Le gène *env*

Le gène *env* code pour sa part pour les glycoprotéines de l'enveloppe. Il code pour un ARNm mono-épissé de 4,3 kb contrôlant la synthèse d'un précurseur de 88 KDa (Feinberg et al., 1986). Celui-ci est ensuite glycosylé en N-terminal par l'addition de résidus d'oligosaccharides et d'oligomannosyl, ce qui en augmente le poids moléculaire de 88 à 160 KDa d'où le nom gp160 (Feinberg et

al., 1986; Allan et al., 1985; Berman et al., 1988. Selon certaines études, cette glycosylation aurait lieu dans la lumière du réticulum endoplasmique rugueux (REG) (Allan et al., 1985; Berman et al., 1988), alors que d'autres études indiquent que la glycosylation s'effectuerait plutôt au niveau de l'appareil de Golgi lors de la migration de la gp160 vers la membrane cellulaire (Tschachler et al., 1990). Ce serait aussi dans le Golgi que la gp160 serait clivée par des protéases cellulaires, générant ainsi la glycoprotéine de surface gp120 et la glycoprotéine trans-membranaire gp41 (Kozarsky et al., 1989; Willey et al., 1988). Ces dernières demeurent néanmoins associées par des liens non-covalents dont la force varie selon la souche de VIH (Willey et al., 1988; McCune et al., 1988). Après le clivage, les protéines matures gp41 et gp120 sont transportées à la surface cellulaire. L'efficacité de la maturation de la gp160 est faible car seulement 5 à 15% de la gp160 synthétisée est clivée pour donner la gp41 et la gp120. La majorité de la gp160 non-clivée est dégradée par les lysosomes (Willey et al., 1988). Les raisons de cette dégradation demeurent inconnues (Kozarsky et al., 1989; Willey et al., 1988).

Lors du bourgeonnement, les virions s'enveloppent de la membrane cellulaire, entraînant avec cette dernière la gp120 et la gp41. Ensemble ces protéines virales sont responsables du tropisme viral par leur capacité à lier le récepteur cellulaire CD4, conférant au virus la propriété d'infecter les lymphocytes T porteurs de ce récepteur (cellules cibles) (Lasky et al., 1987). La gp120 possèdent 5 domaines constants qui contiennent le site d'attache au CD4, et 5 domaines hyper-variables où la conservation en acides aminés est inférieure à 25%. Ces domaines hypervariables confèrent au virus la variabilité virale (Alizon et al., 1986; Willey et al., 1986). Cette variabilité s'observe non seulement

entre différents patients, mais également chez une même personne au cours de l'évolution de la maladie ("mutation évolutive") (Alizon et al., 1986).

Une des propriétés de l'interaction CD4-gp120 est la capacité d'induire la fusion des membranes entre les cellules infectées et non infectées, entraînant la formation de cellules géantes multinucléées ou syncytium. La production de syncytium est favorisée par la protéine transmembranaire gp41, issue de la partie C-terminale de la gp160. Celle-ci contient une région très hydrophobe qui lui permet de s'ancrer dans la membrane cellulaire et la membrane virale (Kowalski et al., 1987; Gallaher, 1987).

Récemment il a été démontré qu'un co-récepteur est requis pour l'entrée du VIH à l'intérieur des cellules cibles. Dépendamment de la souche virale et du type cellulaire étudiés, plusieurs co-récepteurs faisant partie de la famille des récepteurs de chémokines ont été identifiés. Il a été démontré que CCR5 serait le co-récepteur pour les souches virales macrophages-tropiques alors que CXCR4 serait le co-récepteur pour les souches lymphotropiques (Alkhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996; Feng et al., 1996). Cette différence de tropisme serait dûe aux différences de séquence observées chez la gp 120.

### **1.3.3 Les gènes auxiliaires et de régulation**

#### **1.3.3.1 Le gène *tat***

Le gène *tat*, composé de deux exons est essentiel à la réplication du VIH et code pour une protéine transactivatrice de l'expression génique du virus

(Fischer et al., 1986; Sodroski et al., 1985). Le premier exon est situé devant le gène *env* et le second se retrouve dans le gène *env*. Ces deux exons codent pour une protéine de 16 KDa contenant 86 acides aminés, qui est produite à partir d'ARNm épissé (Arya et al., 1985; Feinberg et al., 1986). Le premier exon codant de *tat* dirige la synthèse d'une forme de la protéine de 72 acides aminés qui est suffisante pour assurer la transactivation (Sodroski et al., 1985). De plus, des analyses de structure/fonction par mutagenèse de la protéine Tat complète ont démontré la présence de 3 domaines fonctionnels importants. On retrouve à la partie amino-terminal un groupe acide d'acides aminés constituant un domaine d'activation transcriptionnelle (Rappaport et al., 1989). De plus, une portion riche en cystéine composée de 7 résidus cystéine, hautement conservée entre les différents isolats de VIH-1, VIH-2 et SIV (virus d'immunodéficience simienne), a été identifiée. Ce domaine pourrait jouer un rôle dans la dimérisation de Tat, qui se fait par l'intermédiaire d'ions métalliques (Frankel et al., 1988). Finalement, on retrouve une région chargée positivement riche en résidus arginine et lysine. Cette dernière est responsable de la localisation nucléaire et nucléolaire de Tat, ainsi que de l'interaction avec les ARNm (Ruben et al., 1989; Hauber et al., 1989). Des mutations effectuées dans chacune de ces régions entraînent une réduction marquée ou une abolition complète de la fonction de Tat (Rosen, 1992; Garcia et al., 1989; Ruben et al., 1989).

La protéine Tat reconnaît une séquence spécifique appelée l'élément TAR (trans activating region). L'élément TAR contient 59 nucléotides et est situé à l'extrémité 5' des ARNm viraux. Pour assurer la liaison de Tat, TAR doit se trouver sous la forme d'une structure en épingle à cheveux ("stem-loop"). (Feng et al., 1988; Rosen et al., 1985) Des analyses de mutagenèse ont démontré que la liaison de Tat à l'élément TAR est position et orientation-dépendante (Rosen

et al., 1985; Roy et al., 1990). Cette interaction résulte en une activation transcriptionnelle qui permet l'augmentation du niveau initial d'ARNm viraux. Il a été suggéré que cette augmentation serait dû à une hausse directe de l'initiation de la transcription ou encore, à une efficacité transcriptionnelle accrue due à une meilleure stabilité de la polymérase (Laspia et al., 1990; Marciniak et al., 1990).

### 1.3.3.2 Le gène *rev*

Le gène *rev* (regulator of virion expression) est, tout comme *tat*, essentiel à la réplication (Feinberg et al., 1986; Sodroski et al., 1986). Il code pour une protéine de 19 KDa produite à partir d'ARNm multi-épissés codant pour 116 acides aminés. Cette protéine est exprimée à partir de 2 exons situés devant et à la fin du gène *env* (Sadaie et al., 1988; Schwartz et al., 1990a). Cette protéine est localisée dans le noyau au niveau du nucléole (Cullen et al., 1988). Des analyses par mutagenèse ont démontré la présence de 2 domaines fonctionnels distincts dans la protéine *rev*. Le premier domaine consiste en une séquence de 35 acides aminés riche en résidus arginine. Celle-ci serait responsable de l'interaction de Rev avec la séquence ARN spécifique appelée RRE (Rev response element). Au centre de ce domaine, une région d'acides aminés basiques serait responsable de la localisation nucléaire de *rev* (Malim et al., 1989). De plus, la perte de la portion amino-terminale de cette région basique résulte en une protéine inerte qui s'accumule dans le noyau mais pas dans le nucléole (Cochrane et al., 1990). Ceci indique que la localisation nucléolaire de Rev est cruciale pour son activité. Le deuxième domaine important, constitué d'une séquence riche en leucine et situé près de l'extrémité carboxy-terminale de la protéine, serait quant à lui un domaine d'activation. Des mutations effectuées dans ce domaine entraîne la

formation d'un phénotype dominant négatif *in vivo* (Malim et al., 1989; Mermer et al., 1990).

L'expression de la protéine Rev entraîne la production d'ARNm viraux mono-épissés ou non épissés qui s'accumulent dans le cytoplasme. En absence de Rev, seulement les petits ARNm multi-épissés codant pour les protéines de régulation virale s'accumulent à ce même endroit (Feinberg et al., 1986; Malim et al., 1988). L'activité de cette protéine est dépendante de la séquence de 234 nucléotides appelé RRE localisée dans le gène *env* (Malim et al., 1989; Malim et al., 1988). Il a été démontré que *rev* augmente la demie-vie des ARNm contenant la séquence RRE, améliorant de ce fait le transport des ARNs non-épissés ou mono-épissés du noyau au cytoplasme et l'efficacité de traduction de ceux-ci (Felber et al., 1989; Felber et al., 1993; Hadzopoulos-Cladaras et al., 1989).

### **1.3.3.3 Le gène *vif***

Le gène *vif* (virion infectivity factor) encode une protéine cytoplasmique de 23 KDa comprenant 192 acides aminés (Lee et al., 1986). Ce produit de gène tardif se retrouve dans la majorité des lentivirus. La fonction de Vif n'est pas bien claire, mais on sait qu'elle agit durant l'assemblage en permettant la formation de particules virales compétentes dans les stades précoces de l'infection (Gabuzda et al., 1992; Von Schwedler et al., 1993). Il a été démontré que les virus défectifs pour le gène *vif* sont environs mille fois moins infectieux que les souches de type sauvage (Fischer et al., 1987; Strebel et al., 1987). Par ailleurs, la transmission virale cellule-cellule est peu affectée par ces virus défectifs (Fischer et al., 1987). Des études ont démontré que *vif* est important dans l'assemblage et/ou la maturation des particules ainsi que dans la synthèse d'ADN proviral dans les

cellules-cibles (Höglund et al., 1994; Von Schwedler et al., 1993; Gabuzda et al., 1992). L'importance de Vif varie d'un type cellulaire à un autre; certaines lignées cellulaires contiennent des protéines ayant des fonctions similaires à la protéine Vif où les virus défectifs pour ce gène sont complètement compétents (Gabuzda et al., 1992; Sakai et al., 1993; Von Schwedler et al., 1993; Sova et al., 1993).

#### **1.3.3.4 Le gène *vpu***

Le gène *vpu* (viral protein U) est traduit à partir de l'ARNm codant également pour la glycoprotéine de l'enveloppe (Schwartz et al., 1990b). La séquence codante de *vpu* se situe à l'extrémité 5' de cet ARNm bicistronique (Cohen et al., 1988). Il code pour une protéine de 16 KDa contenant 81 acides aminés qui est exprimée durant la phase tardive du cycle de réplication (Cohen et al., 1988; Strebel et al., 1988). Cette protéine est exprimée par la majorité des souches de VIH-1 mais aucun analogue n'est retrouvé ni chez VIH-2 ou la plupart des souches SIV (Subbramanian et al., 1994). Il a été démontré que Vpu est une protéine membranaire intégrale de type 1 (Maldarelli et al., 1993), et les anticorps dirigés contre celle-ci ont permis de localiser la protéine au niveau de la membrane cytoplasmique, du réticulum endoplasmique ainsi qu'à l'intérieur du compartiment endosomal (Schubert et al., 1994). Vpu contient dans sa séquence peptidique hautement conservée, deux résidus sérine (position 52 et 56) qui sont phosphorylés sous l'action d'une caséine kinase de type II (Schubert et al., 1992).

Cette protéine non-essentielle à la réplication virale remplit tout de même des fonctions importantes dans la réplication. Son premier rôle consiste en la dégradation des molécules CD4 à l'intérieur du réticulum endoplasmique (RE) (Willey et al., 1992a). On sait que des complexes intracellulaires se forment dans



le RE entre les molécules CD4 et les précurseurs des glycoprotéines de l'enveloppe, affectant ainsi leur migration à la membrane cytoplasmique des cellules infectées (Willey et al., 1992a; Willey et al., 1992b). Vpu jouerait donc un rôle important dans la maturation et le transport intracellulaire de env en accélérant la dégradation des molécules CD4. Le déterminant spécifique à l'activité biologique de Vpu semble être présent dans le domaine cytoplasmique de CD4 (Maldarelli et al., 1993; Vincent et al., 1993; Lenburg et al., 1993). Cet effet est par contre CD4 spécifique, les molécules CD8 pareillement retenues dans le RE ne sont pas dégradées sous l'effet de Vpu (Lenburg et al., 1993). En plus de cette première fonction, Vpu interviendrait lors du bourgeonnement en activant la libération du virion à l'extérieur des cellules infectées (Klimkait et al., 1990). Ces deux fonctions biologiques de Vpu ne sont pas reliées entre elles. La libération du virion n'est pas dépendante de l'expression de CD4 ou de l'enveloppe (Yao et al., 1992). De plus, la phosphorylation de Vpu n'est pas requise pour l'activation de la libération du virion et cette dernière est bloquée lorsque la protéine est retenue dans le RE, alors que c'est l'inverse pour la dégradation des molécules CD4 (Schubert et al., 1994). Finalement, il a été démontré que Vpu produit la diminution de l'expression du complexe majeure d'histocompatibilité classe 1 en induisant la perte rapide des chaînes lourdes nouvellement formées dans le RE (Kerkau et al., 1997).

#### **1.3.3.5 Le gène *nef***

Le gène *nef* autrefois appelé 3'orf, orfB, E' et F code pour une phosphoprotéine myristylée de 27 KDa (Muesing et al., 1985; Guy et al., 1987; Rabson et al., 1985). Celui-ci se retrouve seulement chez les lentivirus de primates (Trono, 1995). Il est contenu dans un cadre de lecture ouvert situé à

l'extrémité 3' du génome viral chevauchant le gène *env* et le LTR en 3' (Muesing et al., 1985; Ratner et al., 1985). Plusieurs ARNm multi-épissés codent pour cette protéine. Celle-ci est majoritairement cytoplasmique et est associée à la membrane plasmique via son extrémité N-terminale myristylée (Trono, 1995). Nef est produite très tôt au cours de l'infection, devant Tat et Rev (Kim et al., 1989a). Mais elle est aussi présente à tous les stades de l'infection (Trono, 1995).

Le rôle de cette protéine n'est pas totalement élucidé. Initialement, des études ont démontré que Nef régule l'expression des gènes viraux de façon négative, possiblement en inhibant l'activité transcriptionnelle contrôlée par les LTRs (Ahmad et al., 1988; Niederman et al., 1989), d'où son nom Nef pour "negative factor". Par contre, d'autres études n'ont pu révéler d'effets de Nef sur la réplication du VIH (Hammes et al., 1989). De plus, certaines études de cinétique ont montré un effet positif de Nef chez les virus de type sauvage en comparaison à des mutants de nef dans certaines lignées cellulaires (Kim et al., 1989b; Miller et al., 1994; Terwilliger et al., 1991; Spina et al., 1994; Miller et al., 1995). Comme la séquence de Nef est très polymorphique, il pourrait y avoir des différences fonctionnelles entre les différentes allèles de Nef (Terwilliger et al., 1991; Zazopoulos et al., 1993). La seconde fonction de Nef est sa capacité à réduire le niveau de molécules CD4 à la surface cellulaire sans toutefois affecter le taux d'ARNm ou de protéines (Garcia et al., 1993; Garcia et al., 1991). Contrairement à Vpu qui dégrade le CD4 dans le RE, Nef semble entraîner l'endocytose et la dégradation lysosomale de CD4 (Aiken et al., 1994). Tout comme Vpu, des études ont montré qu'une séquence du domaine cytoplasmique de CD4 serait l'élément nécessaire à cette dégradation (Aiken et al., 1994; Chen et al., 1993; Garcia et al., 1993; Lenburg et al., 1993). De plus, l'association de

Vpu et de Nef à la membrane serait aussi essentielle à cet effet (Vincent et al., 1993). D'autres activités ont aussi été attribuées à Nef sans toutefois être supportées par des études ultérieures. Notamment une activité GTPase a été rapportée mais non confirmée (Guy et al., 1987; Backer et al., 1991). Finalement, même si Nef n'est pas essentielle *in vitro*, il a été démontré que sa présence est nécessaire pour prolonger l'infection de SIV et induire la pathogénèse chez des macaques infectés, laissant supposer un rôle de Nef plus important pour la pathogénèse *in vivo* (Kestler et al., 1991).

#### **1.3.3.6 Le gène *vpr***

Le gène *vpr* (viral protein R) codant pour une protéine de 14 KDa et contenant 96 acides aminés est présent dans le génome de VIH-1, VIH-2 et la majorité des isolats de SIV (Cohen et al., 1990b; Subbramanian et al., 1994; Trono, 1995). De plus, le gène *vpx* présent chez VIH-2 et SIV<sub>mac</sub> proviendrait de la duplication ancestrale du gène *vpr* (Tristem et al., 1992). Ce dernier est un des gènes les mieux conservés parmi les gènes des virus d'immunodéficience de primates, suggérant une importance particulière des produits de ce gène pour certains aspects du cycle viral (Tristem et al., 1992; Lang et al., 1993). La protéine Vpr est codée à partir d'un ARNm mono-épissé et est accumulée tardivement au cours de l'infection (Haseltine, 1991). Il a aussi été démontré que Vpr est immunogène; 30 à 40% des individus infectés par le VIH ainsi que les singes infectés par SIV produisent des anticorps dirigés contre Vpr (Wong-Staal et al., 1987; Gras-Masse et al., 1990).

Plusieurs copies de cette petite protéine basique sont incorporées dans chaque virion, ce qui constitue une propriété inhabituelle pour un produit de

gènes auxiliaires, puisqu'aucun produit des 4 gènes auxiliaires connus de VIH-1, autre que *vpr*, n'est retrouvé associé aux particules virales (Cohen et al., 1990a). L'incorporation est réalisée grâce à l'association de Vpr au précurseur p55 de Gag au niveau du domaine p6 situé à l'extrémité C-terminal (Lu et al., 1993; Paxton et al., 1993). L'absence de ce domaine empêche l'incorporation de *vpr* dans les virions (Paxton et al., 1993), et sa présence est suffisante pour permettre l'association de Vpr avec des particules virales hétérologues qui n'incorporent pas Vpr normalement (Kondo et al., 1995). Il a été démontré que deux régions de p6 situées en N-terminal et C-terminal sont critiques pour l'incorporation de Vpr dans les virions (Checroune et al., 1995). L'incorporation n'est pas affectée par la présence de l'ARN génomique ou l'enveloppe (Paxton et al., 1993; Lavallée et al., 1994). Puisqu'aucune différence morphologique n'a été observée entre les virions *vpr*- et *vpr*+, Vpr n'agit pas en tant que protéine de structure impliquée dans l'intégrité du virion. Vpr pourrait être impliqué dans les étapes précoces de l'infection. Ainsi, Vpr est directement impliqué dans le transport nucléaire du complexe de préintégration dans les cellules post-mitotiques comme les macrophages (Heinzinger et al., 1994). Ce rôle de Vpr est partagé avec les protéines de la matrice (MA). Les souches de VIH-1 mutantes à la fois pour Vpr et MA ne peuvent plus infecter les macrophages de même que toutes cellules en phase d'arrêt de croissance. Ce phénomène est attribué à un blocage au niveau de la migration nucléaire (Heinzinger et al., 1994).

Dans les cellules infectées, Vpr se localise principalement au niveau du noyau. Le transport de Vpr au noyau est effectué par un mécanisme indépendant du signal de localisation nucléaire classique (Lu et al., 1993; Zhao et al., 1994a); Zhao et al., 1994b). Comme Vpr est une petite protéine, il serait possible que celle-ci passe au noyau de façon passive et qu'elle soit ensuite retenue grâce à

une interaction avec un composant nucléaire. On sait que la protéine Vpr purifiée peut se lier avec une protéine cellulaire appelée RIP (Vpr-interacting protein). L'interaction entre Vpr et RIP semble importante puisqu'une mutation effectuée dans un domaine riche en leucine/isoleucine de Vpr abolissant cette réaction rend Vpr très instable dans la cellule (Zhao et al., 1994a). *In vitro*, l'oligomérisation de Vpr se produit via son domaine N-terminal. Cette forme oligomérique d'un poids moléculaire supérieur à 100 KDa nécessite un transport actif jusqu'au noyau (Zhao et al., 1994b).

Par ailleurs, Vpr a plusieurs autres fonctions. Il a été démontré que Vpr active la transcription des LTRs de VIH ainsi que plusieurs autres promoteurs hétérologues, cellulaires ou viraux. En effet, dans des essais *in vitro* la transactivation de ces promoteurs est augmentée d'environ 3 fois pour les virus de type sauvage versus les virus Vpr-négatif. Le mécanisme par lequel Vpr entraîne l'augmentation de la production de protéines est inconnu (Cohen et al., 1990b). De plus, Vpr induit la différenciation cellulaire d'une lignée de cellules tumorales de rhabdomyosarcome humain (Levy et al., 1993). Ceci suggère l'implication de Vpr dans le processus de la différenciation des cellules infectées *in vivo*. Récemment, des études *in vitro* ont révélé qu'un virus de type sauvage, contrairement à un virus mutant pour le gène *vpr*, prévient l'établissement d'une infection chronique dans les lymphocytes T (Rogel et al., 1995). Il a été démontré que la prévention de l'établissement de l'infection chronique est due à un blocage en phase G<sub>2</sub> du cycle cellulaire des cellules exprimant Vpr (He et al., 1995; Re et al., 1995; Jowett et al., 1995). Ces études démontrent que la cycline kinase p34<sup>cdc2</sup>, impliquée dans le transit de la phase G<sub>2</sub> à M des cellules, est hyperphosphorylée dans les cellules HeLa qui expriment Vpr (He et al., 1995; Re et al., 1995). Cette hyperphosphorylation aurait pour effet d'inactiver la cycline

kinase p34<sup>cdc2</sup> et de ce fait elle préviendrait l'entrée en phase M de ces cellules (He et al., 1995; Jowett et al., 1995; Bartz et al., 1996). Cette fonction de Vpr semble être conservée chez d'autres lentivirus de primates des groupes HIV-2 et SIV (Planelles et al., 1996).

Il a aussi été démontré que Vpr est un régulateur positif de la réplication et des effets cytopathiques du virus (Cohen et al., 1990b; Ogawa et al., 1989; Westervelt et al., 1992; Balliet et al., 1994). Ces effets sont minimes dans les lignées lymphocytaires T et les cultures de lymphocytes T primaires pour un virus de type sauvage en comparaison à un virus Vpr-défectif (Balliet et al., 1994; Cohen et al., 1990b; Dedera et al., 1989; Ogawa et al., 1989). Un portrait tout à fait différent émerge des études effectuées avec des macrophages. En effet, Westervelt et al. (Westervelt et al., 1992) ont montré, en utilisant un génome proviral ayant la capacité d'infecter les macrophages, que Vpr et Vpu sont requis pour une infection productive dans ces cellules. Le groupe de Balliet et al. (Balliet et al., 1994) a aussi montré que la perte de Vpr ou Vpu pour un virus VIH-1 macrophage-tropique, limite la réplication de façon marquée dans ces cellules. L'usage d'oligonucléotides antisens dirigés contre Vpr supprime la réplication du VIH-1 dans les macrophages (Balotta et al., 1993). De plus, il a été rapporté que Vpr est essentiel pour la réplication de VIH-2 dans les macrophages primaires (Hattori et al., 1990). Ceci montre que Vpr pourrait être plus important dans certains types cellulaires que chez d'autres. Finalement, même si Vpr n'est pas indispensable à la réplication *in vitro*, son absence est plus marquée *in vivo*. Des études effectuées avec des singes rhésus infectés par une souche vpr- de SIV révertent à des cadres de lecture fonctionnels (Lang et al., 1993). Ces auteurs suggèrent l'importance particulière de Vpr pour la capacité de SIV à se répliquer et à établir une infection persistante chez les singes rhésus.

## 1.4 CYCLE DE REPLICATION DU VIRUS

Suite à l'entrée du virus dans la circulation sanguine, le virus reconnaît le récepteur membranaire CD4 auquel il se lie. Ce mécanisme préliminaire de reconnaissance virus-hôte permet ensuite la réplication en deux phases du virus, soit la phase précoce et la phase tardive.

### 1.4.1 Phase précoce

Le récepteur CD4 humain constitue le principal récepteur cellulaire pour le VIH. Il est abondant à la surface des lymphocytes T auxiliaires et on le retrouve à une plus faible concentration à la surface des monocytes-macrophages et des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes. Il a récemment été démontré que le VIH nécessite un co-récepteur à la surface des cellules cibles en plus du CD4. Ce co-récepteur varie dépendamment de la souche virale et du type cellulaire étudiés, mais tous font partis de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à la protéine G (Alkhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; Deng et al., 1996; Dragic et al., 1996; Feng et al., 1996). Les chémokines sont les ligands naturels de ces récepteurs. Un de ceux-ci, CCR5, agit comme co-récepteur pour les souches macrophages-tropiques n'ayant pas la capacité d'induire des syncytiums, alors que CXCR4 est un co-récepteur pour les souches de VIH-1 permettant la formation de syncytia.

En plus du CD4, on a rapporté la présence d'un récepteur de plus faible affinité, soit le récepteur glycolipidique galactosyl ceramide (Bhat et al., 1991; Harouse et al., 1991; Kolowski et al., 1991). Ce récepteur pourrait expliquer l'infection par le VIH-1 de certaines cellules dépourvues du récepteur CD4,



comme les cellules gliales et les cellules épithéliales (Castro et al., 1988). Après la liaison à la cellule hôte, VIH est internalisé soit par endocytose, soit par fusion avec la cellule et, très tôt après la fusion, le génome ARN et les enzymes virales sont relâchées dans le cytoplasme cellulaire (Maddon et al., 1986; Stein et al., 1987). Ensuite la transcriptase inverse synthétise, à partir du génome ARN, une molécule ADN double-brins bordée par les LTRs. Cette molécule est généralement détectable 4 heures après l'initiation de l'infection (Kim et al., 1989a). L'information génétique virale sous forme ADN, appelée complexe de préintégration est transportée à l'intérieur du noyau cellulaire et intégrée dans le matériel génétique de l'hôte grâce à l'enzyme virale intégrase. (Morrow et al., 1994; Greene, 1991; Haseltine, 1991) Suivant l'intégration, la réplication entre dans la phase tardive.

#### **1.4.2 Phase tardive**

La phase tardive débute avec la transcription du provirus. Cette initiation de la transcription s'effectue dans la région du LTR au niveau du promoteur (Jones et al., 1986; Morrow et al., 1994), et est contrôlé par différents facteurs de transcription cellulaire (Garcia et al., 1987; Jones et al., 1988). Cette population initiale de transcrits parvient au cytoplasme uniquement sous la forme de petits ARNm multi-épissés d'une longueur de 1,8 à 2,0 kb, qui sont traduits par la machinerie cellulaire pour donner les protéines virales de régulation: Tat, Rev et Nef (Cullen et al., 1989; Greene, 1991). La protéine Tat agit comme transactivatrice de l'expression et permet ainsi l'augmentation du niveau de la protéine Rev. Du même coup, le niveau d'ARNm non-épissés ou mono-épissés codant pour les protéines de structure du virus augmente. L'interaction de Rev avec le RRE est nécessaire pour promouvoir le transport de ces ARNm du noyau



jusqu'au cytoplasme (Felber et al., 1989; Pavlakis et al., 1990; Greene, 1990). La traduction de ces ARNm entraîne la production des enzymes virales nécessaires à l'assemblage du nucléoïde et les 2 brins d'ARN génomiques sont encapsidés grâce aux protéines Gag. Les particules virales complètes migrent à la membrane cellulaire et sont relarguées avec ou sans lyse de la cellule infectée par le processus de bourgeonnement. Les particules virales produites acquièrent ainsi leur enveloppe lipidique et peuvent maintenant infecter de nouvelles cellules hôtes pour compléter le cycle (Greene, 1991).

## **1.5 EVOLUTION DE LA MALADIE ET SYMPTÔMES CLINIQUES**

Le virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1), est le rétrovirus responsable du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) (Popovic et al., 1984). L'infection par ce virus entraîne chez les patients une dégénérescence progressive du système immunitaire (Klatzmann et al., 1984). De plus, on remarque dans la majorité des cas, une atteinte du système nerveux central accompagnée d'une perte significative des cellules neuronales et une dégénérescence des fonctions cognitives et psychomotrices (Wiley et al., 1991). L'infection par le VIH-1 se caractérise par 3 phases distinctes: la phase aiguë, la phase chronique sans symptômes cliniques apparents, et la phase de détérioration avancée.

La phase aiguë se manifeste peu de temps après l'infection et est d'une durée de quelques jours. Des symptômes similaires à ceux observés lors d'une mononucléose tels que la fièvre, des sueurs, maux de tête, une lymphadénopathie généralisée, des diarrhées ainsi que d'autres symptômes sont remarqués (Cooper et al., 1985). Durant cette période, on détecte une forte

concentration de virus dans le plasma qui, par la suite, diminue rapidement à un niveau très bas face à la réponse immunitaire de l'hôte. Cette réponse semble dominée par les lymphocytes T cytotoxiques qui tuent les cellules infectées (Baltimore, 1995).

Suite à la phase aiguë, une période d'infection chronique cliniquement asymptomatique s'installe et peut durer de 2 à plusieurs années. Chez certains patients, elle peut atteindre 10 à 15 ans (Baltimore, 1995). L'absence de symptôme durant cette période ne signifie pas l'absence de réplication. En effet, il a été démontré que pendant cette phase asymptomatique le niveau d'ARN viral dans le sang périphérique est plus bas mais reste tout de même détectable (Piatak et al., 1993; Winters et al., 1993; Bagnarelli et al., 1992). De plus, un haut niveau de réplication virale et de virus extracellulaires "trappés" ont été démontrés dans les tissus lymphoréticulaires (Fox et al., 1991; Pantaleo et al., 1993; Embretson et al., 1993). Pratiquement tous les patients infectés, indépendamment du stade clinique, ont une virémie plasmatique persistante, variant de  $10^2$  à  $10^7$  virions par ml (Piatak et al., 1993). Des études de cinétique virale utilisant des drogues potentiellement inhibitrices de la réplication virale ont démontré que la durée de vie des particules virales plasmatiques et des cellules productrices de virus est remarquablement courte. Et ce, indépendamment du décompte lymphocytaire. La majorité des virus plasmatiques circulants proviendrait non pas de cellules qui produisent du virus de façon chronique ou qui sont infectées de façon latente et ensuite activées, mais de cycles d'infection et de réplication virale impliquant de nouvelles cellules. (Ho et al., 1995; Wei et al., 1995)

Dans la dernière phase de la maladie, la perte progressive des lymphocytes T auxiliaires CD4 induit une immunodéficience (Gottlieb et al., 1981). C'est à ce moment qu'on remarque l'apparition des différents symptômes cliniques qui sont en relation directe avec l'infection par le VIH-1 ou le fruit d'infections virales ou bactériennes opportunistes entraînées par la défaillance du système immunitaire de l'hôte. La baisse des lymphocytes T CD4 est expliquée par plusieurs mécanismes. Le plus simple est l'effet cytopathique direct de VIH-1 dans les cellules infectées (Somasundaran et al., 1987; Hirsch et al., 1992). Ces cellules infectées peuvent aussi être éliminées par le système immunitaire humoral ou cellulaire de l'hôte. L'infection des précurseurs des lymphocytes T exprimant le CD4 entraîne aussi une immunodéficience (Fauci, 1988). De plus, la formation de syncytia entraînent la perte d'un grand nombre de cellules CD4+ non-infectées. Les syncytia sont de grosses cellules multinucléées formées par la fusion de cellules infectées exprimant les glycoprotéines de l'enveloppe à la surface cellulaire, et de cellules CD4 non-infectées (Klatzmann et al., 1984; Dalgeish et al., 1984; Klatzmann et al., 1986). Il a aussi été remarqué in vitro que l'expression de la glycoprotéine de l'enveloppe entraîne la mort cellulaire de ces cellules par apoptose (Laurent-Crawford et al., 1993). De plus, la gp120 peut être relarguée dans la circulation sanguine et s'attacher à des cellules CD4+ non-infectées et entraîner leur élimination par le système immunitaire (Schneider et al., 1986), ou bloquer l'interaction du CD4 avec le CMH classe II, et de ce fait inhiber la prolifération cellulaire (Chanh et al., 1988; Amadori et al., 1988).

### **1.5.1 Atteintes tissulaires spécifiques**

Les atteintes pathologiques observées chez le patient sidatique sont variées et affectent plusieurs organes dont la rate, le rein et le cerveau. Le

complexe de démence associé au SIDA (ADC) serait une conséquence directe de l'infection du cerveau par le VIH-1 (Price et al., 1988; Navia et al., 1986). Celui-ci se caractérise par bon nombre de manifestations cliniques, la perte de mémoire, des difficultés de concentration, des maux de têtes et des ralentissements psychomoteurs (Portegies, 1994). A l'autopsie on remarque une gliose, une perte neuronale, une infiltration par les cellules microgliales, les macrophages et les lymphocytes, une myélopathie vacuolaire et la présence de cellules multinucléées (Navia et al., 1986). De plus on remarque dans le cerveau des patients des infections opportunistes entraînant des troubles neuropathologiques (Feinman et al., 1988).

Comme il est facilement concevable, les autopsies effectuées chez les patients sidatiques en phase tardive d'infection révèlent un épuisement sévère des tissus lymphoïdes (Racz et al., 1990). On remarque une diminution marquée des lymphocytes dans la rate, le thymus et les ganglions lymphoïdes (Welch et al., 1984). Pour la rate, mis à part les nombreuses infections opportunistes et les cancers (Klatt et al., 1987), on observe de nombreux changements. Tout d'abord, l'aspect macroscopique révèle une splénomégalie variant de légère à modérée. Quant à l'étude microscopique, elle permet d'observer des changements variant suivant la progression de la maladie ou encore en fonction du nombre de lymphocytes T CD4 dans le sang périphérique. Dans les phases précoces de la maladie, on observe une hyperplasie des follicules avec un élargissement des centres germinaux et des zones marginales, le réseau de cellules dendritiques réticulaires est irrégulier, la population des lymphocytes T dans le manchon lymphocytaire périartériolaire est normale ou légèrement augmentée; des cellules plasmocytaires sont occasionnellement présentes. La réactivité pour la protéine S-100 de même que l'expression des inhibiteurs de protéase est augmentée. De

plus, on remarque une érythrophagocytose par des macrophages de la pulpe rouge avec sidérose dans certains cas et une hématopoïèse extramédullaire dans 10% des cas. Dans les phases tardives de la maladie, la rate perd sa structure initiale. On remarque une déplétion cellulaire importante avec rupture de la structure folliculaire et hyalinisation de ce qui était les centres germinaux, le réseau de cellules dendritiques réticulaires est détruit, des cellules multinucléées et plasmocytaires apparaissent et un grand nombre de macrophages montrent une augmentation de réaction à la protéine S-100. Le défaut de fonctionnement des macrophages est confirmé par la présence d'infections opportunistes particulières.(Falk et al., 1990; Falk et al., 1988)

Par ailleurs, on note chez certains patients l'apparition de différents cancers dont le sarcome de Kaposi et le lymphome (Mitsuyasu, 1987; Shiramizu et al., 1994), des diarrhées chroniques (Tepper et al., 1994), des défaillances rénales (Bourgoignie, 1990), des anomalies hématologiques (Scadden et al., 1989). Dans les infections opportunistes, on retrouve très fréquemment le protozoaire *Pneumocystis carinii* qui cause une pneumopathie et des manifestations systémiques pouvant atteindre n'importe quel organe (Feinman et al., 1988; Mills, 1986).

## **1.6 MODELES D'ETUDE DU VIH-1**

Bien que les modèles *in vitro* aient contribué à l'avancement de nos connaissances concernant le génome et les protéines virales, le tropisme cellulaire ainsi que la réplication du virus, ces modèles sont très limités. Ils ne peuvent refléter les différentes interactions du virus avec son hôte. De plus il est difficile, voire impossible, de travailler sur les humains pour étudier les atteintes

pathologiques dans les phases précoces de la maladie. Il devient donc important de développer des modèles permettant l'étude *in vivo* de l'infection virale pour comprendre la pathogénèse du SIDA, pour étudier l'effet de certains composants viraux dans le contexte d'un système immunitaire, pour le développement de drogues antivirales ou pour tester les vaccins assurant la protection contre le VIH-1.

Des modèles animaux ont donc dû être élaborés. Ainsi, différentes espèces de singes tels le chimpanzé et le gibbon ont été utilisés. Bien qu'ils soient susceptibles à l'infection par le VIH-1, aucun ne permet le développement des symptômes reliés au SIDA humain (Goudsmit et al., 1988; Mehtali et al., 1992). Seul les singes rhésus infectés par le SIV développent des symptômes similaires aux patients sidéens (Letvin et al., 1990). Toutefois leur usage comporte des limitations. Ils sont très coûteux et difficiles à reproduire. De plus leur disponibilité est restreinte.

Le lapin est lui aussi susceptible à une infection persistente de bas niveau par le VIH-1 (Filice et al., 1988; Kulaga et al., 1988); cependant aucune anomalie similaire à celles retrouvées avec le SIDA n'a été observée. De plus ces lapins ne génèrent pas de réponse immunologique antigène-spécifique (Mosier et al., 1993). Pour ces raisons, ce modèle présente un intérêt limité pour les études reliées au SIDA.

Devant l'absence de modèles animaux pour les études du VIH-1, il a fallu en générer un. Bien qu'imparfait, le modèle murin comporte plusieurs avantages. En effet, ce petit animal peu coûteux est facile à reproduire, on connaît bien son système immunitaire, il est génétiquement bien caractérisé et il possède une

physiologie qui s'apparente à celle de l'humain. Malheureusement, les souris ne font pas partie des hôtes susceptibles à l'infection par le VIH-1. Toutefois, il existe des technologies permettant l'utilisation de cet animal dans la recherche sur le VIH. Des souris souffrant d'une déficience immunitaire héréditaire sévère (SCID-hu) ont été reconstituées avec des cellules du système immunitaire humain ou injectées avec des cellules humaines infectées par le VIH (McCune et al., 1991). Ces souris permettent d'évaluer l'effet de certains vaccins ou de mimer certaines pathologies de patients infectés. L'utilisation des souris SCID comporte des limites importantes; le virus s'y propage rapidement tuant tous les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> humains (Mosier et al., 1993), et les changements apportés à ces souris ne peuvent être transmis génétiquement. Plus récemment, la possibilité de modifier génétiquement les souris a ouvert la porte à la création de modèles d'études sur mesure.

### **1.6.1 Le modèle de souris transgéniques**

Le second modèle de souris utilisé dans la recherche sur le VIH sont les souris transgéniques. Celles-ci permettent d'étudier l'effet de gènes uniques et leurs produits au cours du développement et de la vie adulte de l'animal. Comme le gène étudié est inséré dans le matériel génétique de l'hôte, celui-ci est transmis d'une génération à l'autre. La production de ces souris s'effectue par micro-injection du transgène dans le pronucleus des oeufs fertilisés qui continuent leur développement jusqu'à la formation d'un souriceau (Hogan et al., 1986). Les transgènes peuvent être construits sur mesure pour répondre aux besoins spécifiques de l'étude. Entre autres, les régions promotrices et les gènes peuvent être agencés à loisir pour en assurer l'expression, pour contrôler la spécificité tissulaire et le patron d'expression au cours du développement. Outre

la transmissibilité du transgène d'une génération à l'autre, ce modèle présente beaucoup d'autres avantages. Il comporte peu ou pas de biorisques. Il permet d'étudier l'effet d'un gène unique et les effets synergiques de plusieurs transgènes en croisant des souris porteuses de différents transgènes. Finalement, ce modèle permet l'obtention d'un large échantillonnage statistique.

Jusqu'à ce jour l'utilisation de souris transgéniques a permis de reproduire certaines manifestations cliniques observées chez les patients atteints du SIDA. Notamment, le génome proviral complet du VIH-1 a été micro-injecté. Une des lignées produites a permis d'obtenir des souris présentant des lymphadénopathies, une splénomégalie et l'infiltration des poumons. De plus, la production de particules virales infectieuses a été observée dans la rate, la peau et les ganglions lymphatiques (Leonard et al., 1988). Le génome proviral contenant des délétions a été utilisé pour produire des souris transgéniques. Un des modèles ainsi obtenus a montré l'apparition de cataracte (Iwakura et al., 1992), tandis qu'un autre contenant une délétion de *gag-pol* a développé un syndrome néphrotique sévère, une glomérulosclérose progressive ainsi que des lésions épidermiques prolifératives (Dickie et al., 1991; Kopp et al., 1992; Kopp et al., 1993). Lorsque la peau de ces souris est transplantée chez des souris congéniques normales, un rejet de greffe résulte et on observe des infiltrats monocytiques (Dumois et al., 1995). Le remplacement du promoteur du VIH par le promoteur fort MMTV spécifique pour les tissus mammaires a aussi été produit. Même si un haut niveau de protéines gp120, p55 et p24 a été retrouvé dans les glandes mammaires, il n'a pas été possible d'observer de phénotypes particuliers (Jolicoeur et al., 1992). Finalement, le génome du VIH a été mis sous le contrôle du promoteur du neurofilament humain NF-L afin de cibler l'expression du transgène dans le système nerveux central. Ces animaux développent un



syndrome neurologique caractérisé par une hypoactivité et une dégénérescence axonale des nerfs périphériques (Thomas et al., 1994). Il est intéressant de noter que des souris transgéniques exprimant le domaine extracellulaire du récepteur CD4 humain seul ou en conjonction avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 ne confère pas à la souris la susceptibilité à l'infection par le VIH-1 (Lorès et al., 1992).

La production de souris transgéniques avec le gène de structure gp120 a, quant à lui, permis d'obtenir un modèle pour étudier la neuropathologie du VIH-1. En dirigeant l'expression de la gp120 dans les astrocytes, il a été possible d'induire la vacuolisation des dendrites, une perte neuronale importante ainsi qu'une astrocytose réactive similaire à celle observée dans la pathologie humaine (Toggas et al., 1994). Un autre modèle a pu être dérivé dans notre laboratoire. Dans ce cas-ci, le transgène utilisé contient le gène *env* sous le contrôle du promoteur du gène de neurofilament léger humain (NF-L). Contrairement au modèle précédent, la gp 120 a pu être détectée par immunohistochimie dans plusieurs noyaux du tronc cérébral ainsi que dans la région 8 et 9 de la corne antérieure de la moëlle épinière. Les études neuropathologiques effectuées sur ces animaux ont révélé de nombreux gonflements dendritiques anormaux dans le noyau grêle et dans les faisceaux grêle et cunéiforme. De plus une astrocytose réactive a été observée dans plusieurs zones immunoréactives du S.N.C. (Berrada et al., 1995).

Outre les gènes de structure, la pathologie associée à certains gènes auxiliaires du VIH-1 a aussi été étudiée à l'aide de souris transgéniques. Des souris porteuses du gène *tat* placé sous le contrôle du LTR de VIH développent des lésions de la peau similaires au sarcome de Kaposi observé chez les

patients sidéens (Killian et al., 1988; Mehtali et al., 1992; Vogel et al., 1988), en plus de développer occasionnellement des cancers hépatiques (Vogel et al., 1991). L'expression du gène *tat* dirigé par le promoteur du virus polyome induit une prolifération des cellules endothéliales et la formation de tumeurs chez les animaux âgés de 15 à 22 mois (Corallini et al., 1993). Un autre modèle utilisant ce gène sous le contrôle du promoteur cellulaire de la protéolipoprotéine a été produit (Vellutini et al., 1995). L'expression du gène *tat* dans ce modèle induit une hyperplasie lymphoïde de la rate, des ganglions lymphatiques et des poumons. De nombreux promoteurs ont servi à diriger l'expression du gène *nef*, dont entre autre le promoteur CD2 et CD3, le promoteur MMTV et le LTR du VIH. Pour chacun, un tableau pathologique a pu être établi. Chez les souris CD2-*nef*, on observe une diminution du niveau des récepteurs CD4 à la surface des thymocytes doublement positifs (CD4/CD8) et une baisse du nombre de thymocytes CD4-positifs. Dans ce cas-ci, il semble que le CD4 subit une séquestration intracellulaire et il a été localisé dans le Golgi et non dans le réticulum endoplasmique (Brady et al., 1993). Des résultats similaires ont été obtenus avec les souris CD3-*nef*. De plus, une hausse très importante du niveau de prolifération et d'activation des thymocytes suivant une stimulation polyclonale via le récepteur cellulaire T a été observée (Skowronski et al., 1993). Lorsque *nef* est sous le contrôle d'un promoteur spécifique aux lymphocytes T, il s'ensuit l'induction d'une immunodéficience sévère et, chez certains animaux âgés, on note le développement de lymphadénopathies ainsi qu'une splénomégalie (Lindemann et al., 1994). Les animaux porteurs d'un transgène composé du LTR de VIH-1 et du gène *nef* montre une expression limitée exclusivement à la peau. L'expression entraîne la production de lésions ressemblant aux papillomes (Dickie et al., 1993). Ces lésions sont parfois accompagnées par une ulcération progressive des couches cellulaires épidermiques. Chez les souris MMTV-*nef*, la

protéine a été détectée dans les organes mammaires sans pourtant présenter d'atteintes pathologiques (Dickie et al., 1993).

Outre les études cytopathologiques, d'autres groupes se sont concentrés sur la compréhension des mécanismes d'activation transcriptionnelle du LTR du VIH-1. La production de souris transgéniques avec un gène rapporteur tel que le gène bactérien chloramphénicol transférase (CAT) ou l' $\alpha$ -1 antitrypsine humaine dont l'expression est contrôlée par le LTR du VIH, a démontré que le LTR est fonctionnel et transactivable chez ces souris et que des niveaux supérieurs peuvent être obtenus en croisant ces souris avec des souris transgéniques exprimant le gène transactivateur *tat* (Khillan et al., 1988; Mehtali et al., 1992). De plus, les LTRs du VIH sont transactivables par les radiations UV-B et UV-C (Vogel et al., 1992; Frucht et al., 1991). Finalement, certaines souches de VIH dérivées du système nerveux central, ont des LTRs capables d'assurer leur expression dans les tissus nerveux alors que ceux de la souche tropique pour les cellules T en sont incapables (Corboy et al., 1992; Leonard et al., 1988; Vogel et al., 1992; Mehtali et al., 1992).

## 1.7 OBJECTIFS

Les différents exemples de souris transgéniques énumérées plus haut nous montrent que ce modèle d'étude *in vivo* est d'une grande utilité pour l'étude des différents aspects de la pathogénèse reliée au VIH-1, pour étudier l'effet de gène unique ou de partie du génome viral dans le contexte d'un système immunitaire fonctionnel. Jusqu'à ce jour, aucune publication n'a encore décrit l'utilisation de modèles de souris transgéniques porteuses des gènes uniques *vpr*, *vpu*, *vif* et *rev*. Ces gènes, dont la fonction est plus ou moins bien connue,

semblent être impliqués dans la physiopathogénèse du VIH-1. Notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement aux effets pathologiques possibles associés aux gènes *vpu*, *vpr* et *nef*. Durant mes études de maîtrise, mon projet de recherche a consisté à produire des souris transgéniques porteuses du gène *vpr* et à en évaluer les effets pathologiques.

Pour ce faire, 2 approches ont été privilégiées. La première a consisté à produire l'expression du gène *vpr* dans le plus grand nombre d'organes, alors que la deuxième visait l'expression dans le système immunitaire. Nous avons donc généré des transgènes composés du gène *vpr* de la souche ELI (Alizon et al., 1986) sous le contrôle du promoteur RSV ou du promoteur SL3. Ce dernier, constitué du LTR du virus murin SL3-3, a permis l'obtention de 5 animaux fondateurs porteurs du transgène. Aucun de ceux-ci n'a permis l'établissement d'une lignée. Pour cette raison, aucune étude subséquente n'a pu être effectuée et nous n'avons donc pas pu analyser les effets de *vpr* avec ce promoteur.

Le promoteur RSV est constitué du LTR ubiquitaire du virus du sarcome de Rous. Celui-ci est reconnu comme étant un promoteur fort dans les cellules eukaryotes (Gorman et al., 1982). Plusieurs lignées de souris transgéniques ont été obtenues avec ce promoteur et 3 de celles-ci ont été retenues pour analyse. La descendance de ces fondateurs nous a ensuite permis d'effectuer des investigations anatomo-pathologiques sur une population de souris statistiquement significative provenant des 3 lignées différentes.

Ces investigations ont révélé des atteintes des organes lymphoïdes se traduisant par une hyperplasie lymphoïde de la pulpe blanche. Cette hyperplasie varie de légère à importante suivant la lignée et l'âge de la souris étudiée. Dans

certains cas, les ganglions mésentériques ont été étudiés et ils ont révélé eux aussi une hyperplasie lymphoïde. Des analyses plus approfondies de ces rates nous ont démontré une augmentation des lymphocytes B et une stimulation des macrophages alors que la population des lymphocytes T est normale ou légèrement abaissée.

Ces modifications de la rate ressemblent étonnamment à celles observées chez les patients porteurs du VIH-1 dans les phases précoces de la maladie. De plus, comme il a été mentionné précédemment, les macrophages démontrent chez les patients des défauts de fonctionnement et *vpr* paraît être très important, sinon essentiel, pour la réplication virale dans ce type cellulaire. La population macrophagique porte donc pour nous un intérêt particulier puisque l'augmentation de celle-ci dans la rate des souris proteuses du gène *vpr* est relativement importante dans chacune des lignées.

En plus des investigations pathologiques, nous avons tenté d'étudier l'expression de la protéine et des ARNm de Vpr. La protéine n'a pas pu être détecté par immunohistochimie. Par ailleurs, nous avons déterminé le patron d'expression des ARNm pour les 3 lignées étudiées. Cette étude révèle l'expression de *vpr* dans différents organes dépendamment de la lignée étudiée.

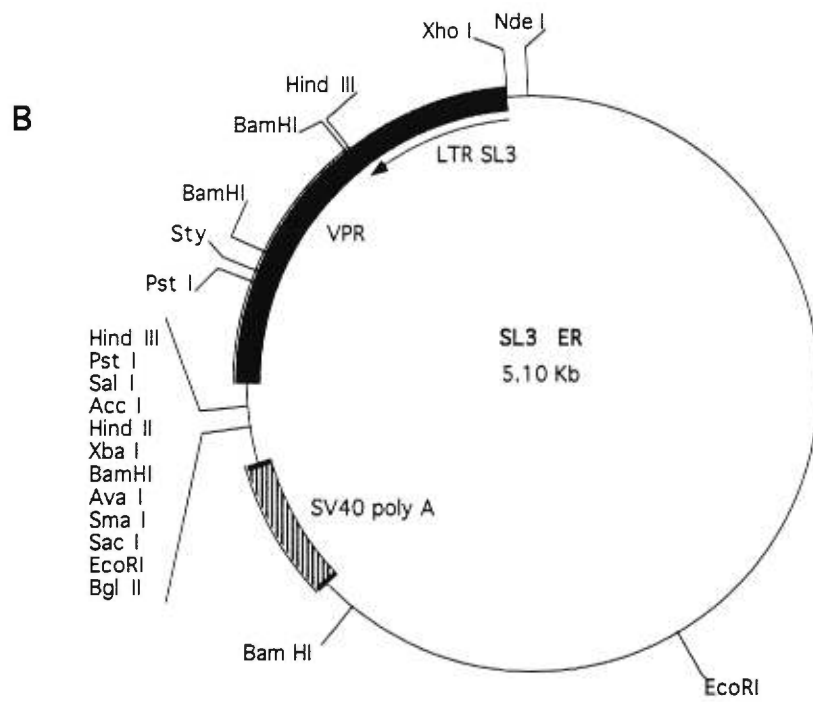
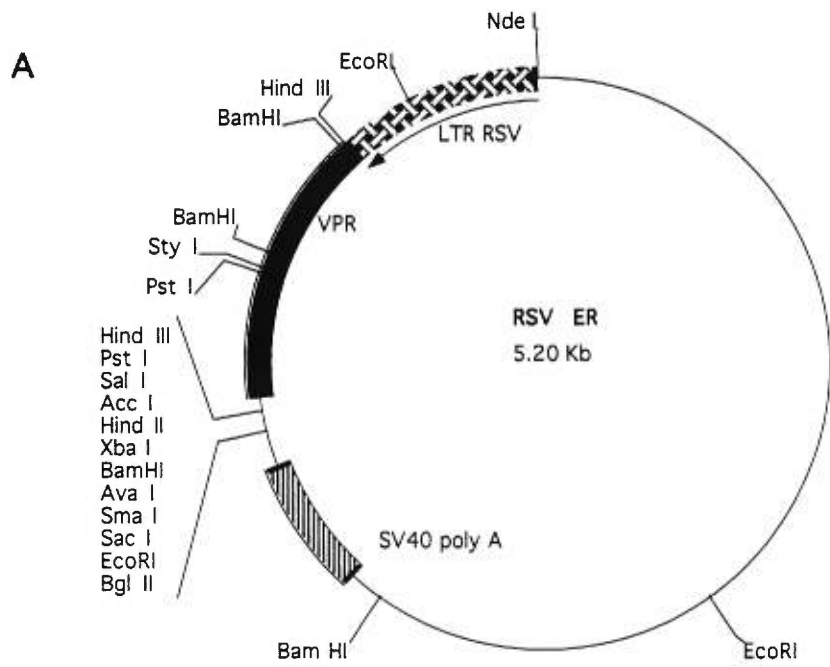
## **2. MATÉRIELS ET MÉTHODES**

### **2.1 PLASMIDES**

Le plasmide RSV-ER (gracieusement offert par Dr. Eric Cohen) contient le gène *vpr* de la souche ELI du VIH-1 (Alizon et al., 1986) placé sous le contrôle du LTR du virus du sarcome de rous (RSV) (Gorman et al., 1982) ainsi que le signal de polyadénylation de SV40 (figure 2a). Pour permettre la séparation du transgène des séquences plasmidiques, le site Bam HI situé à l'extrémité 3' du site de polyadénylation a dû être changé en un site unique Xho I. Pour ce faire, le plasmide RSV-ER a été digéré par les enzymes de restriction Sac I/Nde I, ce qui a généré deux fragments de 1.4 kb et 3.8 kb. Ce dernier contient le site Bam HI devant être modifié. Ce fragment a été ligué à un plasmide pUC-18 ouvert par les mêmes enzymes. La réaction de ligation a été effectuée dans un volume final de 20 µl contenant une unité de ligase (BRL), 25 à 100 ng de chacun des fragments, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT et 5% polyéthylène glycol-8000 dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 7.6. Le tout a été incubé à 14°C pour 16 heures. Une partie du volume de ligation a été utilisée pour la transformation dans des bactéries compétentes qui ont ensuite été étalées sur pétri pour l'isolement de différentes colonies. Les colonies isolées ont été testées pour vérifier la présence du plasmide d'intérêt par la micro-méthode d'extraction d'ADN plasmidique. La construction intermédiaire ainsi obtenue, constituée du plasmide pUC-18 contenant un fragment de RSV-ER, a été digérée par Bam HI et traitée par la Klenow pour rendre les extrémités franches pour introduire un adaptateur Xho I. Après transformation, un clone a été isolé (clone B). Du clone B, un fragment

**Figure 2a** : Représentation schématique du plasmide RSV-ER. Les sites de restrictions uniques Nde I et Sac I ont été utilisés pour séparer la séquence plasmidique contenant le site Bam HI à modifier (situé à l'extrémité 3' du site de polyadénylation).

**Figure 2b** : Représentation schématique du plasmide SL3-ER. De la même façon que pour RSV-ER, les sites de restrictions Nde I et Sac I ont permis de libérer le fragment contenant le site Bam HI devant être modifié.





Nde I-Sac I de 3,8 kb a été isolé puis ligué avec l'autre fragment Nde I-Sac I de 1,4 kb du plasmide original RSV-ER. Cette nouvelle construction plasmidique a été appelée R-ER. De ce clone un transgène de 2,1 kb a pu être isolé par une digestion Nde I /Xho I. (figure 3a)

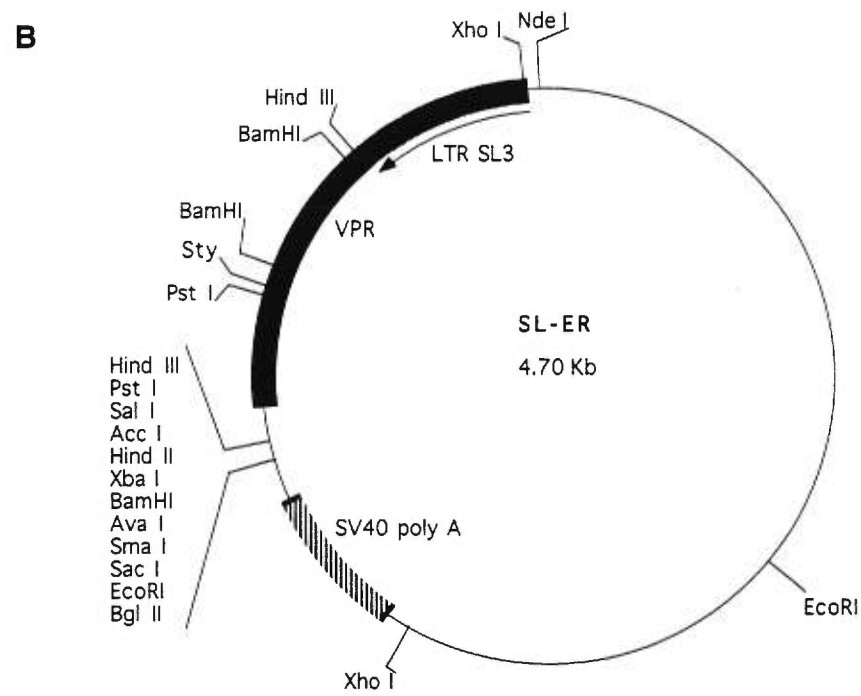
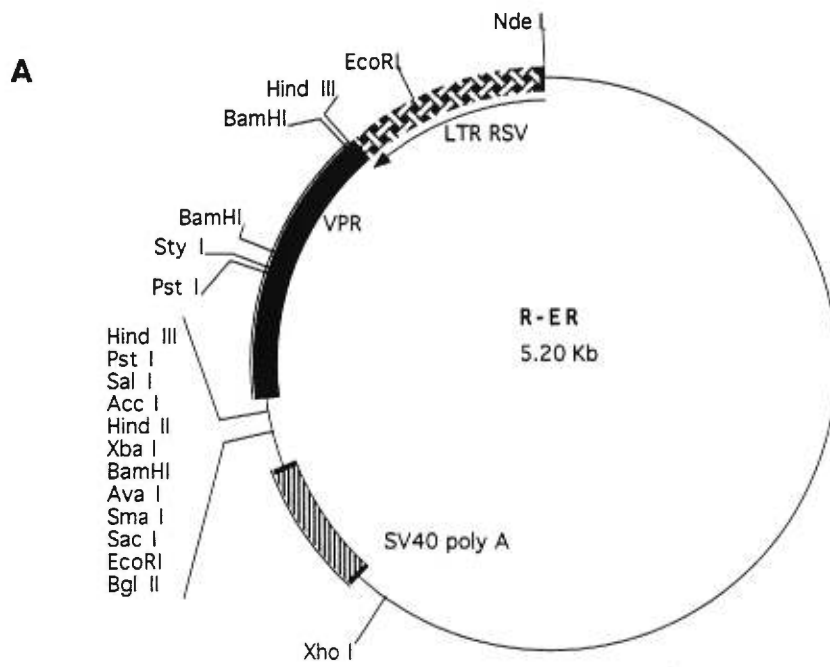
De la même façon que pour RSV-ER, nous avons effectué un changement de site dans la construction originale SL3-ER (gracieusement offert par Dr. Eric Cohen) ( figure 2b). Le plasmide SL-ER a été obtenu permettant la délétion du transgène de 1,9 kb par une digestion Xho I. (figure 3b)

### **2.1.1 Transformation bactérienne**

L'ADN des constructions plasmidiques a été introduit dans des bactéries compétentes *E. Coli* DH5 $\alpha$ F' (Gibco BRL). Pour effectuer la transformation, les bactéries ont été décongelées sur glace puis mises en contact avec l'ADN à raison de 10 pg à 5 ng pour 100  $\mu$ l de bactéries puis incubées 30 minutes sur la glace. Les tubes ont ensuite été placés dans un bain-marie à 42°C pour 90 secondes. Cette incubation a été immédiatement suivie par un choc thermique à 4°C pour une durée de 2 minutes. Un volume de 400  $\mu$ l de milieu de culture L-broth composé de 10 g bacto-tryptone/L, 5 g bacto-yeast extract/L et 10 g NaCl pH 7.0/L, a été ajouté aux bactéries avant d'être incubées à 37°C durant une heure avec agitation constante (250 rpm). Les bactéries ont été étalées sur un milieu agar L-Broth contenant 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline comme agent de sélection. Les pétris ont été incubés à 37°C pendant une nuit et les colonies isolées ont été prélevées dans le but d'être testées pour la présence des plasmides d'intérêt par la micro méthode d'extraction d'ADN plasmidique.

**Figure 3a :** Représentation schématique du plasmide R-ER. Celui-ci contient le gène *vpr* sous le contrôle du promoteur RSV. Les sites de restrictions Nde I et Xho I ont permis de séparer le transgène de 2,1 Kb des séquences plasmidiques.

**Figure 3b :** Représentation schématique du plasmide SL-ER. Dans ce plasmide, le gène *vpr* est sous le contrôle du promoteur SL3. Les deux sites de restrictions Xho I ont été utilisés pour libérer le transgène de 1,9 Kb.



### 2.1.2 Micro-méthode d'extraction plasmidique

La micro-méthode d'extraction d'ADN plasmidique utilisée est celle proposée par Birnboim et Doly (Birnboim et al., 1979). Les colonies ont été ensemencées dans 2 ml de milieu Terrific broth, composé de 12 g bacto-tryptone/L, 24 g extrait bacto levure/L, 4 ml glycerol/L, 0,17 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et 0,72 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , et incubées 16 heures à 37°C avec agitation constante (250 rpm). Un aliquot de 1,5 ml de cette culture a été transféré dans un tube eppendorf et centrifugé à 12 000 rpm pour 1 minute. Le culot a été solubilisé dans 100  $\mu\text{l}$  d'une solution de glucose contenant 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 et 10 mM EDTA, et incubé 5 minutes à la température ambiante. Un volume de 200  $\mu\text{l}$  d'une solution alcaline fraîchement préparée avec 0,2 N NaOH et 1% SDS a été ajouté et les tubes ont été mélangés par inversion puis laissés sur glace pour 5 minutes. Un volume de 150  $\mu\text{l}$  de solution d'acétate de potassium (concentrations finales de 3M potassium et 5M acétate) a ensuite été ajouté à ces tubes et ces derniers ont été mélangés par inversion et incubés 5 minutes sur glace. Après centrifugation à 12 000 rpm pour 5 minutes à 4°C, le surnageant a été récupéré dans un nouveau tube et extrait en ajoutant un volume d'une solution 1:1 phénol/chloroforme avant d'être recentrifugé 5 minutes à 12 000 rpm. L'ADN a par la suite été précipité en ajoutant un volume d'isopropanol à la phase aqueuse. Pour récupérer les culots, les tubes ont été centrifugés 5 minutes à 12 000 rpm et le surnageant a été retiré. Les culots d'ADN ont finalement été lavés avec de l'éthanol 70% et resuspendus dans 50  $\mu\text{l}$  de tampon TE ( Tris-HCl 10 mM pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0 ) contenant 50  $\mu\text{g/ml}$  de RNase A (Boeringher Mannheim Canada). Les tubes ont été incubés à la température ambiante quelques minutes pour permettre l'activité de la RNase A qui permet l'élimination de la majeure partie de l'ARN présent dans les préparations d'ADN plasmidique.

### 2.1.3 Maxi-préparation

L'ADN plasmidique a été préparé en grande quantité par la méthode de maxi-préparation avec lyse alcaline telle que décrite par Maniatis (Sambrook et al., 1989) suivie d'une ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium. Pour cela, les bactéries ont tout d'abord étéensemencées dans 500 ml de milieu Terrific-broth et incubées 16 heures à 37°C avec agitation constante. Cette culture bactérienne a été centrifugée à 4000 rpm pour 15 minutes à 4°C, et le culot a été repris dans 100 ml de STE (0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) avant d'être centrifugé à nouveau selon les mêmes conditions. Le culot obtenu a été resuspendu dans 10 ml de solution de glucose et 1 ml de solution fraîchement préparée contenant 10 mg de lysozyme et 10 mM Tris-HCl pH 8.0 a été ajouté. Une incubation de 10 minutes sur glace a suivi et 1 ml d'une solution alcaline fraîchement préparée, composée de 0,2 N NaOH et 1% SDS, a été ajouté. Le tout a été mélangé par inversion et incubé à température ambiante 5 à 10 minutes. Un volume de 10 ml de solution d'acétate de potassium (3 M potassium, 5 M acétate) a été ajouté avant d'être bien mélangé. Le lysat bactérien obtenu a été centrifugé à 5000 rpm pendant 15 minutes à 4°C et le surnageant a été filtré à l'aide de gaze stérile. L'ADN contenu dans le filtrat a été précipité avec 0,6 volume d'isopropanol. Le tout a été bien mélangé et incubé 10 minutes à température ambiante. L'ADN a ensuite été récupéré par centrifugation à 5000 rpm pour 15 minutes à température ambiante. Le surnageant a été décanté et le culot rincé avec de l'éthanol 70% (température ambiante). Après avoir laissé l'éthanol s'évaporer, le culot a été resuspendu dans 4 ml de TE pH 8.0.

Pour la purification de l'ADN, 3,7 g de chlorure de césium et 40 µl de bromure d'éthidium (EtBr) ont été ajoutés aux 4 ml de TE contenant l'ADN, avant d'être centrifugé à l'aide d'un rotor SW 55 pour une durée de 36 à 48 heures à 40 000 rpm dans une ultracentrifugeuse (Beckman L8-80). La bande d'ADN colorée à l'EtBr a été récupérée et extraite 4 à 5 fois avec un volume égal de butanol, jusqu'à l'élimination complète du bromure d'éthidium. Finalement, l'ADN a été placé dans des membranes à dialyse (BRL) et dialysé dans 4 litres d'une solution de TE pH 8.0 à température ambiante. Cette solution a été changée une fois, 4 heures après le début de la dialyse.

## 2.2 PRÉPARATION DU TRANSGÈNE

Après digestion complète des plasmides avec les enzymes Nde I-Xho I pour R-ER et Xho I pour SL-ER, les échantillons ont été déposés sur gel d'agarose de 0,7 ou de 1,0% dans du tampon TAE 1X contenant 0,04 M Tris-acétate pH 8.0 et 0,001 M EDTA, additionné de 0,8 µg/ml de bromure d'éthidium. Après migration électrophorétique à 60 volts pour une durée de 50 à 120 minutes, les bandes d'ADN d'un poids moléculaire de 2,1 kb et 1,9 kb pour R-ER et SL-ER respectivement ont été découpées à l'aide d'un scalpel. Les fragments de gel recueillis ont subi un cycle de congélation/décongélation dans l'azote liquide suivi d'une incubation au bain-marie à 37°C. Ces bandes ont ensuite été déposées dans une colonne de fibre de verre constituée d'un eppendorf (0,5ml) dont le fond a été préalablement percé par une aiguille et rempli jusqu'à la moitié de fibre de verre stérile compacte. La colonne a ensuite été placée dans un grand eppendorf (1,5 ml) et centrifugée à 12000 rpm pour une durée de 10 minutes à 4°C. La colonne a été lavée avec environ 100 µl de tampon TE puis centrifugée comme ci-haut. L'ADN contenu dans la phase aqueuse a été extrait

successivement avec du phénol/chloroforme (1/1) et du chloroforme avant d'être précipité avec 2,5 volume d'éthanol et 1/10 de volume d'acétate d'ammonium. Après une centrifugation à 12000 rpm pendant 30 minutes à température ambiante, le surnageant a été éliminé et le culot obtenu a été lavé avec de l'éthanol 70 %. Ce culot d'ADN a finalement été solubilisé dans un volume approprié d'H<sub>2</sub>O stérile.

## **2.3 PRODUCTION DE SOURIS TRANSGÉNIQUES**

La micro-injection et l'identification des souris transgéniques hémizygotés ont été effectuées dans le laboratoire du docteur Jean-Pierre Julien à l'Hôpital Général de Montréal. Brièvement, les transgènes purifiés tel que décrit précédemment ont été microinjectés dans les pronuclei mâles d'embryons de souris C57BL/6J X B6C3F à une concentration de 1 à 4 µg/ml. Les embryons ont ensuite été réimplantés dans l'oviducte de souris ICR (Brinster et al., 1981). Trois semaines après la naissance, les animaux ont été testés pour vérifier la présence du transgène par hybridation sur filtre de type Southern.

### **2.3.1 Extraction de l'ADN génomique de souris**

Pour déterminer la présence du transgène chez les souris, un échantillon de queue a été prélevé et utilisé pour en extraire l'ADN génomique. Les queues ont donc été digérées en les incubant 5 à 12 heures à 55°C sous agitation constante dans un tampon contenant 10 mM Tris pH 8.0, 2 mM EDTA, 400 mM NaCl et 1 % SDS, et additionné de 400 µg/ml de protéinase K (Boehringer Mannheim). Après cette incubation, les protéines résiduelles ont été extraites en ajoutant 1 volume d'une solution de phénol, chloroforme, alcool isoamyl (25:24:1).

Le tout a par la suite été vortexé et centrifugé à 12000 rpm pour 5 minutes. L'ADN génomique contenu dans la phase aqueuse récupérée, a été précipité en lui ajoutant 2,5 volumes d'éthanol et 1/10 volume d'acétate de sodium. Après précipitation de l'ADN, les tubes ont été centrifugés à 12 000 rpm pour 30 minutes. Le culot a été lavé avec de l'éthanol 70% et solubilisé dans un volume adéquat de TE avant d'être dosé par densité optique au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 260 nm. L'ADN ainsi obtenu a été utilisé pour les analyses par hybridation sur filtre de type Southern.

### **2.3.2 Hybridation sur filtre de type southern.**

Pour chaque échantillon, une quantité de 15 µg d'ADN génomique a été digéré avec l'enzyme de restriction Bgl II (Pharmacia) pour une période minimale de 5 heures, à raison de 3 unités d'enzyme par µg d'ADN dans les conditions proposées par le fournisseur d'enzyme. Après digestion, les échantillons sont soumis à une migration électrophorétique sur gel d'agarose 0,7 % à 100 volts pour une durée variant de 2 à 4 heures. Le gel a ensuite été dénaturé et neutralisé en le trempant 2 fois 15 minutes avec agitation pour chaque étape, dans des solutions composées respectivement de 1.0 M NaCl / 0.5 M NaOH (dénaturation) et 0.5 M Tris-HCl pH 7.4 / 1,5 M NaCl (neutralisation). L'ADN a été transféré, par capillarité, du gel à une membrane de Nytran 0.22 µm (Schleicher & Schuell) toute la nuit dans un tampon SSPE 10 X contenant 3 M NaCl, 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O et 0.02 M EDTA. La membrane a par la suite été cuite 30 minutes à 70°C pour fixer l'ADN. La préhybridation et l'hybridation de la membrane ont été effectuées à 42 °C dans un four à hybridation (Bellco) pour des durées respectives de 2 à 6 heures et de 15 à 20 heures. La solution de préhybridation contenait 6X SSPE, 10X de solution Denhardt's, 0,5% SDS et 50 µg/ml d'ADN de



sperme de saumon fragmenté et dénaturé alors que la solution d'hybridation était composé de 6X SSPE, 1.0% SDS, 50% formamide pH 7.4, 50 µg/ml ADN de sperme de saumon fragmenté et dénaturé, 10% Dextran sulfate ainsi que  $5 \times 10^6$  cpm de sonde dénaturée. Cette dernière est composé du fragment plasmidique utilisé comme transgène marquée au dCTP- $\alpha$   $^{32}\text{P}$  par la méthode de "nick-translation" en utilisant la trousse BRL selon les recommandations de la compagnie. Les membranes hybridées ont ensuite subi 2 lavages de 15 minutes avec une solution contenant 6X SSPE et 0.5% SDS et un lavage de 15 minutes dans une solution contenant 1X SSPE et 1.0% SDS à la température ambiante. Les membranes lavées ont été exposées avec un film X-OMAT AR (Kodak) durant 24 à 80 heures à -80 °C avec un écran permettant l'amplification du signal.

## **2.4 ÉTUDES ANATOMO-PATHOLOGIQUES**

Comme nous n'avions aucun indice d'atteinte particulière, une évaluation anatomo-pathologique a été effectuée sur tous les organes des souris transgéniques ainsi que sur plusieurs souris contrôles.

### **2.4.1 Prélèvement des organes**

Les animaux ont tout d'abord été anesthésiés par injection intrapéritonéale d'une dose létale (3 ml/2,27 kg) de pentobarbital sodique (Somnotol, 65 mg/ml). Les organes ont été prélevés et une partie de ceux-ci a été fixée par immersion dans une solution de formaline 10 % pour une période variant de 24 à 48 heures, tandis que l'autre partie a été directement congelée et conservée à -80°C.

### 2.4.2 Coupes et coloration des tissus

Pour faire les colorations histologiques, les organes ont été déshydratés par immersion dans des bains successifs d'alcool 70, 80 et 95% pendant 30 minutes chacun à température ambiante et 3 fois dans l'alcool 100% pour des durées respectives de 45, 45 et 60 minutes à 35°C. Les organes ont par la suite été traités par immersion dans 3 bains de toluène pour 30, 45 et 60 minutes à 35°C avant d'être inclus dans la paraffine. Pour l'inclusion, les organes sont immergés dans des bains de paraffine à des concentrations de 45 et 50% pour 45 minutes chacun et 2 fois 60% pour 60 minutes à une température de 60°C. Les organes ainsi inclus ont été sectionnés au microtome en coupes de 5 µm d'épaisseur et ces coupes ont ensuite été montées sur des lames gélatinées ou Superfrost (Fischer). Après avoir été déparaffinées, les coupes ont été réhydratées puis colorées à l'hématoxyline-phloxine-safran ( HPS ). Pour la coloration, les lames ont été immergées 2 fois 3 minutes dans du toluène, 2 minutes pour chacun des bains d'alcool: 100, 95 et 85% et rincées à l'eau courante 2 minutes. Par la suite, les lames ont été trempées dans l'hématoxyline 2 minutes, rincées 15 secondes avec de l'eau courante, trempées dans l'alcool 100% contenant 1% HCl 5 secondes et rincées de nouveau à l'eau courante 4 minutes. Elles ont ensuite été trempées dans la phloxine 45 secondes, rincées dans l'eau courante une minute, immergées 3 fois dans des bains d'alcool 100% pour une durée de 30 secondes chacune, trempées dans le Safran 3 minutes, immergées 3 fois dans l'alcool 100% 30 secondes à chaque fois et 3 fois dans des bains de toluène pendant 30 secondes à chaque fois.

Certaines coupes ont été colorées par la technique de coloration Perls. Pour cela, les coupes ont été immergées à raison de 2 minutes pour chaque

bain: 2 fois dans du xylène, 2 fois dans l'alcool 100% et 2 fois dans l'alcool 95%. Les coupes ont ensuite été rincées dans l'eau distillée, trempées dans une solution de ferrocyanide de potassium 10% pour 5 minutes et dans une solution 7% ferrocyanide de potassium - 3% acide chlorhydrique pour 20 minutes. Par la suite, elles ont été rincées de nouveau dans l'eau distillée, trempées dans une solution de rouge nucléaire rapide pour 5 minutes, rincées à l'eau courante, déshydratées dans 3 bains d'alcool 95% et 3 bains d'alcool 100% et finalement clarifiées dans 3 bains de xylène pour 30 secondes à chaque fois.

## **2.5 IMMUNOHISTOCHIMIE**

L'immunohistochimie a été utilisée pour détecter la protéine Vpr et pour caractériser les différentes populations cellulaires des rates de souris transgéniques. Pour cela, les tissus prélevés ont directement été immergés dans l'isopentane (méthyl-2 butane) contenant de la glace sèche jusqu'à congélation complète puis ils ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les tissus congelés ont été sectionnés en coupes de 6-8  $\mu\text{m}$  à l'aide d'un cryostat (Leica) à une température de -20°C. Les coupes récupérées sur lames Superfrost, ont servi pour l'étude de l'expression de la protéine Vpr ainsi que certains autres marqueurs par des techniques d'immunohistochimie.

### **2.5.1 Réactions immunohistochimiques**

Les coupes ont tout d'abord été fixées 15 à 30 minutes par immersion dans de l'acétone à -20°C, puis séchées à température ambiante. Après lavage dans du TBS (Tris 25 mM, KCl 2,7 mM, NaCl 137 mM, pH 7.6), elles ont été incubées 30 minutes à la température ambiante dans le tampon A ( 5% sérum

normal de chèvre, 0,5% albumine sérique de boeuf) pour saturer les sites non-spécifiques. Cette première solution est remplacée par le tampon A additionné de l'anticorps de lapin dirigé contre la protéine Vpr (R.37, Biocan) à une dilution 1/500 ou 1/2000 et incubées 2 heures à température ambiante ou placées à 4°C pour 12 à 20 heures. Les lames ont par la suite été lavées 3 fois 10 minutes dans du TBS puis incubées pendant une heure avec un anticorps secondaire de chèvre composé d'un anti-IgG de lapin soit biotinylé, soit couplé à la fluorescéine et dilué dans du TBS. Après 3 lavages de 10 minutes dans du TBS, les lames incubées avec l'anti-IgG de lapin biotinylé ont été incubées dans du PBS contenant de l'avidine couplée à la phosphatase alcaline durant une heure à la température ambiante selon le protocole proposé par le manufacturier (Vectastain). Les lames ont été lavées puis révélées de 20 à 30 minutes dans l'obscurité dans une solution de rouge de Fuschin (Dako). Après montage entre lames et lamelles, les lames ont été examinées au microscope photonique. Les coupes traitées avec l'anti-IgG de lapin conjuguée à la fluorescéine ont été montées dans le milieu de montage Vectashield et examinées au microscope à fluorescence.

### **2.5.2 Immunohistochimie pour marqueurs lymphoïdes et macrophagiques**

Afin de caractériser les différentes populations lymphoïdes et macrophagiques des souris transgéniques, les anticorps spécifiques suivants ont été utilisés sur des coupes de rates. Pour les lymphocytes T CD4+, l'anticorps monoclonal anti-L3T4/CD4 (Boehringer Mannheim) provenant de cellules hybrides rat-souris a été utilisé à une dilution 1/400. L'anticorps monoclonal anti-Ly-2 (LyT-2, CD8a) (Boehringer Mannheim) spécifique des cellules T CD8+, provenant de cellules hybrides rat-souris, a été utilisé à une dilution 1/400.

L'anticorps monoclonal anti-CD45R/B220 (Pharmingen) spécifique des lymphocytes B, provenant du rat, a été dilué à 1/200 pour la réaction. L'anticorps monoclonal anti-F4/80 (Serotec) spécifique aux macrophages, provenant du rat, a été utilisé à une dilution 1/20. Le traitement des coupes, la méthode de marquage et la méthode de révélation (avidine couplée à la phosphatase alcaline) sont les mêmes que précédemment décrits pour l'anticorps anti-Vpr à l'exception de l'anticorps secondaire qui cette fois-ci est un anticorps biotinylé de lapin anti-IgG de rat utilisé à une dilution 1/100 (Vector laboratories).

## **2.6 CYTOFLUOROMÉTRIE SUR CELLULES DE RATES**

Les populations cellulaires provenant de rates de souris transgéniques et de souris contrôles ont été analysées par cytométrie de flux dans le but de quantifier les populations lymphocytaires et macrophagiques. Après sacrifice, les rates ont été prélevées et déposées individuellement dans des tubes de 5 ml contenant environ 1 ml de milieu RPMI. Les rates ont par la suite été triturées à l'aide de pinces dans 1 ml de milieu RPMI (Gibco BRL) pour en libérer les cellules. La suspension cellulaire a été mise dans un tube de 15 ml et le volume a été complété à 5-10 ml avec du milieu RPMI. Ces tubes ont été centrifugés à 1200 rpm pour 10 minutes. Le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire a subi un choc osmotique en y ajoutant 2 ml H<sub>2</sub>O et en vortexant 10 secondes. Cette étape est essentielle pour l'élimination des globules rouges. Tout de suite après ce choc osmotique, 5 volumes de RPMI ont été ajoutés et les tubes ont de nouveau été centrifugés à 1200 rpm pour 10 minutes. Les tubes ont été décantés et les culots ont été resuspendus dans 1 ml de milieu de marquage composé de PBS additionné de 1% BSA (Sigma) et 0,2% Sodium Azide (Fischer). À cette

étape, un décompte cellulaire a été effectuée en diluant les cellules 1/20 dans une solution saline physiologique contenant 5% de bleu trypan.

L'anticorps spécifique a été ajouté à  $5 \times 10^5$ -  $1 \times 10^6$  cellules par échantillon et la suspension a été incubée 30 minutes à 4°C. Les anticorps couplés à la FITC utilisés comprennent ceux précédemment décrits pour l'immunohistochimie aux dilutions suivantes: anti-L3T4/CD4 1/100, anti-Ly-2 1/100, anti-CD45R/B220 1/100 et anti-F4/80 1/20. De plus, l'anticorps anti-Gr-1 (PharMingen) spécifique aux granulocytes, provenant du rat, a été utilisé à une dilution 1/100. Des réactions contrôles ont été effectuées avec les cellules sans anticorps, et avec des immunoglobulines isotypiques. Après l'incubation de 30 minutes, les cellules ont été lavées 2-3 fois avec le même milieu. Finalement, les cellules ont été resuspendues dans une solution de PBS contenant 2% de paraformaldéhyde (BDH) avant d'être analysées à l'aide d'un appareil de cytofluorométrie FAC-Star (Becton Dickinson) où 10 000 éléments par échantillons ont été comptés.

## **2.7 EXPRESSION DES ARNm DE *vpr***

Afin d'étudier l'expression des ARNm de *vpr*, les ARN de plusieurs organes de souris transgéniques et contrôles, ont été extraits. Ces ARNs ont ensuite été soumis à des réactions de transcriptase inverse suivi d'une amplification par la méthode de réaction en chaîne utilisant la polymérase (RT-PCR).

### **2.7.1 Extraction d'ARNs totaux à partir de tissus**

Les organes ont tout d'abord été prélevés et directement congelés dans l'azote liquide. Ceux-ci ont ensuite été homogénéisés à l'aide d'un homogénéiseur (Polytron) dans une solution de TRIzol (Gibco BRL) à raison de 1 ml de TRIzol pour 0,1 g de tissu. Les échantillons ainsi homogénéisés ont été incubés 5 minutes à température ambiante avant d'y ajouter 0,2 ml de phénol/chloroforme (1:1) par ml de TRIzol. Les tubes contenant les échantillons ont ensuite été agités vigoureusement pendant 15 secondes, incubés de nouveau 2 à 3 minutes à température ambiante et centrifugés à 12 000 x g pour 10 minutes. La phase aqueuse a été récupérée dans un nouveau tube et une autre extraction au phénol/chloroforme ainsi qu'une extraction au chloroforme ont été effectuées avant de précipiter l'ARN. Pour cela, 0,5 ml d'isopropanol pour chaque ml de TRIzol a été ajouté à la phase aqueuse et les échantillons ont été incubés à température ambiante pendant 10 minutes avant d'être centrifugés à 12 000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Par la suite, les culots d'ARN ont été lavés en ajoutant 1 ml d'éthanol 75%/ml TRIzol, avant d'être vortexés et centrifugés à 7500 x g pendant 5 minutes à 4°C. Ceux-ci ont été brièvement séchés à l'air ambiant avant d'être dissouts dans l'eau contenant 0,1% de diethyl pyrocarbonate (DEPC) dont le volume variait en fonction de la grosseur des culots obtenus. Afin d'être bien solubilisé, les tubes ont finalement été incubés à 55-60°C pour 10 minutes.

### **2.7.2 Traitement des ARNs totaux à la DNase**

Afin d'éliminer toute contamination d'ADN résiduelle, les ARN totaux obtenus ont subi un traitement à la DNase. Pour cela, les ARNs ont été incubés

à 25°C pendant 5 heures dans un tampon contenant 100 mM acétate de sodium et 5 mM MgSO<sub>4</sub> pH 5.0, additionné de 30 unités de RNAGuard (Pharmacia) et de 100 unités de DNase I exempt de RNase (Boeringer Mannheim). Les échantillons ont ensuite été purifiés par une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamyl (25:24:1) avant d'être solubilisés dans l'eau et gardés à -80°C jusqu'à utilisation.

### **2.7.3 Réaction de réverse transcriptase**

Les ARNs ont tout d'abord été dosés par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260nm. Vingt µg d'ARN total de chaque tissu ont été rétrotranscrits dans un volume final de 60 µl contenant 2 mM de chacun des nucléotides libres, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 unités de reverse transcriptase (Perkin Elmer), 6 µl de tampon 6x (Perkin Elmer), 50 unités de RNAGuard et 20 pm de chacune des amorces antisens spécifiques (3') pour les ARNm de GAPDH et Vpr. Les mélanges réactionnels ont ensuite été portés à 42°C pendant une heure.

### **2.7.4 Amplification par polymérisation en chaîne (PCR)**

Des réactions de PCR standards ont été effectuées séparément pour Vpr et GAPDH en utilisant 2 µg d'ARN préalablement reverse transcrit. Chaque réaction a été effectuée dans un volume total de 50 µl contenant les amorces respectives sens et antisens localisées en amont et en aval de la région à amplifier à raison de 10 pmoles chacune, 2 mM de chaque nucléotide libre, 2,5 unités de Taq polymérase et 4,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, le tout dans le tampon fourni par la compagnie Perkin Elmer. Les séquences d'oligonucléotides de chaque amorce sont les suivantes: amorce de Vpr 5' (5'- GAGGGAGCCATACAATGA-3'), amorce



de Vpr 3' (5'-CTGTCGAATAATGCCTAT-3'), amorce de GAPDH 5' (5'-TCCAGGAGCGAGATCCCGTC-3'), amorce de GAPDH 3' (5'-TTGATGGTATTCGAGAGAAGGG-3'). Le programme d'amplification a comporté 28 cycles consistant en 1 minute de dénaturation à 94°C, 1 minute d'appariement à 60°C et 2 minutes d'extension à 72°C. Les produits de PCR obtenus ont finalement été détectés par hybridation sur filtre de type Southern tel que décrit précédemment. Pour GAPDH, un fragment amplifié marqué au dCTP-<sup>32</sup>P par "Random priming" en utilisant la trousse BRL selon les recommandations de la compagnie a été utilisé comme sonde. Pour la détection des ARNm de Vpr la sonde utilisée est la même que pour la détection du transgène chez les souris transgéniques.

### **3. RÉSULTATS**

#### **3.1 DESCRIPTION DES CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES ET DES TRANSGÈNES**

Pour pouvoir étudier les effets du gène *vpr* du VIH-1 dans le modèle de souris transgéniques, nous avons utilisé 2 promoteurs permettant à ce gène d'être exprimé selon des patrons différents. L'un d'eux, le LTR du virus murin SL3-3 est spécifique pour le système lymphoïde (Hays et al., 1990; Morrison et al., 1991), et a servi à générer la construction SL-ER de 4,7 kb (figure 3a). Le second, le LTR de RSV, est connu pour son expression ubiquitaire et a été utilisé dans la construction R-ER de 5,2 kb (figure 3b). Ces constructions plasmidiques contiennent un fragment de 848 pb contenant le gène *vpr* de la souche ELI du VIH-1. En amont de ce gène on retrouve le promoteur RSV de 580 pb ou SL3 de 474 pb. La polyadénylation *in vivo* de ces messagers est assurée par la présence d'une séquence de 400 pb située en 3' et contenant le signal de polyadénylation du virus SV-40. Le transgène SL-ER de 1,9 kb est extrait des séquences plasmidiques par une digestion enzymatique Xho I/Xho I alors que la digestion avec les enzymes Nde I/Xho I nous donne le transgène R-ER de 2,1 kb (figure 4) (figure 5a).

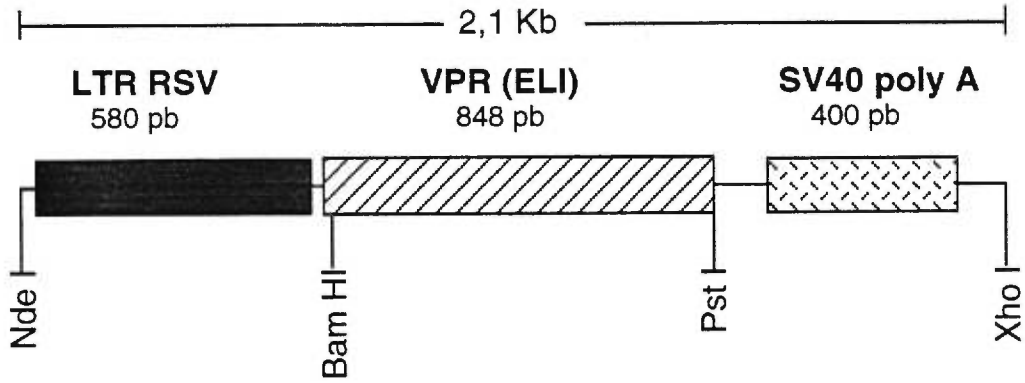
#### **3.2 DÉVELOPPEMENT DES LIGNÉES TRANSGÉNIQUES**

Une fois les 2 constructions microinjectées, plusieurs portées ont été obtenues. Pour identifier les souris fondatrices, l'ADN génomique purifié provenant d'échantillons de queues de souris a été testé par la méthode d'hybridation sur filtre de type Southern pour vérifier l'intégration du transgène

**Figure 4 :** Représentation des transgènes utilisés pour la microinjection. **A)** Le transgène R-ER est bordé par les enzymes de restriction Nde I et Xho I. Il contient le fragment LTR de RSV, le gène *vpr* du VIH-1 et la séquence de polyadénylation de SV40. **B)** Le transgène SL-ER de 1,9 Kb provient du plasmide du même nom et est bordé à ces deux extrémités par le site Xho I. On retrouve à l'extrémité 5' le fragment LTR de SL3, le gène *vpr* du VIH-1 et la séquence de polyadénylation de SV40 qui est situé en 3'.

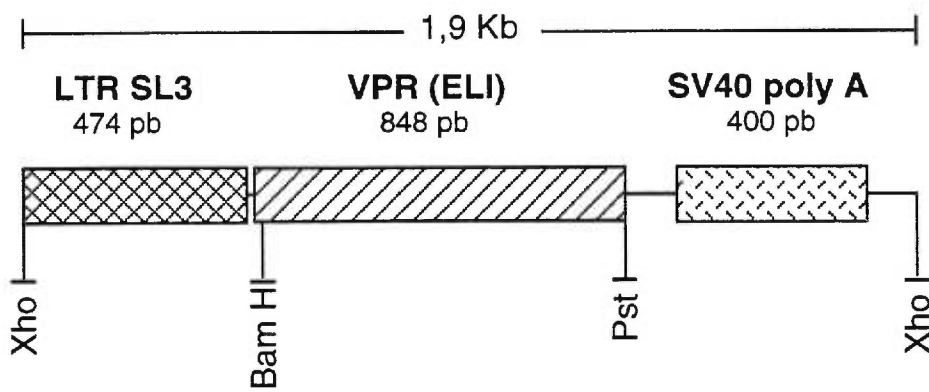
**A**

### Transgène R-ER



**B**

### Transgène SL-ER



**Figure 5a :** Visualisation sur gel d'agarose de l'ADN plasmidique R-ER après digestion avec les enzymes de restriction Nde I-Xho I. Un fragment de 2,1 Kb (transgène) et un autre de 3,1 Kb sont ainsi obtenus.

**Figure 5b :** Hybridation sur filtre de type Southern d'ADN génomique de queues des souris transgéniques fondatrices R-ER. Les échantillons ont été digérés avec l'enzyme Bgl II et hybridés avec le transgène marqué au<sup>32</sup>P.

**A**

P.M. Ladder 1 kb  
P.M.  $\lambda$  Hind III  
R-ER+Nde I/Xho I

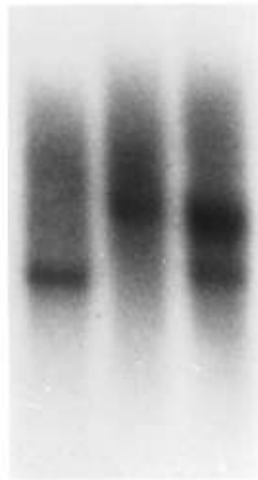


**B**

Lignée 1189  
Lignée 14  
Lignée 6

4,3 kb—

2,0 kb—



dans le génome murin. Pour SL-ER, 5 souris fondatrices ont pu être identifiées sur un total de 35 naissances. Tous ces fondateurs ont été utilisés pour développer des colonies de souris transgéniques en les croisant avec des animaux C3H non-transgéniques. Les fondateurs SL-ER 55, SL-ER 56 et SL-ER 232 n'ont pas donné de descendant transgénique parmi les 20 à 30 souriceaux obtenus pour chacun de ces fondateurs. Ceci suggère que ces animaux sont probablement mosaïques. Les deux autres fondateurs, SL-ER 64 et SL-ER 240 ont transmis le transgène à leur descendance. Le fondateur 240 a généré 4 souris porteuses du transgène dont 3 sont mortes alors qu'elles étaient âgées de 5 et 6 mois. La quatrième a été sacrifiée au même âge puisque son état se détériorait. Ces souris mortes en bas âge présentaient un phénotype anormal. Leurs yeux étaient globuleux, elles avaient le museau court et le dos arrondi. Trois croisements successifs ultérieurs entre le fondateur 240 et des souris non-transgéniques C3H n'ont pas permis d'observer d'autres descendants transgéniques parmi les 30 souriceaux obtenus. Le fondateur 64 n'a donné qu'une souris positive hétérozygote. Celle-ci a été croisée avec le fondateur 64 et aucune descendance positive n'a été obtenue. De plus, d'autres croisements entre ce fondateur et une souris normale n'ont donné aucune descendance positive.

Comme aucune lignée valable pour les études avec le promoteur SL3 n'a été obtenue, la suite des résultats portera donc sur les souris transgéniques générées avec le promoteur RSV.

Pour R-ER, sur un total de 55 naissances, 6 fondateurs ont été obtenus parmi lesquels les fondateurs R-ER 6, R-ER 14 et R-ER 1189 ont été

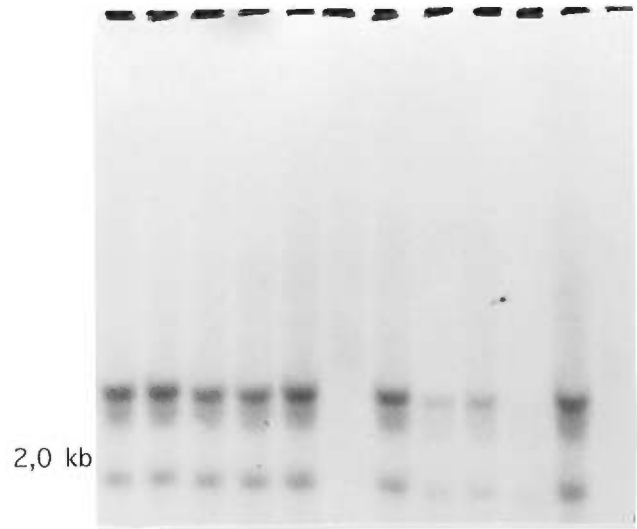
sélectionnés pour établir les colonies et analyser l'expression ainsi que les effets de *vpr*. Les 3 autres fondateurs, R-ER 3, R-ER 1185 et R-ER 1186, n'ont pas donné de descendance parce qu'ils sont probablement des animaux mosaïques. Pour cette raison, ces animaux n'ont pas été retenus pour la présente étude. Les 3 lignées choisies (R-ER 6, R-ER 14 et R-ER 1189) comportent un seul site d'intégration du transgène (qui varie d'une lignée à l'autre) où respectivement 5-10, 2-4 et 6-10 copies de transgènes sont intégrées tête-à-queue (figure 5b). En croisant ces souris avec des souris C3H non-transgéniques, les 3 fondateurs ont transmis le transgène de façon mendélienne. Le nombre d'animaux par portée a été similaire à celui des souris normales contrôles.

Sur la figure 6, les résultats d'hybridation sur filtre de type Southern pour chacune des lignées étudiées sont représentés. Pour les lignées 6 et 14, les animaux testés proviennent de croisements entre 2 souris hétérozygotes. Neuf animaux sur 12 sont positifs (75%) dans la lignée 6, alors que 10 sur 15 (67%) le sont aussi dans la lignée 14. Les souris possiblement homozygotes sont difficiles à déterminer dû à la variation possible des quantités d'ADN d'un échantillon à l'autre. Pour cette raison, les souris qui présentent un signal plus intense que les autres (potentiellement homozygotes) sont croisées avec des souris normales dans le but de s'assurer que leur descendance est totalement positive. Ce sont des animaux provenant de tels croisements qui sont testés sur le filtre représenté dans la figure 6 pour la lignée 1189. Deux portées provenant de croisements différents ont été testées et tous les animaux sont positifs. On peut aussi remarquer que les parents homozygotes (+/+) présentent un signal d'une intensité plus forte que leur descendance qui est hétérozygote. Tous les animaux obtenus étaient maintenus dans un environnement sans pathogène et étaient

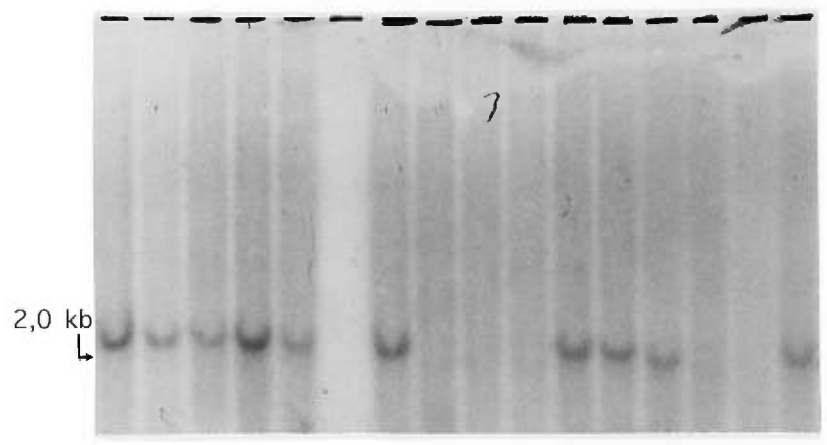


**Figure 6 :** Hybridation sur filtre de type Southern d'ADN de queues de souris. Pour la lignée 6 et 14 les animaux testés sont issus de croisements entre deux souris hétérozygotes, alors que les animaux de la lignée 1189 testés, proviennent de deux croisements différents entre une souris homozygote et une souris C3H non-transgénique. La digestion des ADNs a été effectuée avec l'enzyme de restriction Bgl II. La sonde utilisée pour l'hybridation est constituée du transgène marqué au  $^{32}\text{P}$ .

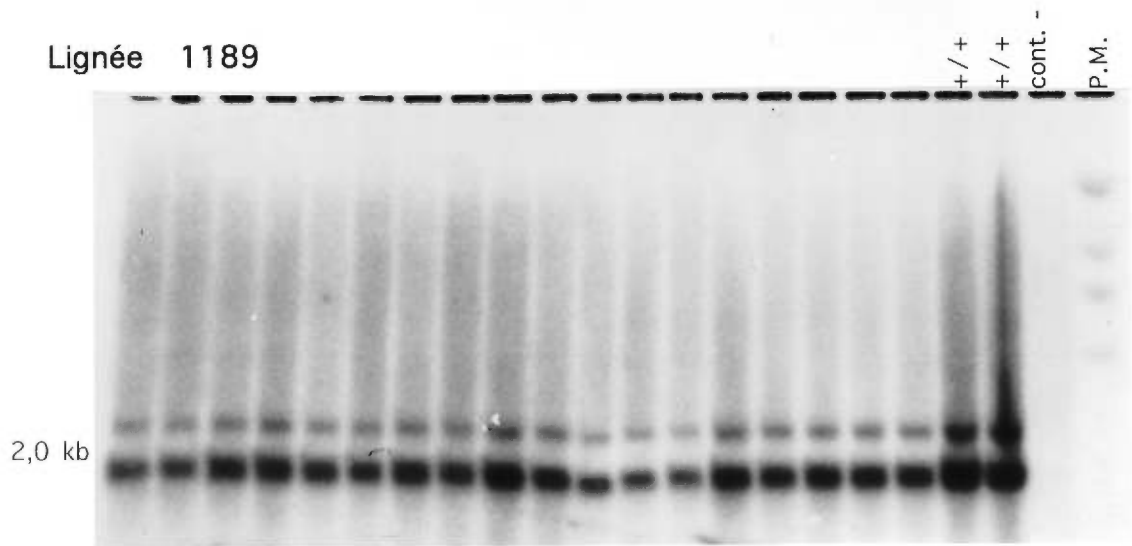
Lignée 6



Lignée 14



Lignée 1189



phénotypiquement normaux . Jusqu'à ce jour, c'est-à-dire depuis plus de 2 ans, les animaux sont demeurés sans pathogène et en bonne santé.

### **3.3 EXPRESSION DU GÈNE *VPR***

Dans le but d'étudier les effets du produit du gène *vpr*, nous avons recherché l'expression du transgène dans notre modèle de souris transgénique. Pour cela nous avons utilisé deux approches, l'une visant à identifier les messagers de *vpr* et l'autre la protéine.

Pour déterminer l'expression spécifique des messagers de *vpr* dans les différents tissus des animaux transgéniques issus des 3 lignées, R-ER 6, R-ER 14 et R-ER 1189, nous avons utilisé la méthode de réverse transcription suivie d'une amplification en chaîne utilisant la taq polymérase (RT-PCR). Une souris hétérozygote âgées de 3 mois de chacune des lignées ainsi qu'une souris C3H non-transgénique ont été sacrifiées pour prélever des échantillons de tissus pour l'extraction des ARNs totaux. Les ARNs ont été extraits à partir des tissus de cerveau, thymus, coeur, poumon, foie, rate, rein, muscle squelettique et peau. Ces ARNs ont ensuite été utilisés pour la rétrotranscription simultanée des messagers de *vpr* et du gène contrôle GAPDH.

À partir des ADNc ainsi obtenus, les messagers de GAPDH ont été amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques. Ce gène rapporteur nous a permis de vérifier la qualité des ARNs et d'évaluer de façon semi-quantitative le niveau d'expression de *vpr* dans chaque tissus étudié (figure 7). Les produits d'amplification ont été visualisés après hybridation avec, comme sonde, un fragment de 1,2 kb du gène GAPDH marqué au dCTP-<sup>32</sup>P. L'intensité des

**Figure 7 :** Analyse de l'expression du gène *vpr* dans les souris transgéniques par la méthode de RT-PCR. Les lignées R-ER 6, R-ER 14 et R-ER 1189 ont été caractérisées. Les ARNm spécifiques de *vpr* ont été identifiés et comparés dans différents tissus de souris âgées de 3 mois (*vpr*(RT+)). Les ARN totaux d'une souris C3H non-transgénique ont été utilisés comme contrôle pour vérifier la spécificité des amorces *vpr* (normal mouse). La quantité relative d'ARN rétrotranscrit a été évaluée par l'ajout d'amorce pour le GAPDH dans les réactions (GAPDH). L'élimination complète d'ADN dans les échantillons d'ARN est démontrée à l'aide de réactions traitées en parallèle où la transcriptase inverse a été omise lors de la synthèse des ADNc (*vpr*(RT-)). Le plasmide R-ER a été utilisé comme contrôle positif (R-ER plasmid).

RER Plasmid

Line #6

Mix  
Brain  
Thymus  
Kidney  
Muscle  
Liver  
Heart  
Spleen  
Lung



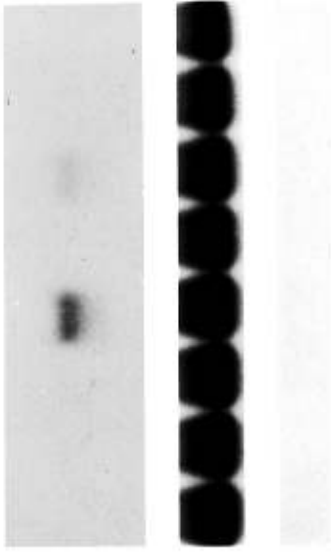
- Vpr (RT+) -

- GAPDH -

- Vpr (RT-) -

Line #14

Brain  
Thymus  
Heart  
Lung  
Liver  
Spleen  
Kidney  
Muscle



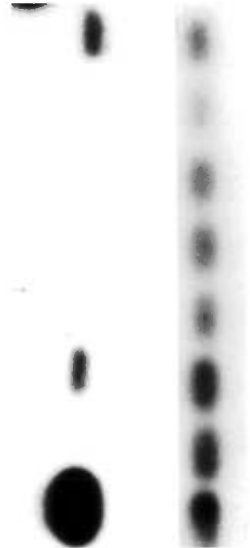
- Vpr (RT+) -

- GAPDH -

- Vpr (RT-) -

Line #1189

Brain  
Thymus  
Kidney  
Muscle  
Liver  
Heart  
Spleen  
Lung



- Vpr (RT+) -

- GAPDH -

- Vpr (RT-) -

Normal mouse

Brain  
Thymus  
Kidney  
Muscle  
Liver  
Heart  
Spleen  
Lung



- Vpr (RT+) -

- GAPDH -

- Vpr (RT-) -

bandes a été évaluée et la quantité d'ADNc ajustée pour être égale d'un tissu à l'autre avant d'être amplifiée de nouveau. Après cette deuxième amplification, l'intensité des bandes correspondant à l'amplification par GAPDH est similaire d'un tissu à l'autre sauf pour la lignée R-ER 1189.

Après avoir ajusté la quantité d'ADNc nécessaire, les ADNc de *vpr* ont été amplifiés à l'aide d'amorces spécifiques. Les produits d'amplification ont été visualisés après hybridation avec, comme sonde, le transgène entier marqué avec du dCTP- $\alpha^{32}\text{P}$ . La figure 7 permet de visualiser la bande spécifique correspondant au fragment amplifié qui est de 0,2 kb. Cette figure nous permet de visualiser et de comparer le patron d'expression obtenu pour chacune des lignées. La lignée R-ER 6 présente le plus grand nombre de tissus où des messagers de *vpr* ont été détectés. Le cerveau, le thymus, le rein, le coeur et le poumon expriment les ARNm de *vpr*. La lignée R-ER 14 a, quant à elle, permis de détecter des messagers dans le poumon et la rate seulement, alors que la lignée R-ER 1189 démontre de l'expression dans le cerveau, le rein, le coeur et le poumon. Dans cette dernière lignée, on remarque une variation du signal représentant l'amplification du GAPDH d'un tissu à l'autre, mais comme seulement quatre des tissus étudiés expriment les ARNm de *vpr*, les résultats sont facilement interprétables. Néanmoins, il serait intéressant de refaire cette expérience pour s'assurer qu'aucun autre tissu ne présente de l'expression.

Comme le gène rapporteur nous a permis d'utiliser des quantités d'ADNc relativement égales d'un tissu à l'autre pour l'amplification, on peut comparer le niveau d'expression obtenu pour chaque tissu. Ainsi on peut voir que les lignées R-ER 6 et R-ER 1189 ont leur plus haut niveau d'expression dans le cerveau. Ce dernier organe ne présente par contre aucune expression dans la lignée R-ER

14. Le poumon est le seul organe où l'expression de *vpr* a été détectée pour les trois lignées étudiées, et ce à un niveau relativement similaire. Les lignées R-ER 6 et R-ER 1189 expriment toutes deux le transgène dans le rein et le coeur mais à des niveaux différents. Par ailleurs, la lignée R-ER 14 est la seule où des messagers de *vpr* ont pu être détectés dans la rate. Finalement, la lignée R-ER 6 montre un niveau d'expression assez élevé dans le thymus. Aucun messenger de *vpr* n'a pu être détecté dans le muscle et le foie, et cela pour les 3 lignées étudiées.

La spécificité des oligonucléotides pour la séquence codante de *vpr* est confirmée par l'absence de bande à 0,2 Kb chez la souris contrôle non-transgénique. De plus, pour s'assurer que la bande spécifique observée chez les animaux transgéniques ne provenait pas d'ADN résiduel non éliminé lors de la préparation des ARNs totaux, nous avons effectué des réactions contrôles en parallèle. Celles-ci ont été effectuées dans les mêmes conditions réactionnelles, mais la reverse transcriptase a été omise. L'absence de bande après hybridation pour ces réactions confirme la spécificité des signaux obtenus dans les tests pour la détection des messagers de *vpr*.

Nous avons par la suite tenté de détecter la protéine Vpr. Pour cela, nous avons utilisé des techniques immunohistochimiques avec un anticorps anti-Vpr sur des coupes de rates et de cerveaux provenant de souris transgéniques des trois lignées étudiées et de souris contrôles non-transgéniques. Les animaux étudiés étaient tous hétérozygotes et étaient âgés de 4 à 10 mois lors de l'étude. Des cellules infectées par VIH-1 fixées sur lames ont été utilisées comme contrôle positif. Cette technique ne nous a pas permis d'identifier la protéine Vpr. Pourtant, la présence de messagers dans ces tissus a été démontrée (figure 7).

Ce résultat n'est pas exceptionnel puisque plusieurs équipes de recherche ont obtenu des résultats similaires en recherchant des protéines du VIH-1 (Thomas et al., 1994; Toggas et al., 1994). L'équipe de Thomas et al. avaient tenté, sans succès, d'identifier Vpr ainsi que d'autres protéines du VIH-1 dans leur modèle de souris transgéniques (Thomas et al., 1994).

### 3.4 ÉTUDES ANATOMO-PATHOLOGIQUES

Afin de déterminer la présence de lésions pathologiques causées par l'expression du gène *vpr* chez les animaux transgéniques, nous avons effectué une étude anatomo-pathologique. Cette étude a été effectuée sur la majorité des tissus et organes de 40 souris hétérozygotes R-ER ainsi que sur des souris contrôles non-transgéniques C3H. Les âges de ces dernières correspondaient aux animaux transgéniques sacrifiés. Des 40 animaux transgéniques étudiés, 17 provenaient de la lignée 6, 16 de la lignée 14 et 7 de la lignée 1189. Tous ces animaux ont été sacrifiés à des âges variant de 3 à 17 mois et aucun trouble de comportement ou de santé apparent n'a été observé.

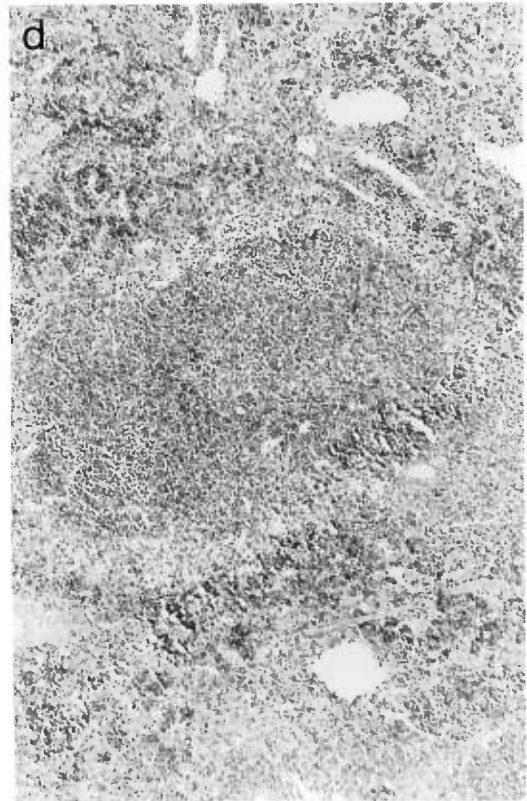
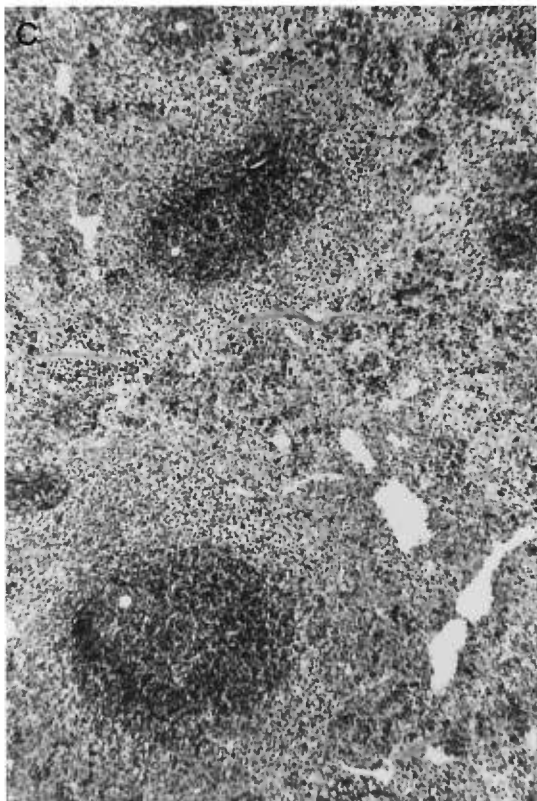
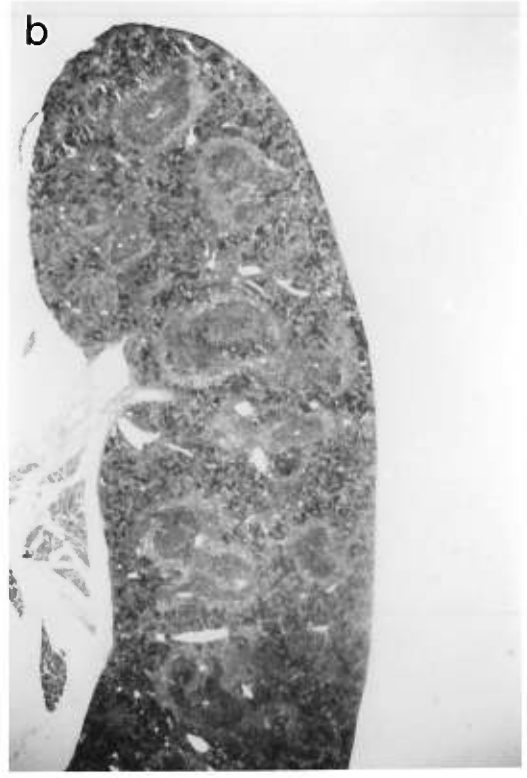
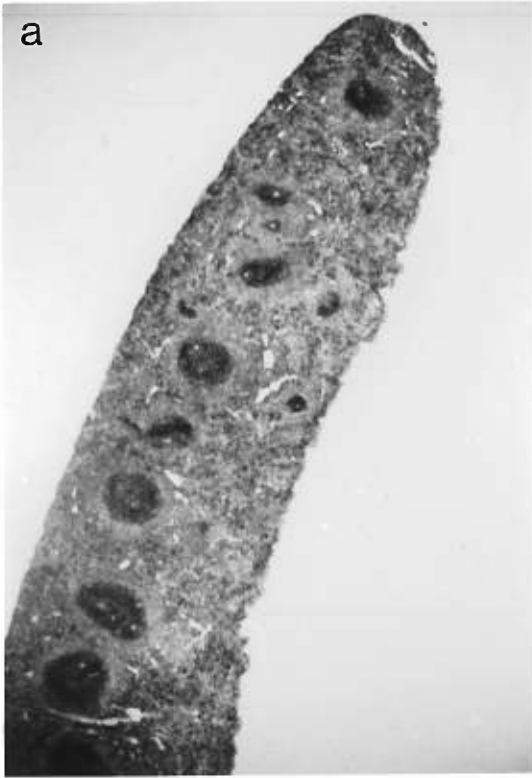
Pour l'examen macroscopique et histologique, les animaux ont été anesthésiés avec une dose létale de pentobarbital avant d'être sacrifiés. Les échantillons de tissus ont immédiatement été fixés et ensuite inclus en paraffine avant d'être coupés et colorés avec HPS. À l'examen macroscopique, les souris R-ER n'ont démontré aucune anomalie, à part une splénomégalie variant de légère à importante chez quelques animaux. Cette splénomégalie était plus apparente chez les animaux âgés de plus de 10 mois, dépendamment du degré d'hyperplasie lymphoïde.



Par ailleurs, l'examen histologique complet a permis d'observer, à des degrés variables, la présence d'une hyperplasie lymphoïde de la pulpe blanche dans la majorité des rates des animaux transgéniques. Cette hyperplasie se caractérise par une augmentation du nombre et de la taille des follicules lymphoïdes. Ces derniers montrent des centres germinaux proéminents et des zones marginales qui ne sont pas bien démarquées. (figure 8 )

Comme le montre le tableau 2, l'hyperplasie observée est plus importante chez les animaux provenant des lignées 6 et 14. Cette hyperplasie semble s'accroître avec l'âge. Chez les souris âgées de plus de 6 mois l'hyperplasie est observée plus fréquemment et son niveau est plus important. Sur les 40 animaux transgéniques observés, 27 (68%) présentaient une hyperplasie lymphoïde de la rate à des degrés variant de discret à important. Les lignées R-ER 6 et R-ER 14 ont montré respectivement 12/17 (71%) et 12/16 (75%) souris présentant ces changements de la rate. L'analyse statistique nous montre que la présence d'hyperplasie lymphoïde est augmentée de façon significative pour ces deux lignées avec  $p=0,003$  pour R-ER-6 et  $p=0,001$  pour R-ER-14. Cette anomalie a été retrouvée moins fréquemment chez les animaux provenant de la lignée R-ER 1189. En effet, seulement 3 cas sur 7 (43%) ont présenté cette anomalie. Cette augmentation n'est pas significative puisque  $p$  est égal à 0,401. Il faut par contre noter que le nombre de souris sacrifiées est inférieur dans la lignée 1189 et que ces souris étaient plus jeunes. Le nombre d'animaux atteints est quand même plus élevé que les contrôles normaux où 4 cas sur 22 ont présenté une telle hyperplasie. Les ganglions mésentériques de certains animaux affectés ont pu être analysés. Chez la majorité d'entre eux, une hyperplasie lymphoïde a aussi été observée.

**Figure 8 :** Coupes de rate d'un animal contrôle C3H non-transgénique de 7 mois (a et c) et d'un animal hémizygote R-ER de la lignée 6 également âgé de 7 mois (b et d). La rate transgénique présente une hyperplasie lymphoïde de la pulpe blanche caractérisée par une augmentation du nombre et de la taille des follicules lymphoïdes. Ces derniers présentent des centres germinaux proéminents et des zones germinales moins bien démarquées. Grossissement: (a et b) X 10, (c et d) X 25.



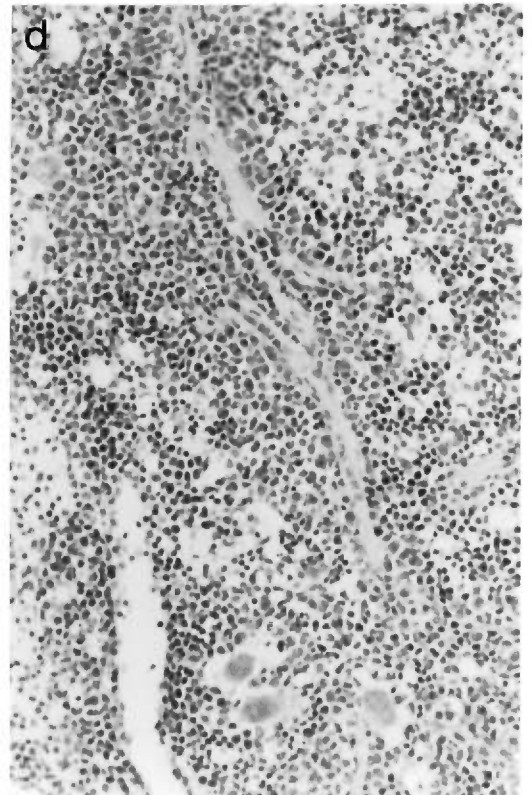
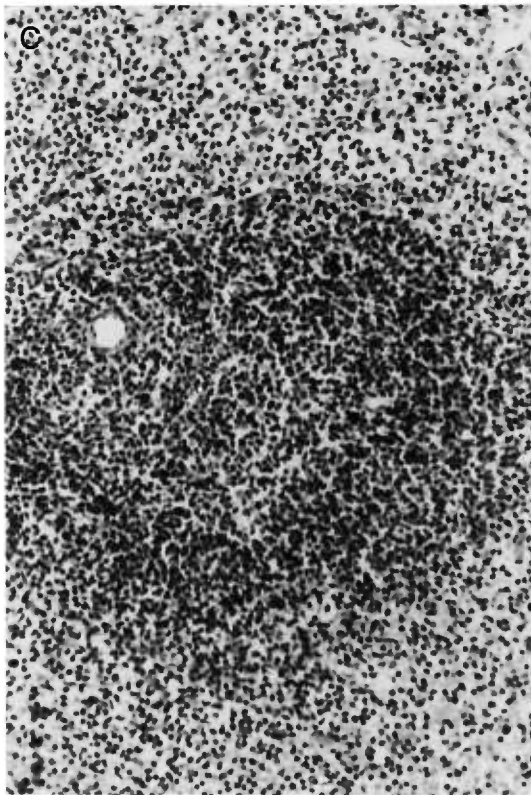
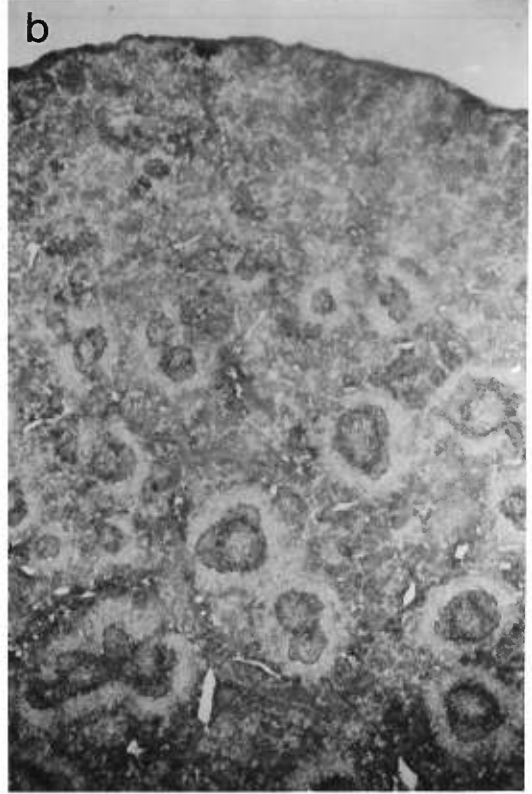
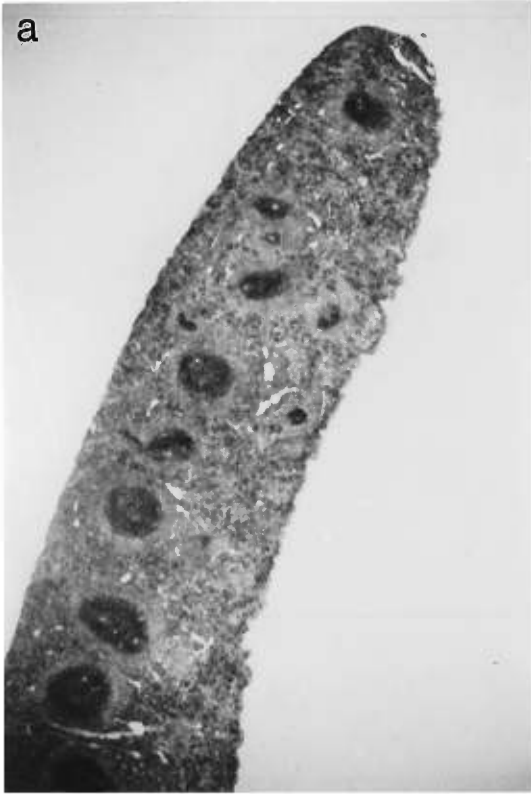
**Tableau 2 :** Incidence des changements pathologiques de la rate observés chez des animaux provenant des lignées R-ER 6, R-ER 14 et R-ER 1189. Des souris C3H non-transgéniques (normales) ont été utilisées comme contrôle. L'âge des souris utilisées pour cette étude variait de 3 à 17 mois.

<b>Lignée</b>	<b>Nombre d'animaux</b>	<b>Hyperplasie Lymphoïde</b>	<b>Hyperplasie Myéloïde</b>
<b>R-ER 6</b>	17	12	2
<b>R-ER 14</b>	16	12	1
<b>R-ER 1189</b>	7	3	1
<b>Normales</b>	22	4	0

De plus, un nombre limité d'animaux transgéniques présentaient une hyperplasie lymphoïde et myéloïde ou uniquement myéloïde de la rate. Au total, 4 cas (10%) d'hyperplasie myéloïde de la pulpe rouge ont été observés, alors qu'aucun cas similaire n'a été retrouvé chez les souris contrôles normales. Les cas d'hyperplasie myéloïde ont été retrouvés dans les 3 lignées, surtout chez des souris âgées de plus de 12 mois. La figure 9 nous montre une coupe de rate présentant une telle hyperplasie. On peut voir que les centres germinaux sont moins nombreux et que la pulpe rouge est beaucoup plus importante que dans la rate contrôle. Il est à noter que cet animal transgénique présentait une splénomégalie. L'examen de la moelle osseuse ainsi que des ganglions mésentériques de ces souris a lui aussi révélé dans la majeure partie des cas une hyperplasie myéloïde. À l'intérieur de la période d'âge des animaux inclus dans cette étude, l'hyperplasie lymphoïde ne semble pas évoluer vers des stades plus graves, sauf pour une souris où nous avons observé un lymphome. Cet animal provenait de la lignée 14 et était âgé de 16 mois. Chez cet animal, des métastases ont été observées dans les ganglions, le thymus, le pancréas, les glandes salivaires et le foie. Par ailleurs, dans la lignée 6 une souris âgée de 14 mois a montré un granulome inflammatoire à cellules géantes multinucléées.

Chez ces souris présentant une hyperplasie lymphoïde ou myéloïde, nous avons remarqué une augmentation du pigment orangé représentant l'hémosidérine dans les macrophages de la rate. Ce pigment nous apparaît plus élevé chez les souris transgéniques dont les rates sont hyperplasiées que chez les rates de souris contrôles normales du même âge. Aucun autre organe n'a montré d'atteinte importante. Dans le foie, les hépatocytes présentent un cytoplasme très vacuolé (surcharge de gras ou de glycogène). En effet plusieurs cas de stéatose micro ou macrovésiculaire ont été observés. De plus, quelques

**Figure 9 :** Coupes de rate d'un animal contrôle C3H non-transgénique de 7 mois (a et c) et d'un animal homozygote R-ER de la lignée 14 âgé de 6 mois (c et d). La rate transgénique présente une hyperplasie myéloïde. Grossissement : (a et b) X 10, (c et d) 25 X.





cas d'infiltrations mononucléées ont été observés dans le foie (3 cas), les poumons (3 cas) et les reins (6 cas), ce qui est comparable aux observations effectuées chez la souris normale. Nos résultats démontrent donc que le système lymphoïde est le plus sévèrement atteint. Pour ces raisons la poursuite de nos recherches a été orientée vers le système lymphoïde.

### **3.5 CARACTÉRISATION DES POPULATIONS CELLULAIRES DE LA RATE**

L'évaluation pathologique a été complétée par immunohistochimie et cytofluorométrie pour caractériser les différentes populations cellulaires des rates hyperplasiées provenant des animaux transgéniques. Pour ce faire, divers anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs présents dans les populations des lymphocytes T CD4+, les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes B ainsi que les macrophages matures ont été utilisés.

En immunohistochimie classique, les réactions immunologiques ont été effectuées sur des coupes à congélation sériées à partir de 21 rates d'animaux transgéniques. Toutes présentaient un aspect macroscopique normal. Les rates d'animaux transgéniques (8 de la lignée R-ER 6, 9 de la lignée R-ER 14 et 4 de la lignée R-ER 1189) provenaient d'animaux âgés de 4 à 13 mois. Le tableau 3 résume les observations effectuées sur ces rates lors d'une étude comparative avec des rates contrôles normales provenant d'animaux d'âge équivalent aux animaux transgéniques. Dans tous ces animaux, indépendamment de la lignée et de l'âge des souris sacrifiées, on a noté dans les rates des animaux transgéniques que les populations lymphocytaires T CD4+ ou CD8+ étaient normales ou légèrement abaissées. La population des lymphocytes B était en général légèrement augmentée, à l'exception de 4 cas provenant de la lignée R-

**Tableau 3** : Caractérisation des cellules de la rate par immunophosphatase. Les coupes de rates transgéniques ont été comparées à des rates de souris contrôles du même âge. N: comparable aux rates normales, -,--,---: légèrement diminué à très diminué, +,++,+++ : légèrement augmenté à très augmenté.

**CARACTERISATION DES CELLULES DE LA RATE  
IMMUNOCYTOCHIMIE**

Numéro de la souris	Age	Sexe	Lymphocytes T CD4	Lymphocytes T CD8	Lymphocytes B	Macrophages
<b>LIGNEE 6</b>						
372	5 mois	mâle	N	N	--	+
88	5 mois	mâle	--	--	N	+
255	8 mois	femelle	-	N	---	+
130	10 mois	femelle	N ou -	-	N ou +	+
257	10 mois	femelle	N ou -	N	-	N ou +
259	11 mois	femelle	+	N	-	+
83	13 mois	mâle	+	N	+	N
93	13 mois	mâle	N	-	+	N
<b>LIGNEE 14</b>						
357	5 mois	femelle	N	N	N ou -	N ou +
147	5 mois	femelle	N ou +	N	+	++
358	8 mois	femelle	N ou +	N	++	N
134	9 mois	mâle	-	--	N ou +	+
136	9 mois	mâle	-	-	+	N
144	9 mois	femelle	-	N	++	+
139	12 mois	mâle	N ou -	N	++	N ou +
104	13 mois	femelle	N	N ou -	N	N
101	13 mois	femelle	N	N	-	+
<b>LIGNEE 1189</b>						
547	4 mois	femelle	N	N	+	N ou +
550	4 mois	mâle	N	N	N	N ou +
346	7 mois	mâle	N	N	++	N
348	7 mois	femelle	N	N	N ou -	N

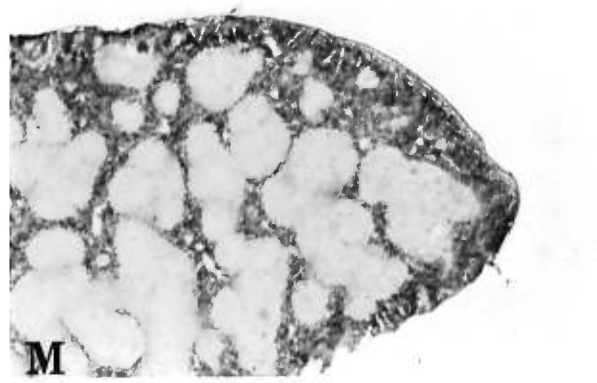
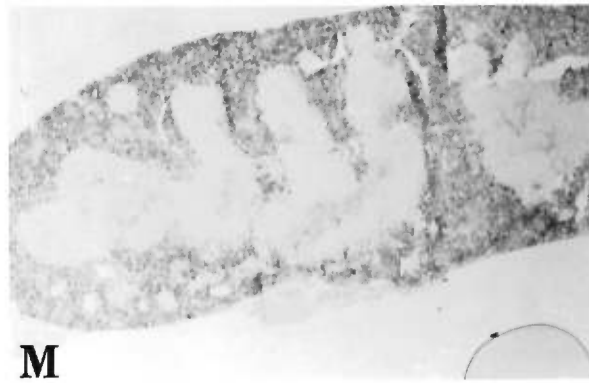
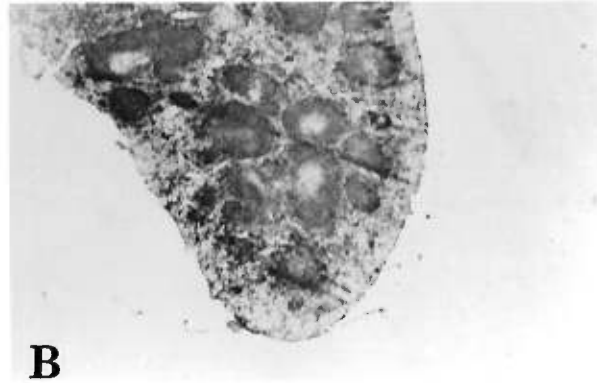
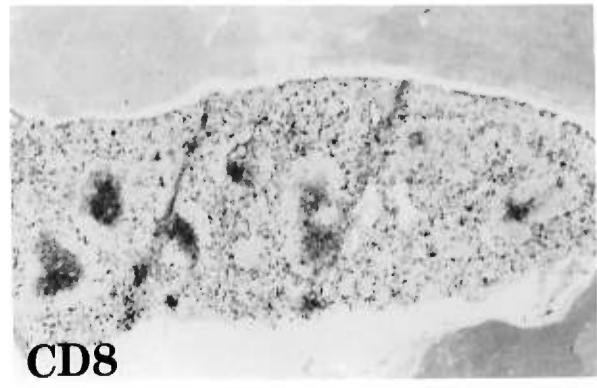
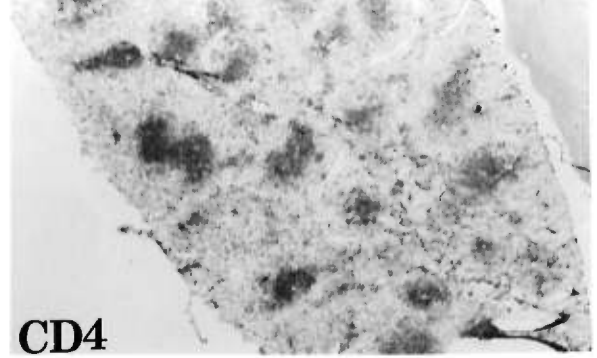
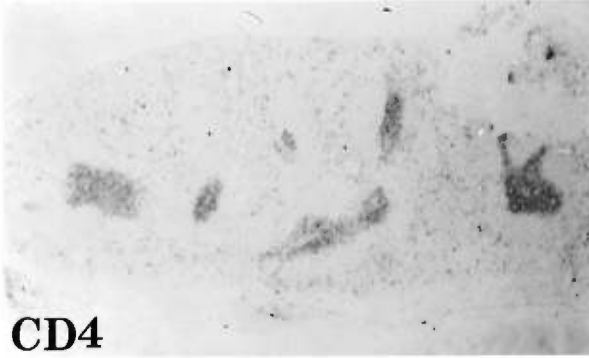
ER 6 et un cas de la lignée R-ER 14 où cette population lymphocytaire est apparue diminuée à des niveaux variant de légers à importants. La population macrophagique a démontré elle aussi une légère augmentation. Ces observations sont illustrées dans la figure 10 avec des coupes de rates d'une souris contrôle et d'une souris transgénique après réactions immunologiques avec des anticorps spécifiques. Ces photos montrent bien les lymphocytes T CD4+ qui semblent augmentés, alors que le nombre des lymphocytes T CD8+ est à peu près similaire au contrôle. Les populations des lymphocytes B et des macrophages chez la souris transgénique semblent pour leur part nettement accrues par rapport à la souris contrôle.

Les différences observées par immunohistochimie sont d'ordre qualitatif. Pour confirmer ces observations, nous avons donc utilisé la cytofluorométrie pour mieux caractériser les variations observée dans les différentes populations. Les anticorps anti-lymphocytes T CD4+ et CD8+, lymphocytes B et macrophages de souris conjugués à la fluorescéine ont été utilisés pour faire les décomptes de ces différentes populations au niveau des rates normales et transgéniques. La figure 9A présente le profil des colorations obtenues par cytofluorométrie. Pour cette évaluation, 11 rates de souris transgéniques et 10 rates de souris normales ont été utilisées. Les rates provenaient d'animaux âgés de 9 à 14 mois pour les lignées R-ER 6 et R-ER 14, alors que dans la lignée 1189 ils étaient âgés de 6 à 9 mois. Comme contrôle, nous avons utilisé des rates provenant de souris C57Bl et C3H à des âges variant de 4 à 12 mois. La figure 10A présente le profil des colorations obtenues par cytofluorométrie. Pour les besoins de cette figure, une rate dont les résultats étaient représentatifs de l'ensemble des résultats obtenus pour chacune des lignées a été choisie. Ces résultats des décomptes sont exposés au tableau 4. Ils ne démontrent pas de différence majeure pour les

**Figure 10** : Réactions d'immunophosphatase sur des coupes de rates, à l'aide d'anticorps spécifiques pour les lymphocytes T CD4+ (CD4) et CD8+ (CD8), les lymphocytes B (B) et les macrophages (M). Comparaison d'une souris contrôle normale et d'une souris transgénique de la lignée R-ER 14, toutes deux âgées de 5 mois. Grossissement : X 10

**N**

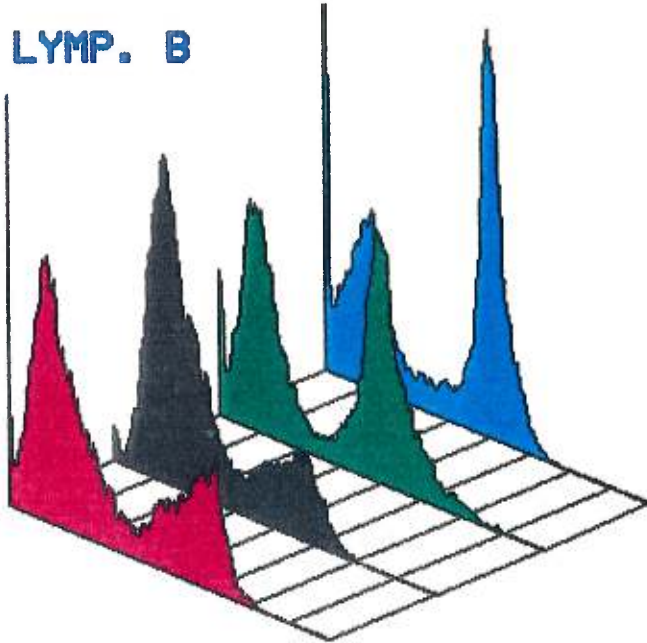
**Tg**



**Figure 10A** : Profil des colorations obtenu par cytofluorométrie. Une rate est représentée pour chacune des lignées.

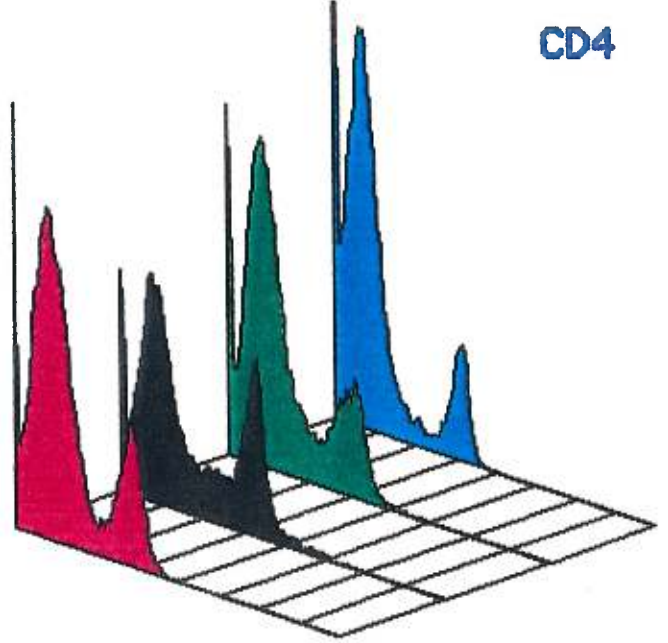
#11:/5/KE15NOV036\FL1\B220

**LYMP. B**



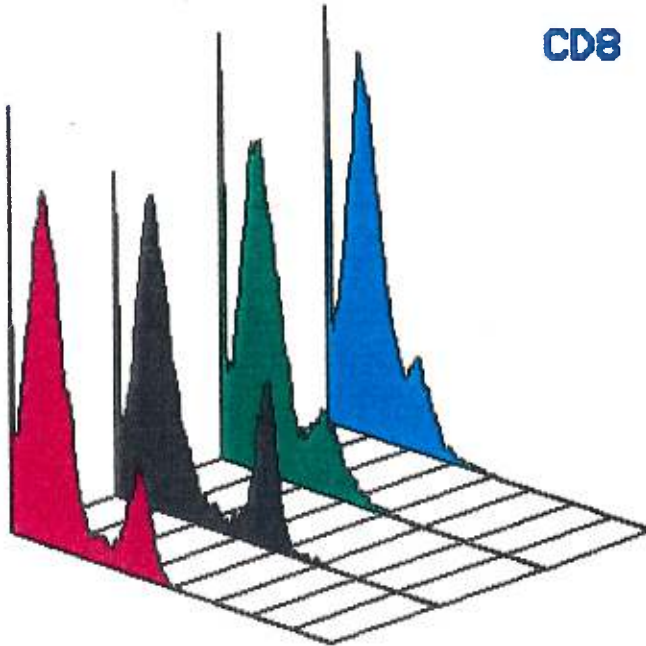
#11:/5/KE27OCT037\FL1\L3T4

**CD4**



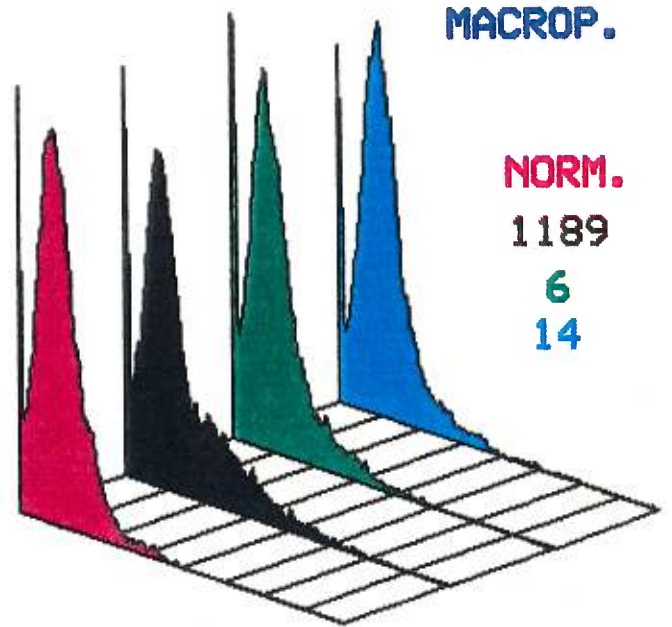
#11:/5/KE27OCT044\FL1\LY2

**CD8**



#11:/5/KE24NOV027\FL1\

**MACROP.**



**NORM.**

1189

6

14



**Tableau 4:** Décompte des populations lymphocytaires et macrophagiques par cytofluorométrie. Les nombres présentés correspondent à la moyenne des résultats obtenus pour les animaux utilisés dans une même lignée.

## Cytofluorométrie des souris R-ER

<b>Lignée</b>	<b>Lymph. B %</b>	<b>CD4 %</b>	<b>CD8 %</b>	<b>Macroph. %</b>
Souris norm.	44.6	20.5	16.6	5.1
Lignée 1189	33.3	28.3	25.0	8.2
Lignée 6	50.5	21.8	17.0	8.8
Lignée 14	58.8	15.2	13.5	8.3

populations lymphocytaires comparativement aux contrôles normaux. Par contre, la population macrophagique a montré une nette augmentation dans les 3 lignées R-ER (8,2-8,8%) en comparaison aux contrôles normaux (5,1%). Pour vérifier si cette augmentation des macrophages était dûe à la présence du gène *vpr* chez ces souris, nous avons comparé les résultats obtenus lors de cette expérience à ceux obtenus pour un autre modèle de souris transgéniques porteuses du gène *vpu* sous le contrôle du même promoteur. Dans ces souris *vpu*, nous n'avons noté aucune différence par rapport au contrôle, tant pour les lymphocytes que pour les macrophages (données non présentées). Ainsi donc, cette augmentation au niveau de la population macrophagique semble être présente uniquement dans les souris porteuses de *vpr*.

### **3.6 COLORATION DE L'HÉMOSIDÉRINE**

La méthode de coloration Perl a été utilisée pour visualiser l'augmentation de l'hémosidérine dans les rates des souris transgéniques en relation avec l'augmentation des macrophages. Celle-ci colore le fer et elle est intéressante pour rechercher des changements relatifs aux dépôts d'hémosidérine dans les rates de souris transgéniques en comparaison à des rates normales. Dans notre cas, 20 rates d'animaux transgéniques ont été choisies parmi les rates utilisées lors de l'investigation anatomo-pathologique. Neuf de ces rates provenaient de la lignée R-ER 6 et 11 provenaient de la lignée R-ER 14. Dix animaux contrôles âgés de 1 à 12 mois ont aussi été inclus dans cette analyse. Comme l'augmentation de l'hémosidérine peut être reliée au vieillissement, il est important de comparer des animaux du même âge. Les résultats présentés dans le tableau 5 nous montrent une augmentation de l'hémosidérine indépendamment de l'âge des animaux étudiés chez les souris transgéniques

**Tableau 5** : Résultat de l'étude comparative de la coloration de l'hémosidérine sur des coupes de rates de souris transgéniques et de souris contrôles par la méthode de coloration de Perl. Les signes "+" et "-" représentent l'intensité de la coloration observée.

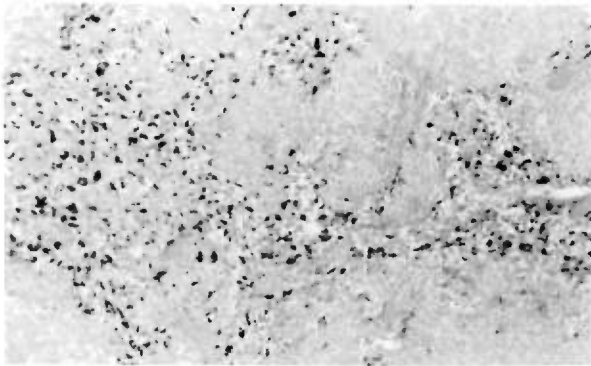
## Coloration de l'hémosidérine

	#	AGE (mois)	PERL'S
LIGNÉE 6	372	5	+
	87	7	++
	129	9	+
	373	9	+++
	132	9 1/2	++
	256	11	+++
	93	13 1/2	++
	6B	14	++
	8	14	+++
LIGNÉE 14	357	5	++
	363	5	+/-
	144	9	++
	145	6	+/-
	142	7	+/-
	146	7	++
	136	9	+
	139	12	+
	104	13	+/-
	21	13 1/2	++
	19	13 1/2	+++
NORMALES	N-50	1	-
	N-34	3	+
	N-44	3	+
	N-51	6	+
	N-130	6	+
	N-52	12	+
	N-53	12	+/-
	N-54	12	++
	N-55	12	+
	N-56	12	++

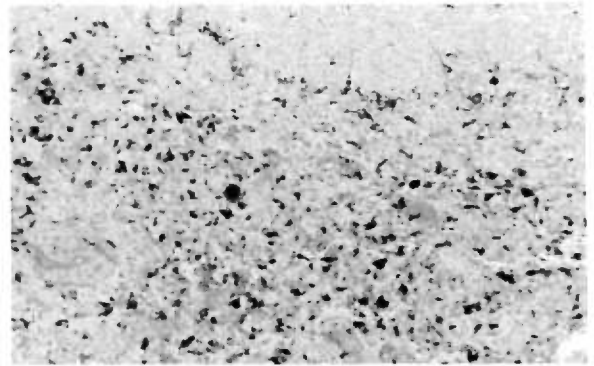
---

provenant de la lignée R-ER 6 examinées, comparativement aux souris contrôles normales (figure 11). Pour la lignée R-ER 14, il est difficile de conclure que l'intensité de la coloration est plus élevée que chez les souris contrôles. Peut-être ce dernier résultat est-il dû au petit nombre d'animaux examinés. L'examen d'un plus grand nombre d'animaux permettrait de confirmer ces données.

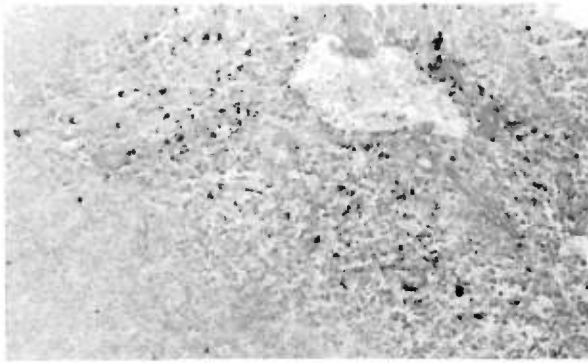
**Figure 11** : Coloration de l'hémosidérine sur des coupes de rates de souris transgéniques (Tg) et de souris contrôles (N). Les souris transgéniques sont âgées de 5 à 13 mois (m) alors que les souris contrôles ont 6 et 12 mois. Grossissement : X 25



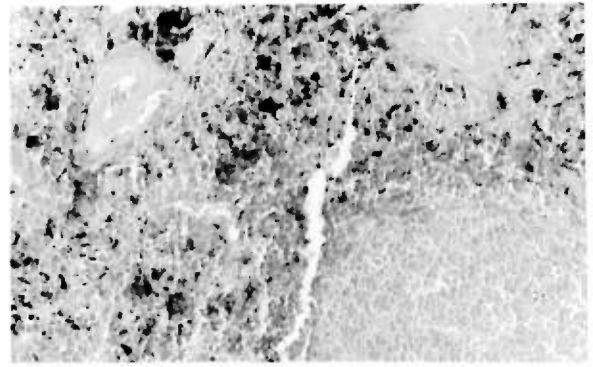
**N** **6m**



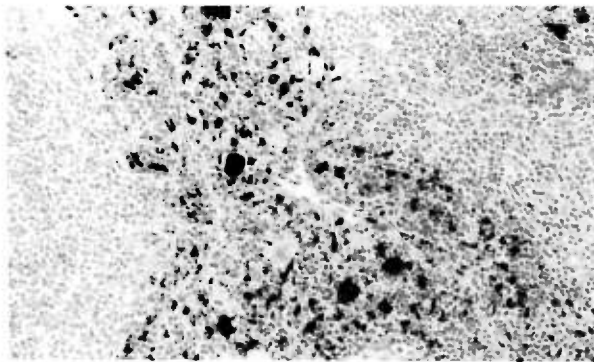
**N** **12m**



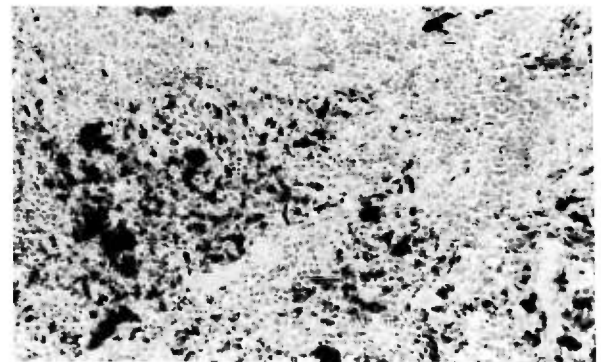
**Tg** **5m**



**Tg** **9m**



**Tg** **6m**



**Tg** **13m**



#### **4. DISCUSSION**

Dans le but d'étudier les effets pathologiques du gène *vpr* du VIH-1, nous avons produit des souris transgéniques porteuses de ce gène sous le contrôle de deux promoteurs. Dans le premier cas, le promoteur utilisé est le LTR du virus murin SL3-3 dont l'expression est spécifique au système lymphoïde. La microinjection de ce transgène a permis l'identification de 5 fondateurs. Trois de ceux-ci, SL-ER 55, SL-ER 56 et SL-ER 232 n'ont pas donné de descendants positifs malgré le nombre élevé de souriceaux obtenus par le croisement de ces fondateurs avec des souris normales. Ceci suggère fortement que ces animaux sont mosaïques. Bien que les fondateurs SL-ER 64 et SL-ER 240 aient transmis le transgène à leur descendance, aucune lignée n'a pu être établie. Le fondateur 64 a donné une seule souris positive parmi les deux portées de souriceaux obtenus. Celle-ci a été croisée avec le fondateur lui-même et encore une fois aucune descendance positive n'a été obtenue de ce croisement. Le fondateur 240 a quant à lui permis l'obtention de 4 descendants positifs qui présentaient un phénotype anormal. Comme aucun de ceux-ci n'a survécu, il a été impossible d'établir la lignée. Dans le second cas, le LTR de RSV qui a un spectre d'expression ubiquitaire a été utilisé comme promoteur. Pour ce transgène nous avons pu générer 6 fondateurs dont 3, R-ER 6, R-ER14 et R-ER 1189, ont été choisis pour l'établissement des lignées. Contrairement à SL-ER, chacune de ces lignées a pu être établie sans problème.

Nous avons démontré que ces 3 lignées R-ER présentent un patron d'expression des ARNm différents d'une lignée à l'autre. De même, la quantité d'ARNm détectée est variable d'un tissu à l'autre pour une même lignée. La lignée R-ER 6 présente le plus grand nombre de tissus où des messagers de *vpr*

ont été détectés. Parmi les organes étudiés, le cerveau, le thymus, le rein, le coeur et le poumon expriment des messagers de *vpr*. Le patron d'expression de la lignée R-ER 1189 est similaire à celui de la lignée R-ER 6, à la différence qu'aucun messager n'a été détecté dans le thymus. Finalement, le patron d'expression de la lignée R-ER 14 est différent des deux autres lignées étudiées. En effet, dans ce cas-ci les messagers de *vpr* ont été détectés uniquement dans la rate et le poumon. Ce dernier est le seul organe où il a été possible d'identifier des messagers de *vpr* pour les trois lignées étudiées. Il a déjà été démontré pour d'autres modèles d'animaux transgéniques que ces variations du patron d'expression pourraient être reliées au site d'intégration qui diffère d'une lignée à l'autre (Skowronski, 1991).

Même si le signal correspondant aux ARNm de *vpr* est assez fort dans certains tissus, il a été impossible de détecter la protéine Vpr par les techniques immunohistochimiques que nous avons utilisées. Ceci peut être dû à plusieurs raisons. Premièrement, il est possible que la protéine Vpr soit présente en trop faible quantité dans les tissus étudiés. Ceci nous paraît probable puisque les messagers de *vpr* détectés dans les tissus positifs l'ont été après une amplification par PCR, ce qui suggère un nombre peu élevé de copies de messagers dans ces tissus. De plus, les essais de détection des ARNm par hybridation *in situ* que nous avons tenté n'ont pas été concluants. Ceci confirme indirectement la faible quantité d'ARNm dans ces tissus. Deuxièmement, la protéine Vpr, lorsque produite, pourrait être rapidement dégradée en sous-produits et ainsi ne pas réagir avec les anticorps spécifiques. Finalement, il se pourrait que la protéine Vpr, présente à un certain niveau, ait un effet cytotoxique pour la cellule qui la produit. Ceci pourrait entraîner une lyse des cellules

produisant Vpr, ou encore, seules celles avec un faible niveau d'expression compatible avec la survie pourraient demeurer viables.

Malgré le fait que la protéine ne soit pas détectable, Vpr semble avoir induit des effets pathologiques chez les animaux transgéniques étudiés. Les résultats obtenus suggèrent surtout une atteinte des organes lymphoïdes. Cette atteinte se traduit notamment par une hyperplasie lymphoïde ou lymphoïde et myéloïde de la rate. Les ganglions lymphoïdes observés ont eux aussi présenté, dans la majorité des cas, une pathologie similaire. En général, on observe une diminution du nombre de follicules à partir de 6 ou 7 mois chez les souris normales. Chez les transgéniques, on observe plutôt une augmentation du nombre et de la grosseur des follicules lymphoïdes en fonction de l'âge des souris étudiées. De plus, un cas de lymphome et un cas de granulome inflammatoire ont été observés. L'hyperplasie lymphoïde et myéloïde ont été observée dans les 3 lignées R-ER étudiées, ce qui permet de confirmer que celles-ci ne sont pas dûes au site d'intégration du transgène, qui est différent d'une lignée à l'autre. Le patron d'expression du transgène varie lui aussi d'une lignée à l'autre, ce qui ne semble pas avoir d'effet sur les atteintes pathologiques observées.

Pour compléter cette évaluation pathologique, nous avons caractérisé les différentes populations cellulaires des rates hyperplasiées provenant des animaux transgéniques. Nous avons tout d'abord procédé par immunohistochimie classique sur des rates de 4 à 13 mois provenant des 3 lignées étudiées comparativement à des rates de souris contrôles du même âge. Ces observations ont permis de révéler que les populations lymphocytaires T, CD4+ et CD8+ dans les souris transgéniques, se comportent de façon similaire

aux contrôles normaux ou sont légèrement diminuées. Aucune différence majeure n'a été observée d'une lignée à l'autre. Pour ce qui est de la population des lymphocytes B, elle nous est apparue dans une majorité de cas légèrement augmentée, et ce, surtout pour les lignées R-ER 14 et R-ER 1189. Une telle augmentation n'a pas été observée pour la lignée R-ER 6 où la plupart des rates analysées ont plutôt montré une diminution de cette population. Finalement, la population macrophagique a, quant à elle, démontré une légère augmentation pour les 3 lignées. Nous n'avons observé aucune différence en fonction de l'âge et du sexe des animaux étudiés. (figure 10)

Les résultats ainsi obtenus par immunohistochimie sont d'ordre qualitatif. Malgré les quelques différences observées, ceux-ci ne nous ont pas permis de conclure que les populations lymphocytaires et macrophagique de la rate étaient perturbées chez les souris transgéniques comparativement aux souris normales. Pour cette raison, nous avons poursuivi par une analyse de cytofluorométrie afin de déterminer la proportion de chacune des populations cellulaires dans la rate pour les 3 lignées étudiées. Le décompte des populations lymphocytaires ainsi effectué sur des rates provenant des souris R-ER a démontré que les populations lymphocytaires T et B ne varient pas selon les mêmes tendances d'une lignée à l'autre (tableau 4). Or, on sait que les populations lymphocytaires peuvent varier chez un même individu selon l'âge, le sexe et surtout la condition physique (Boorman et al., 1990). Ce phénomène peut donc s'expliquer par l'analyse d'une cohorte d'animaux d'âge et de sexe différents pour chaque lignée. La faible disponibilité des animaux a limité la portée significative des données obtenues pour ces populations. En effet, seulement 4 rates d'animaux âgés de 9 à 14 mois pour chacune des lignées R-ER 6 et R-ER 14 et 3 rates d'animaux âgés de 6 à 9 mois de la lignée R-ER 1189 ont été utilisées dans cette étude. Les résultats

obtenus pour cette dernière lignée, où les animaux étudiés sont les plus jeunes, sont similaires à ceux obtenus pour les souris contrôles. Il est fort possible que des animaux plus âgés auraient permis d'obtenir des résultats se rapprochant des 2 autres lignées étudiées puisque l'hyperplasie lymphoïde observée semble s'accroître avec l'âge des animaux transgéniques. À l'inverse, chez les souris normales une atrophie des follicules lymphoïdes de la rate peut être observée. Pour les lignées R-ER 6 et R-ER 14, la population lymphocytaire B est plus élevée que chez les contrôles normaux, ce qui correspond à l'hyperplasie observée où c'est surtout cette population qui est augmentée. L'addition des 3 populations lymphocytaires pour chacune des lignées permet de remarquer une légère augmentation chez les souris transgéniques en comparaison avec les souris normales. Chez ces dernières la proportion de lymphocytes totaux est de 81,7 % alors que cette proportion est de 86,6, 89,25 et 87,5 % pour les lignées R-ER 1189, R-ER 6 et R-ER 14, respectivement. Encore une fois la réalisation d'un plus grand nombre d'expériences nous permettra de vérifier si cette augmentation est significative ou non. Par ailleurs, cette évaluation nous a permis de constater que la population macrophagique montre une augmentation significative dans les 3 lignées étudiées en comparaison avec les contrôles normaux. Cette hausse est en moyenne de 60 %, passant de 5,1 % pour les souris contrôles comparativement à 8,2-8,8 % pour les transgéniques. Une expérience similaire a été effectuée avec des rates provenant de souris porteuses du transgène *vpu* du VIH-1 dont l'expression est contrôlée par le même promoteur (RSV). Les animaux utilisés lors de cette expérience proviennent d'une population comparable à la population de souris R-ER en terme d'âge et sexe des animaux. Les résultats obtenus pour toutes les populations cellulaires considérées ne sont pas significativement différents des contrôles et permettent de confirmer que l'augmentation des macrophages observée pour les souris R-

ER est un phénomène réel et significatif. Il est intéressant de noter que les valeurs obtenues chez les souris transgéniques R-ER sont du même ordre peu importe l'âge moyen des souris et ne semble pas progresser avec l'âge.

En relation avec cette augmentation des macrophages, nous avons tenté de vérifier si la fonction phagocytaire était augmentée. Cette dernière peut être évaluée par la coloration histochimique de l'hémosidérine. Ce phénomène est difficile à mettre en évidence puisque l'hémosidérine est présente normalement dans les macrophages de la rate normale à un niveau qui peut varier selon le sexe de l'animal. Il a été démontré que chez les jeunes rats adultes, ce pigment est généralement plus proéminent chez la femelle que chez le mâle (Boorman et al., 1990). Nous avons tout de même pu remarquer un niveau plus élevé d'hémosidérine chez les animaux transgéniques étudiés provenant de la lignée R-ER 6 comparativement aux animaux contrôles (figure 11). Pour la lignée R-ER 14, une telle augmentation n'a pas été mise en évidence. L'examen d'un nombre plus élevé d'animaux nous permettrait de confirmer ces données.

Il est intéressant de noter que l'atteinte de la rate observée chez les souris transgéniques R-ER présente de nombreuses similitudes avec les changements rapportés par Falk et Stutte dans les rates des patients en phase précoce de SIDA (Falk et al., 1990). Les changements observés dans la rate de ces patients ont été divisés en deux catégories : les altérations lymphoïdes et les altérations du système mononucléé phagocytaire.

Chez les patients en phase précoce de la maladie, on remarque une hyperplasie des follicules lymphoïdes avec un élargissement des centres germinaux et des zones marginales. Ceci rappelle beaucoup les observations

effectuées pour les souris transgéniques (figure 8). Les follicules lymphoïdes sont surtout peuplés de lymphocytes B et on retrouve dans les rates des souris transgéniques provenant des lignées R-ER 6 et R-ER 14 une augmentation de du nombre de ces cellules (tableau 4). Chez les patients sidéens, la population des lymphocytes T, lorsqu'elle varie, tend vers une légère diminution dans les manchons lymphocytaires périartériolaires. L'immunohistochimie classique révèle que dans la majorité des cas chez les souris R-ER, la population des lymphocytes T fluctue peu mais une variation vers la baisse peut être observée dans certains cas ( tableau 3). Le décompte des populations lymphocytaires obtenu par analyse cytofluorométrique des rates des souris R-ER démontre une baisse de cette population dans la lignée R-ER 14 uniquement.

Pour ce qui est du système mononucléé phagocytaire, on observe une augmentation des macrophages chez les patients sidéens, indépendamment de la phase de la maladie. Chez les transgéniques une telle hausse est aussi observée. Cette augmentation, tout comme pour les patients, est du même ordre peu importe l'âge moyen des souris et elle ne semble pas progresser avec l'âge (tableau 3).

Concomitante avec une augmentation de la population des macrophages dans les rates des patients, on note une augmentation de la fonction phagocytaire telle que révélée par une augmentation de l' érythrophagocytose et de la sidérose. Chez les transgéniques, nous avons pu remarquer un niveau plus élevé d'hémosidérine sur des coupes de rates provenant de la lignée R-ER 6 ( figure 11). L'autre lignée utilisée pour cette étude, R-ER 14, n'a pas permis de confirmer une telle augmentation.



Malgré la hausse significative du nombre de macrophages ainsi que l'augmentation de la fonction phagocytaire dans la rate des patients infectés, il semble que le fonctionnement de ces derniers soit altéré. L'activation et la transformation des macrophages en cellules épithélioïdes sont perturbées. Chez les souris transgéniques, on soupçonne aussi un problème de fonctionnement des macrophages. Nous avons entre autres remarqué chez une souris l'apparition d'un granulome inflammatoire à cellules géantes multinucléées. Cette lésion apparaît lorsqu'un agent pathogène spécifique ou une substance inerte ne peut pas être digéré par les neutrophiles. Comme les souris transgéniques sont maintenues dans une unité stérile et sans pathogène, il est très peu probable, voire impossible, que cette souris ait été en contact avec un pathogène quelconque. Il est donc possible qu'un défaut de fonctionnement des macrophages ait entraîné la formation de ce granulome. Pour vérifier le fonctionnement véritable de ces cellules, des études basées sur l'infection de ces souris par différents pathogènes ont été entreprises. Ces études de challenge antigénique par des agents infectieux nous permettront de confirmer si les macrophages démontrent bel et bien un problème de fonctionnement lorsque confrontés à de tels agents. Il serait aussi intéressant de vérifier le contenu en lysosyme de ces cellules lorsqu'elles sont activées pour déterminer s'il est diminué comme c'est le cas chez les patients.

Il est bien connu que les monocytes/macrophages peuvent être infectés par le VIH-1. Lorsque ces cellules sont infectées elles démontrent peu ou pas de cytotoxicité et leur capacité phagocytaire est affaiblie. On note aussi une diminution de la chémotaxie ainsi qu'une réponse diminuée aux agents infectieux (Nielson et al., 1986; Poli et al., 1985; Roy et al., 1988). Ce dérangement de la fonction macrophagique peut être dû à un dérèglement des



cytokines sécrétées par les lymphocytes T infectés ou encore à l'action directe de l'infection par le VIH. Dans le cas des souris transgéniques, il se peut qu'un dérèglement de cytokines soit responsable de l'apparition de ce granulome inflammatoire. Une deuxième hypothèse est aussi possible. Comme Vpr est essentiel à l'infection productive des macrophages par le VIH (Balliet et al., 1994; Balotta et al., 1993; Hattori et al., 1990), il est probable que cette protéine y joue un rôle important dans ce type cellulaire en particulier. De plus, il est fortement proposé que Vpr interagisse avec des facteurs cellulaires (Zhao et al., 1994a), lui permettant d'assister la réplication du VIH dans les cellules primaires au repos. Il pourrait altérer l'expression de gènes cellulaires pour créer un milieu susceptible à l'initiation ou à la continuité de la réplication. Vpr, en agissant ainsi dans les macrophages pourrait être directement impliqué dans le problème de fonctionnement de ces cellules.

Jusqu'à présent, nous n'avons pas déterminé si Vpr est exprimé dans les macrophages. Mais même s'il ne l'est pas, il pourrait provenir de l'environnement extracellulaire sous forme circulante. Il a été démontré que Vpr est présent sous une forme active dans le sérum et le fluide cérospinal (Levy et al., 1994; Levy et al., 1995). Nous ne savons pas par contre si Vpr est relargué dans le milieu ou s'il est simplement libéré suite à la mort des cellules infectées. Dans notre cas, s'il est présent dans l'environnement extracellulaire, il pourrait pénétrer dans les cellules cibles et exercer son effet dans ces cellules. De plus, Vpr pourrait agir comme agent activateur des macrophages. La stimulation antigénique des macrophages induit l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité classe II (Benjamini et al.). Il serait intéressant de mesurer le taux d'expression de la molécule I-A chez les macrophages dans le but de confirmer cette hypothèse. Comme les macrophages sont issus de la moelle osseuse, l'étude de

l'expression du gène *vpr* dans les cellules précurseurs (GM-CSF ou M-CSF) de celle-ci pourrait nous donner des informations sur l'impact de ce gène sur la fonction macrophagique. L'établissement de lignée permanente de macrophages à partir de la moelle osseuse nous permettrait d'effectuer de telles études.

Chez les souris R-ER, en plus des nombreux cas d'hyperplasie lymphoïde, nous avons eu 4 cas d'hyperplasie myéloïde sur 40 au total (10 %). Chez la souris, la rate est un organe hématopoïétique. Elle produit des lymphocytes, érythrocytes, granulocytes, mégacaryocytes et plaquettes. Chez l'homme cette fonction s'observe dans la vie foetale. Dans la vie post-natale, lorsqu'elle se produit, on parle d'hématopoïèse extra-médullaire. Chez les patients infectés par le VIH-1 l'hématopoïèse extra-médullaire se produit dans 10% des cas. Ce qui est similaire aux observations effectuées chez les transgéniques.

Il a été démontré que Vpr induit la différenciation *in vitro* dans une lignée Rhabdomyosarcome (Levy et al., 1993). *In vivo*, si Vpr produit un tel effet, il est possible qu'il crée un déséquilibre dans les différentes populations cellulaires du côté des cellules plus différenciées. Ceci pourrait avoir pour effet d'augmenter la formation de nouvelles cellules hématopoïétiques pour combler les populations manquantes. Si un tel processus se produit, il serait possible que lorsque nous avons tenté de générer des souris transgéniques porteuses de ce gène, sous le contrôle du promoteur spécifique aux lymphocytes (SL3), l'expression du gène en trop grande quantité dans ces cellules, ait été fatale pour les souris. Nous avons obtenu 5 souris fondatrices qui étaient toutes chimères. Lorsque ces souris ont été croisées, très peu de descendance porteuse du transgène a été obtenue. Quatre souris positives ont été obtenue dans une des lignées, et toutes sont mortes à l'âge de 6 mois environ.

## 4.1 CONCLUSION

Les résultats obtenus lors de cette étude nous ont permis de constater que l'expression du gène *vpr* sous le contrôle du promoteur ubiquitaire RSV dans notre modèle de souris transgéniques induit une atteinte des organes lymphoïdes. Cette dernière se traduit par une hyperplasie lymphoïde ou lymphoïde et myéloïde de la rate. De plus, une augmentation du nombre de macrophages dans la rate a été noté, et ce, dans les 3 lignées étudiées. Ces observations anatomo-pathologiques ne sont pas reliées au site d'intégration du transgène, ni au patron d'expression des messagers de *vpr* qui est variable d'une lignée à l'autre. Par contre, cette atteinte de la rate chez les souris transgéniques présente de nombreuses similitudes avec ce qui a été rapporté chez le patient en phase précoce de l'infection au VIH.

**BIBLIOGRAPHIE**

**Ahmad, N. and Venkatesan, S.** (1988). Nef protein of HIV is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* 241, 1481-1485.

**Aiken, C., Konner, J., Landau, N.R., Lenburg, M.E. and Trono, D.** (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76, 853-864.

**Alizon, M., Wain-Hobson, S., Montagnier, L. and Sonigo, P.** (1986). Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. *Cell* 46, 63-74.

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

**Allan, J.S., Coligan, J.E., barin, F., McLane, M.F., Sodroski, J.G., Rosen, C.A., Haseltine, W.A., Lee, T.H. and Essex, M.** (1985). Major glycoprotein antigens that induce antibodies in AIDS patients are encoded by HTLV-III. *Science* 228, 1091-1094.

**Aloia, R.C., Jensen, F.C., Curtain, C.C., Mobley, P.W. and Gordon, L.M.** (1988). Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus. *P.N.A.S. USA* 85, 900-904.

**Amadori, A., Chiecobianchi, L., Collavo, D., Derossi, A., Faulknerville, G.P. and Zanovello, P.** (1988). HIV-mediated immunodepression- In vitro inhibition of lymphocyte- T proliferative response by ultraviolet-inactivated virus. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 46, 37-54.

**Arthur, L.O., Bess, J.W., Jr., Sowder II, R.C., Benveniste, R.E., Maim, D.L., Chermann, J.C. and Henderson, L.E.** (1992). Cellular proteins bound to immunodeficiency virus: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 258, 1935-1938.

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

**Backer, J.M., Mendola, C.E., Fairhurst, J.L. and Kovesdi, I.** (1991). The HIV-1 nef protein does not have guanine nucleotide binding, GTPase, or autophosphorylating activities. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 7, 1015-1020.

**Bagnarelli, P., Menzo, S., Valenza, A., Manzin, A., Giacca, M., Ancarani, F., Scalise, G., Varaldo, P.E. and Clementi, M.** (1992). Molecular profile of human immunodeficiency virus type 1 infection in symptomless patients with AIDS. *J. Virol.* 66, 7328-7335.

**Balliet, J.W., Kolson, D.L., Eiger, G., Kim, F.M., MCGann, K.A., Sunivasan, A. and 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, 623-631.

**Balotta, C., Lusso, P., Crowley, R., Gallo, R.C. and Franchini, G.** (1993). Antisense phosphorothiotate oligodeoxynucleotides targeted to the vpr gene inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in primary human macrophages. *J. Virol.* 67, 4409-4414.

**Baltimore, D.** (1995). The enigma of HIV infection. *Cell* 82, 175-176.

**Bartz, S.R., Rogel, M.E. and 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. *J. Virol.* 70, 2324-2331.

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

**Berrada, F., Ma, D., Michaud, J., Doucet, G., Giroux, L. and Kessous-Elbaz, A.** (1995). Neuronal expression of human immunodeficiency virus type 1 env proteins in transgenic mice; distribution in the central nervous system and pathological alterations. *J. Virol.* *69*, 6770-6778.

**Bhat, S., Spitalnik, S.L. and Silberberg** (1991). Galactosyl ceramide a derivative is an essential component of the neural receptor for the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120. *P.N.A.S. USA* *88*, 7131-7134.

**Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* *7*, 1513.

**Boorman, G.A., Eustis, S.L., Elwell, M.R., Montgomery, C.A. and McKenzie, W.F.** *Pathology of the Fischer rat. Reference and atlas.* 1-580 (Harcourt Brace Jovanovich, San Diego, California, 1990).

**Bourgoignie, J.J.** (1990). Renal complications of human immunodeficiency virus type 1. *Kidney Int.* *37*, 1571-1584.

**Brady, H.J.M., Pennington, D.J., Miles, C.G. and Dzierzak, E.A.** (1993). CD4 cell surface downregulation in HIV-1 nef transgenic mice is a consequence of intracellular sequestration. *EMBO J.* *12*, 4923-4932.

**Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M., S  n  ar, A.W., Warren, R. and Palmiter, R.D.** (1981). Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene. *Cell* *27*, 223-231.

**Castro, B.A., Cheng-Mayer, C., Evans, L.A. and Levy, J.A.** (1988). HIV heterogeneity and viral pathogenesis. *AIDS 2 supp.1*, S17-S27.

**Chanh, T.C., kanda, P. and kennedy, R.C.** (1988). Synthetic peptides homologous to HIV transmembrane glycoprotein suppress normal human-lymphocyte blastogenic response. *Cell. Immunol.* *111*, 77-86.

**Checroune, F., Yao, X.-J., Göttlinger, H.G., Bergeron, D. and Cohen, E.A.** (1995). Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1: Role of conserved regions within the p6 domain of Pr55gag. *J. of Acq. Immune Def. Synd. and Human Retrovirology* *10*, 1-7.

**Chen, M.-Y., Maldarelli, F., Karczewski, M.K., Willey, R.L. and Strebel, K.** (1993). Human immunodeficiency virus type 1 vpu protein induces degradation of CD4 in vitro: the cytoplasmic domain of CD4 contributes to vpu sensitivity. *J. Virol.* *67*, 3877-3884.

**Cherrington, J. and Ganem, D.** (1992). Regulation of polyadenylation in human immunodeficiency virus (HIV): contributions of promoter proximity and upstream sequences. *EMBO J.* *11*, 1513-1524.

**Choe, H., Farzan, M., SUn, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponarth, P.D., Wu, L., Mackay, C.R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C. and Sodroski, J.** (1996). The b-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* *85*, 1135-1148.

**Cochrane, A.W., Perkins, A. and Rosen, C.A.** (1990). Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus rev: relevance of nucleolar localization to function. *J. Virol.* *64*, 881-885.

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

**Cohen, E.A., Terwilliger, E.F., Jalinoos, Y., Proulx, J., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A.** (1990b). Identification of HIV-1 vpr product and function. *J. of Acq. Immune Def. Syndr.* *3*, 11-18.

**Cohen, E.A., Terwilliger, E.F., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A.** (1988). Identification of a protein encoded by the vpu of HIV-1. *Nature* *334*, 532-534.

**Cooper, D.A., Maclean, P., Donovan, B., Finlayson, R., Barnes, T.G., Michelmore, H.M., Brooke, P. and Penney, R.** (1985). Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* *1*, 537-540.

**Corallini, A., Altavilla, G., Pozzi, L., Bignozzi, F., Negrini, M., Rimessi, P., Gualandi, F. and Brabanti-Brodano, G.** (1993). Systemic expression of HIV-1 tat gene in transgenic mice induces endothelial proliferation and tumors of different histotypes. *Cancer Res.* *53*, 5569-5575.

**Corboy, J.R., Buzy, J.M., Zink, M.C. and Clements, J.E.** (1992). Expression directed from HIV long terminal repeats in the central nervous system of transgenic mice. *Science* *258*, 1804-1808.

**Cullen, B.R. and Greene, W.C.** (1989). Regulatory pathways governing HIV-1 replication. *Cell* *58*, 423-426.

**Cullen, B.R., Hauber, J., Campbell, K., Sodrosky, J.G., Haseltine, W.A. and Rosen, C.A.** (1988). Subcellular localization of the human immunodeficiency virus trans-acting art gene product. *J. Virol.* *62*, 2498-2501.

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

**Dedera, D., Hu, W., Vander Heyden, N. and Ratner, L.** (1989). Viral protein R of human immunodeficiency virus 1 and 2 is dispensable for replication and cytopathogenicity in lymphoid cells. *J. Virol.* *63*, 3205-3208.

**Deng, H.K., Choe, S., Ellmeier, W., Liu, R., Unutmaz, D., Burkhardt, M., di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R. and Landau, N.R.** (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* *381*, 661-666.



**Di marzo Veronese, F., Copeland, T.D., De Vico, A.L., Rahman, R., Oroszlan, S., Gallo, R.C. and Sarngadharan, M.G.** (1986). Characterization of highly immunogenic p66/P51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. *Science* *231*, 1289-1291.

**Dickie, P., Felser, J., Eckhaus, M., Bryant, J., Silver, J., Marinos, N. and Notkins, A.L.** (1991). HIV-associated nephropathy in transgenic mice expressing HIV-1 genes. *Virology* *185*, 109-119.

**Dickie, p., Ramsdell, F., Notkins, A.L. and Venkatesan, S.** (1993). Spontaneous and inducible epidermal hyperplasia in transgenic mice expressing HIV-1 nef. *Virology* *197*, 431-438.

**Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P. and Paxton, W.A.** (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* *381*, 667-673.

**Dumois, J.A., Vandervegt, F.P., Kopp, J.B., Marinos, N.J., Rooney, J.F. and Notkins, A.L.** (1995). Transplantation of skin from human immunodeficiency virus type-1 transgenic mice to normal congenic mice results in graft rejection. *J. of Inf. Dis.* *172*, 232-234.

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

**Falk, S., Müller, H. and Stutte, H.-J.** (1988). The spleen in acquired immunodeficiency syndrome (Aids). *Path. Res. Pract.* *183*, 425-433.

**Falk, S. and Stutte, H.J.** (1990). The spleen in HIV infection-morphological evidence of HIV-associated macrophage dysfunction. *Res. Virol* *141*, 161-169.

**Fauci, A.S.** (1988). The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* *239*, 617-622.

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

**Feinman, B. and Glatt, A.E.** (1988). La consultation médicale et le malade porteur d'une infection par le VIH. *J. of Palliative Care* 4, 38-41.

**Felber, B.K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T. and Pavlakis, G.N.** (1989). Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of viral mRNA. *P.N.A.S. USA* 86, 1495-1499.

**Felber, B.K. and Pavlakis, G.N.** (1993). Molecular biology of HIV-1: positive and negative regulatory elements important for virus expression. *AIDS 7 supp.1*, S51-S62.

**Feng, S. and Holland, E.C.** (1988). HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. *Nature* 334, 165-167.

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

**Fields, B.N. and Knipe, M.D.** *Virology* 1-2336 (New York Raven press, New York, 1990).

**Filice, G., Cereda, P.M. and Varnier, O.E.** (1988). Infection of rabbits with human immunodeficiency virus. *Nature* 335, 366-369.

**Fischer, A.G., Ensoli, B., Ivanoff, L., Chamberlain, M., Petterway, S., Ratner, L., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F.** (1987). The sor gene of HIV<sub>1</sub> is required for efficient virus transmission in vitro. *Science* 237, 888-893.

**Fischer, A.G., Feinberg, M.B., Josephs, S.F., Harper, M.E., Marselle, L.M., Reyes, G., Gonda, M.A., Aldovini, A., Debouk, C., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F.** (1986). The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* 320, 367-371.

**Fox, C.H., Tenner-Racz, K., Racz, P., Firpo, A., Pizzo, P.A. and Fauci, A.S.** (1991). Lymphoid germinal centers are reservoirs of human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J. Infect. Dis.* *164*, 1051-1057.

**Frankel, A.D., Brecht, D.S. and Pabo, C.O.** (1988). Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. *Science* *240*, 70-73.

**Frucht, D.M., Lamperth, L., Vicenzi, E., Belchor, J.H. and Martin, M.A.** (1991). Ultraviolet radiation increases HIV-long terminal repeat-directed expression in transgenic mice. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *7*, 729-733.

**Gabuzda, D.H., Lawrence, K., Langhoff, E., Terwilliger, E.F., Dorfman, T., Haseltine, W.A. and Sodroski, J.** (1992). Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Virol* *66*, 6489-6495.

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

**Garcia, J.A., Harrich, D., Soutanakis, E., Wu, F., Mituyasu, R. and Gaynor, R.B.** (1989). Human immunodeficiency virus type 1 LTR TATA and TAR region sequences required for transcriptional regulation. *EMBO J.* *8*, 765-778.

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

**Garcia, J.V., Alfano, J. and Miller, A.D.** (1993). The negative effect of human immunodeficiency virus type 1 nef on cell surface CD4 expression is not species specific and requires the cytoplasmic domain of CD4. *J. Virol.* *67*, 1511-1516.

**Garcia, J.V. and Miller, A.D.** (1991). Serine phosphorylation independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* *350*, 508-511.

**Gatignol, A., Kumar, A., Rabson, A. and Jeang, K.T.** (1989). Identification of cellular proteins that bind to the human immunodeficiency virus type 1 transactivation -responsive TAR element RNA. *P.N.A.S. USA* *8*, 7828-7832.

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

**Gorman, C.M., Merlino, G.T., Willingham, M.C., Pastan, I. and Howard, B.H.** (1982). The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukariotic cells by DNA-mediated transfection. *P.N.A.S. USA* 79, 6777-6781.

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

**Goudsmit, J., Debouck, C., Meloen, R.H., Smit, L., Bakker, M., Ascher, D.M., Wolff, A.V., Gibbs, C.J.J. and Gajdusek, D.C.** (1988). Human immunodeficiency virus type 1 neutralization epitope with conserved architecture elicits early type-specific antibodies in experimentally infected chimpanzees. *P.N.A.S. USA* 85, 4478-4482.

**Grandgenett, D.P. and Mumm, S.R.** (1990). Unraveling retrovirus integration. *Cell* 60, 3-4.

**Gras-Masse, H., Ameisen, J.C., Boutillon, C., Gesquiere, J.C., Vian, S., Neyrinck, J.L., Drobecq, H., Capron, A. and Tartar, A.** (1990). A synthetic protein corresponding to the entire vpr gene product from the human immunodeficiency virus HIV-1 is required by antibodies from HIV-infected patients. *Int. J. Pept. Protein Res.* 36, 219-226.

**Graves, M.C., Meidel, M.C., Pan, Y.-C.E., Manneberg, M., Lahen, H.-W. and Grüninger-Leitch** (1990). Identification of a human immunodeficiency virus-1 protease cleavage site within the 66,000 dalton subunit of reverse transcriptase. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 168, 30-36.

**Greene, W.C.** (1990). Regulation of HIV-1 gene expression. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 453-475.

**Greene, W.C.** (1991). The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *N. Eng. j. Med.* *324*, 308-317.

**Guy, B., Kieny, M.P., Riviere, Y., Le Peuch, C., Dott, K., Girard, M., Montagnier, L. and Lecocq, J.-P.** (1987). HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-bonding protein resembling an oncogene product. *Nature* *330*, 266-269.

**Hadzopoulos-Cladaras, M., Felber, B.K., Cladaras, C., Atganas-Sopoulos, A., Tse, A. and Pavlakis, G.N.** (1989). The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a cis-acting sequence in the env region. *J. Virol.* *63*, 1265-1274.

**Hammes, S.R., Dixon, E.P., Malim, M.H., Cullen, B.R. and Green, W.C.** (1989). Nef protein of human immunodeficiency virus type 1: evidence against its role as a transcriptional inhibitor. *P.N.A.S. USA* *86*, 9549-9553.

**Hansen, J., Schulze, T. and Moelling, K.** (1987). RNase H activity associated with bacterially expressed reverse transcriptase of human T-cell lymphotropic virus III/lymphadenopathy-associated virus. *J. Biol. Chem.* *262*, 12393-12396.

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

**Haseltine, W.A.** (1991). Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *Faseb* *5*, 2349-2360.

**Hattori, N., Michaels, F., Fargnoli, K., Marcon, L., Gallo, R.C. and Franchini, G.** (1990). The human immunodeficiency virus type 2 vpr gene is essential for productive infection of human macrophages. *P.N.A.S. USA* *87*, 8080-8084.

**Hauber, J., Malim, M.H. and Cullen, B.R.** (1989). Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol* *63*, 1181-1187.

**Hays, E.F., Bristol, G. and McDougall, S.** (1990). Mechanism of thymic lymphomagenesis by the retrovirus SL3-3. *Cancer Res.* *50*, 5631s-5635s.

**He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D.O. and 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<sup>cdc2</sup> activity. *J. Virol.* *69*, 6705-6711.

**Heinzinger, N.K., Bukrinsky, M.I., Haggerty, S.A., Ragland, A.M., Kewalramami, V., Lee, M., Gendelman, H., Ratner, L., Stevenson, M. and Emerman, M.** (1994). The vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing cells. *P.N.A.S. USA* *91*, 7311-7315.

**Hirsch, I., Salsaun, D., Brichacek, B. and Chermann, J.C.** (1992). HIV-1 cytopathogenicity-genetic difference between direct cytotoxic and fusogenic effect. *Virology* *1992*, 647-654.

**Ho, D.D., Neumann, A.V., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M. and Markowitz, M.** (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* *373*, 123-126.

**Hogan, B., Costantini, F. and Lacy, E.** *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual.* (New York, 1986).

**Höglund, S., Öhagen, A., Lawrence, K. and Gabuzda, D.** (1994). Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* *201*, 349-355.

**Iwakura, Y., Shiota, T., Tosu, M., Yoshioa, E., Hayashi, M., Nagata, T. and Shibuta, H.** (1992). The induction of cataracts by HIV-1 in transgenic mice. *AIDS* *6*, 1069-1075.

**Jacks, T., Power, M.D., Masiarz, F.R., Luciw, P.A., Barr, P.J. and Varmus, H.E.** (1988). Characterization of ribosomal frameshift in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* *331*, 280-283.

**Jolicoeur, P., Laperrière, A. and Beaulieu, N.** (1992). Efficient production of human immunodeficiency virus proteins in transgenic mice. *J. Virol.* *66*, 3904-3908.

**Jones, K., Luciw, P. and DCHANGE, N.** (1988). Structural arrangement of transcription control domain with the 5' untranslated leader regions of HIV-1 and HIV-2 promoters. *Genes Dev.* *2*, 1101-1114.

**Jones, K.A., kadonaga, J.T., Luciw, P.A. and Tjian, R.** (1986). Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. *Science* *232*, 755-759.

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

**Kerkau, T., Bacik, I., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., Hunig, T., Schimpl, A. and Schubert, U.** (1997). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class 1 molecules. *J. Exp. Med.* *185*, 1295-1305.

**Kestler, H.W., Ringler, D.J., Mori, K., Panicali, D.L., Sehgal, P.K., Daniel, M.D. and Desrosiers, R.C.** (1991). Importance of the nef gene for high virus loads and for development of AIDS. *Cell* *65*, 651-662.

**Khillan, J.S., Deen, K.C., Yu, S.H., Sweet, R.W., Rosenberg, M. and Westphal, H.** (1988). Gene transactivation mediated by tat gene of human immunodeficiency virus in transgenic mice. *Nucleic acid Res.* *16*, 1423-1430.

**Kim, S., Byrn, R., Groopman, J. and Baltimore, D.** (1989a). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection evidence for differential gene expression. *J. Virol.* *63*, 3708-3713.

**Kim, S., Ikeuchi, K., Byrn, R., Groopman, J. and Baltimore, D.** (1989b). Lack of a negative influence on viral growth by the nef gene of human immunodeficiency virus type 1. *P.N.A.S. USA* *86*, 9544-9548.

**Klatt, E.C. and Meyer, P.R.** (1987). Pathology of the spleen in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 3, 1050-1053.

**Klatzmann, D., Barré-Sinoussi, F., Dauguet, C., Vilmer, E., Griscelli, C., Brun-Vézinet, F., Rouzioux, C., Gluckmann, J.C., Chermann, J.C. and Montagnier, L.** (1984). Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for the helper inducer T lymphocytes. *Science* 225, 59-63.

**Klatzmann, D. and Gluckman, J.C.** (1986). HIV infection. Facts and hypothesis. *Immunol. Today* 7, 291-296.

**Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M.D., Martin, M.A. and Orenstein, J.M.** (1990). The human immunodeficiency virus type 1 specific-protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol.* 64, 621-629.

**Kolowski, M.R., Sandler, P., Lin, P.F. and Watson, A.** (1991). Brain-derived cells contain a specific binding site for gp120 which is not the CD4 antigen. *Brain Research* 553, 300-304.

**Kondo, E., Mammano, F., Cohen, E.A. and Göttlinger, H.G.** (1995). The p6<sup>gag</sup> domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of vpr into heterologous viral particles. *J. Virol.* 69, 2759-2764.

**Kopp, J.B., Klotman, M.E., Adler, S.H., Bruggeman, L.A., Dickie, P., Marinos, N.J., Eckhaus, M., Bryant, J.L., Notkins, A.L. and Klotman, P.E.** (1992). Progressive glomerulosclerosis and enhanced renal accumulation of basement membrane components in mice transgenic for human immunodeficiency type 1 genes. *P.N.A.S. USA* 89, 1577-1581.

**Kopp, J.B., Rooney, J.F., Woikenberg, C., Dorfman, N., Marinas, N.J., Bryant, J.L., Katz, S.I., Notkins, A.L. and Klotman, P.C.** (1993). Cutaneous disorders and viral gene expression in HIV-1 transgenic mice. *AIDS Res Human Retroviruses* 9, 267-275.



**Kowalski, M., Potz, J., Basiripour, L., Dorfman, T., Goh, W.C., Terwilliger, E., Dayton, A., Rosen, C., Haseltine, W. and Sodrosky, J.** (1987). Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency type 1. *Science* 237, 1351-1355.

**Kozarsky, K., Penman, M., Basiripour, L., Haseltine, W., Sodrosky, J. and Krieger, M.** (1989). Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J. of Acq. Immune Def. Syndr.* 2, 163-169.

**Kulaga, H., Folks, T.M., Rutledge, K. and Kindt, T.J.** (1988). Infection of rabbit T-cell and macrophage lines with human immunodeficiency virus. *P.N.A.S. USA* 85, 4455-4459.

**Lang, S.M., Weeger, M., Stahl-Hennig, C., Coulibaly, C., Hunsmann, G., Müller, J., Müller-Hermelink, H., Fuchs, D., Wachter, H., Daniel, M.M., Desrosiers, R.C. and Fleckenstein, B.** (1993). Importance of vpr for infection of Rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 67, 902-912.

**Lasky, L.A., Nakamura, G., Smith, D.H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Berman, P., Gregory, T. and Capon, D.J.** (1987). Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* 50, 975-985.

**Laspias, M.F., Rice, A.P. and Mathews, M.B.** (1990). Synergy between HIV-1 tat and adenovirus E1A is principally due to stabilization of transcriptional elongation. *Genes Dev.* 4, 2397-2408.

**Laurent-Crawford, A.G., Krust, B., Rivière, Y., Desgranges, C., Muller, S., Kieny, M.P., Dauguet, C. and Hovanessian, A.G.** (1993). Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9, 761-773.

**Lavallée, C., Yao, X.J., Ladha, A., Göttlinger, H., Haseltine, W.A. and Cohen, E.A.** (1994). Requirement of the Pr55<sup>gag</sup> precursor for incorporation of the vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. *J. Virol.* 68, 1926-1934.

**Lee, T.H., Coligan, J.E., Allan, J.S., McLane, M.F., Gropman, J.E. and Essex, M.** (1986). A new HTLV-III/LAV protein encoded by a gene found in cytopathic retroviruses. *Science* 231, 1546-1549.

**Lenburg, M.E. and Letau, N.R.** (1993). Vpu induced degradation of CD4: requirement for specific amino acid residues in the cytoplasmic domain of CD4. *J. Virol.* 67, 7238-7245.

**Leonard, J.M., Abramczuk, J.W., Pezen, D.S., Rutledge, R., Belcher, J.H., Hakim, F., Shearer, G., Lamperth, L., Travis, W., Fredrickson, T., Notkins, D.L. and Martin, M.A.** (1988). Development of disease and virus recovery in transgenic mice containing proviral DNA. *Science* 242, 1665-1670.

**Letvin, N.L. and King, N.W.** (1990). Immunologic and pathologic manifestation of the infection of Rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J. Acq. Immune Def. Syndr.* 3, 1023-1040.

**Levy, D.N., Fernetes, L.S., Williams, W.V. and Weiner, D.B.** (1993). Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus 1 vpr. *Cell* 72, 541-550.

**Levy, D.N., Rafaeli, y., McGreggor, R.R. and Weiner, D.B.** (1994). Serum vpr regulates productive and latency of human immunodeficiency virus type 1. *P.N.A.S. USA* 91, 10873-10877.

**Levy, D.N., Refaeli, Y. and Weiner, D.B.** in *Transacting functions of human retroviruses* (eds. Chen, I.S.Y., Koprowski, H., Srinivasan, A. & Vogt, P.K.) (Springer, 1995).

**Lindemann, D., Wilhelm, R., Renard, P., Althage, A., Zinkernagel, R. and Mous, J.** (1994). Severe immunodeficiency associated with a human immunodeficiency virus 1 Nef/3'-long terminal repeat transgene. *J. Exp. Med.* *179*, 797-807.

**Lorès, P., Boucher, V., Mackay, C., Pla, M., Von Boehmer, H., Jami, J., Barré-Sinoussi, F. and Weill, J.-C.** (1992). Expression of human CD4 in transgenic mice does not confer sensitivity to human immunodeficiency virus infection. *AIDS Res. and Hum. Retrov.* *8*, 2063-2071.

**Lu, Y.L., Spearman, P. and Ratner, L.** (1993). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R localization in infected cells and virions. *J. Virol.* *67*, 6542-6550.

**Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDougal, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A. and Axel, R.** (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* *47*, 333-348.

**Maldarelli, F., Chen, M.-Y., Willey, R.L. and Strebel, K.** (1993). Human immunodeficiency virus type 1 vpu protein is an oligomeric type 1 integral membrane protein. *J. Virol.* *67*, 5056-5061.

**Malim, M.H., Bohnlein, S., Hauber, J. and Cullen, B.R.** (1989). Functional dissection of the HIV-1 rev trans-activator-derivation of a trans-dominant repressor of rev function. *Cell* *58*, 205-214.

**Malim, M.H., Hauber, J., Fenrick, R. and Cullen, B.R.** (1988). Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* *335*, 181-183.

**Marciniak, R.A., Cainan, B.J., Frankel, A.D. and Sharp, P.A.** (1990). HIV tat protein trans-activates transcription in vitro. *Cell* *63*, 791-802.

**McCune, J., Kaneshima, H., Krowka, J., Namikawa, R., Outzen, H., Peault, B., Rabin, L., Shih, C.C., Lieberman, M., Weissman, I. and Shultz, L.** (1991). The scid-hu mouse: a small animal model for HIV infection and pathogenesis. *Ann. Rev. of Immunol.* 9, 399-429.

**McCune, J.M., Rabin, M.B., Lieberman, J.C.K., Reyes, G.R. and Weissman, I.L.** (1988). Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 53, 55-67.

**Meek, T.D., Dayton, B.D., Metcalf, B.W., Dreyer, G.B., Strickler, J.E., Gorniak, J.G., Rosenberg, M., Moore, M.L., Magaard, V.W. and Debouck, C.** (1989). Human immunodeficiency virus type 1 protease expressed in *Escherichia coli* behaves as a dimeric aspartic protease. *P.N.A.S. USA* 86, 1841-1845.

**Mehtali, M., Munschy, M., Ali-Hadji, D. and Kieny, M.P.** (1992). A novel transgenic mouse model for the in vivo evaluation of anti-human immunodeficiency virus type 1 drugs. *AIDS Res. and Hum. Retrov.* 8, 1959-1965.

**Mermer, B., Felber, B.K., Campbell, M. and Pavlaskis, G.N.** (1990). Identification of trans-dominant HIV-1 rev protein mutants by direct transfer of bacterially produced protein into human cells. *Nucleic Acid Res.* 18, 2037-2044.

**Mervis, R.J., Ahmad, N., Lillehoj, E.P., Raum, M.G., Chan, H.W. and Venkatesan, S.** (1988). The gag gene products of human immunodeficiency virus type 1: alignment within the gag open reading frame, identification of posttranslational modifications, and evidence for alternative gag precursors. *J. Virol.* 62, 3993-4002.

**Miller, M.D., Warmerdam, M.T., Gaston, I., Greene, W.C. and Feinberg, M.B.** (1994). The human immunodeficiency virus 1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J. Exp. Med.* 179, 101-113.

- Miller, M.D., Warmerdam, M.T., Page, K.A., Feinberg, M.A. and Greene, W.C.** (1995). Expressin of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nef gene during HIV-1 production increases progeny particle infectivity independently of gp160 viral entry. *J. Virol.* *69*, 579-584.
- Mills, J.** (1986). Pneumocystis carinii and toxoplasma gondii infections in patients with AIDS. *Rev. Infect. Dis.* *8*, 1001-1011.
- Mitsuyasu, R.T.** (1987). Clinical variants and staging of Kaposi's sarcoma. *Seminars in oncology* *14 suppl.3*, 13-18.
- Morrison, H.L., Yan Dai, H., Pederson, F.S. and Lenz, J.** (1991). Analysis of the significance of two single-base-pair differences in the SL3-3 and AKV virus long terminal repeats. *J. Virol.* *65*, 1019-1022.
- Morrow, C.D., Park, J. and Wakefield, J.K.** (1994). Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus. *American j. Phys.* *266*, C1135-C1156.
- Mosier, D.E., Gulizia, R.J., Maclsaac, P.D., Torbett, B.E. and Levy, J.A.** (1993). Rapid loss of CD4+ T cells in human-PBL-SCID mice by noncytopathic HIV isolates. *Science* *260*, 689-692.
- Mous, J., Heimer, E.P. and LeGrice, S.F.P.** (1988). Processing protease and reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1 polyprotein in Escherichia coli. *J. Virol* *62*, 1433-1436.
- Muesing, M.A., Smith, D.H., Cabradilla, C.D., Benton, C.V., Lasky, L.A. and Capon, D.J.** (1985). Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus. *Nature* *313*, 450-458.
- Navia, B.A., Jordan, B.D. and Price, R.W.** (1986). The AIDS dementia complex 1. Clin. Features. *Ann. Neurol.* *19*, 517-524.

**Niederman, T.M.J., Thiekan, B.J. and Ratner, L.** (1989). human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer. *P.N.A.S. USA* 86, 1128-1132.

**Nielsen, H., Kharazmi, A. and Faber, V.** (1986). Blood monocyte and neutrophil functions in the acquired immune deficiency syndrome. *Scandinavian. J. Immunol.* 24, 291-299.

**Ogawa, K., Shibata, R., Kiyomasu, A. and Adachi, A.** (1989). Mutational analysis of the human immunodeficiency virus vpr open reading frame. *J. Virol.* 63, 4110-4114.

**Pantaleo, G., Graziosi, C., Demarest, J.F., Butini, L., Montroni, M., Fox, C.H., Orenstein, J.M., Kotter, D.P. and Fauci, A.S.** (1993). HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 362, 355-358.

**Park, J. and Morrow, C.D.** (1991). Overexpression of the gag-pol precursor from human immunodeficiency virus type 1 proviral genomes results in efficient proteolytic processing in the absence of virion production. *J. Virol.* 65, 5111-5117.

**Pavlakakis, G.N. and Felber, B.K.** (1990). Regulation of expression of human immunodeficiency virus. *New Biologist* 2, 20-31.

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

**Pearl, L.H. and Taylor, W.R.** (1987). A structural model for the retroviral proteases. *Nature* 329, 351-354.

**Peng, C., Ho, B.K., Chang, T.W. and Chang, N.T.** (1989). Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. *J. Virol.* 63, 2550-2556.

**Piatak, M., Jr., Saag, M.S., Yang, L.C., Clark, S.J., Kappes, J.C., Luk, K.-C., Hahn, B.H., Shaw, G.M. and Lifson, J.D.** (1993). High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 259, 1749-1754.

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

**Poli, G., Bottazzi, B. and Bersani, L.** (1985). Monocyte function in intravenous drug abusers with lymphadenopathy syndrome and in patients with acquired immune deficiency syndrome: selective impairment of chemotaxis. *Clin. Exp. Immunol.* 62, 134-141.

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

**Portegies, P.** (1994). AIDS dementia complex: A review. *J. of Acq. Immune Def. Syndr.* 7 suppl.2, S38-S49.

**Price, R.W., Brew, B., Sidtis, J., Rosenblum, M., Scheck, A.C. and Cleary, P.** (1988). The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science* 239, 586-592.

**Rabson, A., Daugherty, D., Venkatesan, S., Boulukos, K. and Beun, S.** (1985). Transcription of novel open reading frames of AIDS retrovirus during infection of lymphocytes. *Science* 229, 1388-1390.

**Racz, P., Tenner-Racz, K., Van Vioten, F., Schmidt, H., Dietrich, M., Gluckman, J.C., Letvin, N.L. and Janosy, G.** (1990). Lymphatic tissue changes in Aids and other retrovirus infections: tools and insights. *Lymphology* 23, 85-91.

**Rappaport, J., Lee, S.-L., Khalili, K. and Wong-Staal, F.** (1989). The acidic amino-terminal region of HIV-1 tat protein constitutes an essential activating domain. *New. Biologist* 1, 101-110.

**Ratner, L., Haseltine, W., Patarca, R., Livak, K.J., Starcich, H., Josephs, S.F., Duran, E.R., Rafalski, J.A., Whitehorn, E.A., Baumeister, K., Ivanoff, L., Petteway, S.R., Pearson, M.I., Lautenberger, J.A., Papas, T.S., Ghrayeb, J., Chang, N.T., Gallo, R.C. and Wong-Staal, F.** (1985). Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* 313, 277-284.

**Re, F., Braaten, D., Kara Franke, E. and Luban, J.** (1995). Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34<sup>cdc2</sup>-cyclin B. *J. Virol.* 69, 6859-6864.

**Rogel, M.E., Wu, L.I. and Emerman, M.** (1995). The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J. Virol.* 69, 882-888.

**Rosen, C.A.** (1992). HIV regulatory proteins: potential targets for therapeutic intervention. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 8, 175-181.

**Rosen, C.A., Sodroski, J.G. and Haseltine, W.A.** (1985). The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLVIII/LAV) long terminal repeat. *Cell* 41, 813-823.

**Roy, S., Delling, U., Chen, C.-H., Rosen, C.A. and Sonnenberg, N.** (1990). A bulge structure in HIV-1 TAR RNA is required for TAT binding and TAT-mediated trans-activation. *Genes Dev.* 4, 1365-1374.

**Roy, S. and Wainberg, A.M.** (1988). Role of the mononuclear phagocyte system in the development of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *J. Leuk. Biol.* 43, 91-97.

**Ruben, S., Perkins, A., Sia, R., Burghoff, R., Haseltine, W.A. and Rosen, C.A.** (1989). Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* 63, 1-8.



**Sadaie, M.R., Rappaport, J., Benter, T., Josephs, S.F., Willis, R. and Wong-Staal, F.** (1988). Missense mutations in an infectious human immunodeficiency viral genome: functional mapping of tat and identification of the rev splice acceptor. *P.N.A.S. USA* 85, 9224-9228.

**Sakai, H., Shibata, R., Sakuragi, J.-I., Sakuragi, S., Kawamura, M. and Adachi, A.** (1993). Cell-dependant requirement of human immunodeficiency virus type 1 vif protein for maturation of virus particles. *J.Virol.* 67, 1663-1666.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** *Molecular Cloning : A laboratory manual.* 1989).

**Scadden, D.T., Zon, L.T. and Gropman, J.E.** (1989). Pathophysiology and management of HIV-associated hematologic disorders. *Blood* 74, 1455-1463.

**Schneider, J., Kaaden, O., Copeland, T.D., Oroszlan, S. and Hunsmann, G.** (1986). Shedding interspecies type seroreactivity of the envelope glycoprotein gp120 of the human immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.* 67, 2533-2538.

**Schubert, U., Schneider, T., Henklein, P., Pauli, G. and Porstmann, T.** (1992). Human immunodeficiency virus type 1 encoded-vpu protein is phosphorylated by casein kinase II. *Eur. J. Biochem.* 204, 875-883.

**Schubert, U. and Strebel, K.** (1994). Differential activities of the human immunodeficiency virus encoded vpu protein are regulated by phosphorylation and occur in different cellular compartments. *J. Virol.* 68, 2260-2271.

**Schwartz, S., Felber, B.K., Benko, D.M., Fenyö, E.-M. and Pavlakis, G.N.** (1990a). Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 64, 2519-2529.

**Schwartz, S., Felber, B.K., Fenyo, E.-M. and Pavlakis, G.N.** (1990b). Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J. Virol.* 64, 5448-5456.

**Sherman, P.A. and Fyfe, J.A.** (1990). human immunodeficiency virus integration protein expressed in *Escherichia coli* possesses selective DNA cleaving activity. *P.N.A.S. USA* 87, 5119-5123.

**Shiramizu, B., Herndier, B.G. and McGrath, M.S.** (1994). Identification of a common clonal human immunodeficiency virus associated lymphomas. *Cancer Res.* 54, 2069-2072.

**Skowronski, J.** (1991). Expression of a human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat/simian virus 40 early region fusion gene in transgenic mice. *J. Virol.* 65, 754-762.

**Skowronski, J., Parks, D. and Mariani, R.** (1993). Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene. *EMBO J.* 12, 703-713.

**Sodroski, J.G., Goh, W.C., Rosen, C., Dayton, A., Terwilliger, E. and Haseltine, W.A.** (1986). A second post transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. *Nature* 321, 412-417.

**Sodroski, J.G., Patarca, R., Rosen, C., Wong-Staal, F. and Haseltine, W.** (1985). Location of the trans-activating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* 229, 74-77.

**Somasundaran, M. and Robinson, H.L.** (1987). A major mechanism of human immunodeficiency virus-induced cell killing does not involve cell fusion. *J. Virol.* 61, 3114-3119.

**Sova, P. and Volsky, D.** (1993). Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and non-permissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 67, 6322-6326.

**Spina, C.A., Kwoh, T.J., Chowes, M.Y., Guatelli, J.C. and Richman, D.D.** (1994). The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes. *J. of Exp. Medicine* 179, 115-123.

**Stein, B.S., Gowda, S.D., Lifson, J.D., Penhallow, R.C., Bensch, K.G. and Engelman, E.G.** (1987). pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell* 49, 659-668.

**Strebel, K., Daugherty, D., Clouse, K., Cohen, D., Folks, T. and Martin, M.A.** (1987). The HIV 'A' (Sor) gene product is essential for virus infectivity. *Science* 238, 728-730.

**Strebel, K., Klimkait, T. and Martin, M.A.** (1988). A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* 241, 1221-1223.

**Subbramanian, R.A. and Cohen, E.A.** (1994). Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *J. Virol.* 68, 6831-6835.

**Tepper, R.E., Simon, D. and Lee, M.J.** (1994). Intestinal permeability in patients infected with human immunodeficiency virus. *Amer. J. Gastroenterol.* 89, 878-882.

**Terwilliger, E.F., Langoff, E., Gabuzda, D. and Haseltine, W.A.** (1991). Allelic variation in the effects of the nef gene on replication of human immunodeficiency virus type 1. *P.N.A.S. USA* 88, 10971-10975.

**Thomas, F.P., Chalk, C., Lalonde, R., Robitaille, Y. and Jolicoeur, P.** (1994). Expression of human immunodeficiency virus type 1 in the nervous system of transgenic mice leads to neurological disease. *J. Virol.* 68, 7099-7107.

**Toggas, S.M., Masliah, E., Rockenstein, E.M., Rall, G.F., Abraham, C.R. and Mucke, L.** (1994). Central nervous system damage produced by expression of the HIV-1 coat protein gp120 in transgenic mice. *Nature* 367, 188-193.

**Tristem, M., Marschall, C., Karpas, A. and Hill, F.** (1992). Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr. *EMBO J.* 11, 3405-3412.

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

**Tschachler, E., Buchow, H., Gallo, R.C. and Reitz, M.S.** (1990). Functional contribution of cysteine residues to the human immunodeficiency virus type 1 envelope. *J. virol.* *64*, 2250-2259.

**Varmus, H.** (1988). Retroviruses. *Science* *240*, 1427-1434.

**Vellutini, C., Horschowski, N., Philippon, V., Gambarelli, D., Nave, K.-A. and Filippi, P.** (1995). Development of lymphoid hyperplasia in transgenic mice expressing the HIV tat gene. *Aids Res. Hum. Retroviruses* *11*, 21-29.

**Vincent, M.J., Raja, N.U. and Jabbar, M.A.** (1993). Human immunodeficiency virus type 1 vpu protein induces degradation of chimeric envelope glycoproteins bearing the cytoplasmic domain in vpu-induced degradation in the endoplasmic reticulum. *J. virol.* *67*, 5538-5549.

**Vogel, J., Cepsoa, M., Tschacher, E., Napolitano, L.A. and Jay, G.** (1992). UV activation of human immunodeficiency virus gene expression in transgenic mice. *J. Virol.* *66*, 1-5.

**Vogel, J., Hinrichs, S.H., Napolitano, L.A., Ngo, L. and Jay, G.** (1991). Liver cancer in transgenic mice carrying the human immunodeficiency virus tat gene. *Cancer Res.* *51*, 6686-6690.

**Vogel, J., Hinrichs, S.H., Reynolds, R.K., Luciw, P.A. and Jay, G.** (1988). The HIV tat gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice. *Nature* *335*, 606-611.

**Von Schwedler, U., Song, J., Aiken, C. and trono, D.** (1993). Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells. *J. Virol.* *67*, 4945-4955.

**Wei, X., Ghosh, S.K., Taylor, M.E., Jonhson, V.A., Emini, E.A., Deutsch, P., Lyson, J.D., Bonhoeffer, S., Nowak, M.A., Hahn, B.H., Saag, M.S. and Shaw, G.M.** (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* *373*, 117-122.

**Welch, K., Finkbeiner, W., Alpers, C.E., Bleemenfeld, W., Davis, R.L., Smuckler, E.A. and Beckstead, J.H.** (1984). Autopsy findings in the acquired immune deficiency syndrome. *JAMA* 252, 1152-1159.

**Westervelt, P., Henkel, T., Trowbridge, D.B., Orenstein, J., Heuser, J., Gendelman, H.E. and Ratner, L.** (1992). Dual regulation of silent and productive infection in monocytes by distinct human immunodeficiency virus type 1 determinants. *J. Virol.* 66, 3935-3931.

**Wiley, C.A., Masliah, E., Morey, M., Lemere, C., DeTeresa, R., Grafe, M., Hansen, L. and Terry, R.** (1991). Neocortical damage during HIV infection. *Annals of Neurol.* 9, 651-657.

**Willey, R.L., Bonifacino, J.S., Potts, B.J., Martin, M.A. and Klausner, R.D.** (1988). Biosynthesis, cleavage and degradation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp160. *P.N.A.S. USA* 85, 9580-9584.

**Willey, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A. and Strebel, K.** (1992a). Human immunodeficiency virus type 1 vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* 66, 7193-7200.

**Willey, R.L., Maldarelli, F., Martin, M.A. and Strebel, K.** (1992b). Human immunodeficiency virus type 1 vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J. Virol.* 66, 226-234.

**Willey, R.L., Rutledge, R.A., Dias, S., Folks, T., Theodore, T., Buckler, C.E. and Martin, M.A.** (1986). Identification of conserved and divergent domains within the envelope gene of the acquired immunodeficiency retrovirus. *P.N.A.S. USA* 83, 5038-5042.

**Wills, J.W. and Craven, R.C.** (1991). Form, function, and use of retroviral gag proteins. *J. Acq. Imm. Defic. Syndr.* 5, 639-654.

**Wilson, W., Braddock, M., Adams, S.E., Rathjun, P.D., kingsman, S.M. and Kingsman, A.J.** (1988). HIV expression strategies: ribosomal frameshift is directed by a short sequence in both mammalian and yeast systems. *Cell* *55*, 1159-1169.

**Winters, M.A., Tan, L.B., Katzenstein, D.A. and Merigan, T.C.** (1993). Biological variation and quality control of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA quantitation by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* *31*, 2960-2966.

**Wong-Staal, F., Chanda, P.K. and Ghayeb, J.** (1987). Human immunodeficiency virus: the eight gene. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *3*, 33-39.

**Yao, X.J., Göttlinger, H., Haseltine, W.A. and Cohen, E.A.** (1992). Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu- facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J.Virol.* *66*, 5119-5126.

**Zazopoulos, E. and Haseltine, W.A.** (1993). Effect of nef alleles on replication of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* *194*, 20-27.

**Zhao, L.-J., Mukherjee, S. and Narayan, O.** (1994a). Biochemical mechanism of HIV-1 vpr function. Specific interaction with a cellular protein. *J. Biol. Chem.* *269*, 15577-15582.

**Zhao, L.-J., Wang, L., Mukherjee, S. and Narayan, O.** (1994b). Biochemical mechanism of HIV-1 Vpr function. Oligomerization mediated by the N-terminal domain. *J. Biol.Chem.* *269*, 32123-32137.

## REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais remercier mon directeur de maîtrise, le Dr. Allegría Kessous-Elbaz. Toujours disponible, elle a su m'apporter de judicieux conseils scientifiques. Son optimisme, sa rigueur scientifique, son très grand dévouement ainsi que ses encouragements constants ont facilité mon apprentissage et m'ont aidé à garder le moral tout au long de mon projet. Merci aussi à mon co-directeur de maîtrise, le Dr. François Coutlée pour ses encouragements.

Je tiens également à remercier les Dr. Djamel Ramla, Louis Lamarre et Marie-Christine Aubry pour leur expertise en pathologie. Mes remerciements vont aussi à Jean Grondin, Françoise Sakr, Fouad Berrada, Guy Charron et Chengwen Ren sans qui l'apprentissage des techniques de biologie moléculaire aurait été laborieuse. Merci à Danielle Morin, Denis Rodrigue et Monique Vasseur pour leur aide technique en histologie et en immunohistochimie. Merci à Stéphane Houle pour avoir su prendre soin de mes petites souris qui m'étaient bien précieuses.

De plus, j'aimerais remercier le Dr. Éric Cohen pour nous avoir fourni les plasmides utilisés pour générer les constructions des transgènes.

Au-delà de mon apprentissage scientifique, mes études graduées m'ont permis de rencontrer de nombreuses personnes avec qui j'ai pu me lier d'amitié. Un gros merci à tous ces bons amis: Azra Alvi, Jean-Luc Dionne, Nicolay Ferrari, Christian Lemaire et Jean Grondin pour n'en nommer que quelques-uns.

Pour terminer, toute ma gratitude va à mes parents qui ont su me donner le goût d'apprendre et de toujours me dépasser. À toi maman, toujours présente et tellement fière, tu a su m'apporter tout ton réconfort dans les moments difficiles. Merci aussi à mon grand frère Sylvain et mon ami Patrice pour leurs encouragements constants alors que j'en avais bien besoin.