

## Dialogue moléculaire entre rétrovirus humains et cellules permissives

par Christian A. Devaux

Laboratoire « Infections Rétrovirales et Signalisation Cellulaire », CRBM-CNRS UPR1086, Institut de Biologie-Faculté de Médecine, 4, boulevard Henri IV, 34060 Montpellier cedex 1. E-mail: devaux@crbm.cnrs-mop.fr

Reçu le 3 mai 1999

### RÉSUMÉ

Plusieurs rétrovirus exogènes sont les agents étiologiques de pathologies graves chez l'Homme. La réplication des rétrovirus est sous contrôle d'un grand nombre d'interactions hautement spécifiques entre protéines virales et cellulaires. La compréhension du « dialogue moléculaire » qui s'instaure entre le virus et la cellule-cible fait l'objet de nombreuses études qui doivent permettre d'élucider certains aspects encore obscurs de la physiopathologie des infections rétrovirales. De nombreuses études indiquent que les rétrovirus utilisent différents types de

récepteurs membranaires pour pénétrer dans les cellules de l'hôte et que le contact du virus avec ses récepteurs peut perturber l'homéostasie cellulaire. Dans cet article, je prendrai comme exemple le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1/HIV-1) pour illustrer par quels mécanismes ce virus asservit des cascades de signalisation cellulaire et, en particulier, comment il agit sur l'activation cellulaire et l'apoptose par l'intermédiaire d'interactions entre l'enveloppe virale et les récepteurs CD4 et CXCR4.

### SUMMARY Molecular cross-talk between human retroviruses and host cells

Several exogenous retroviruses are etiologic agents of severe human diseases. Retrovirus replication depends on a plethora of highly specific interactions with the host cell resulting in the subversion of multiple cellular signal transduction pathways. Understanding the molecular cross-talk that regulates the relationship between the virus and the host cell is currently the objective of many researchers and should contribute to gain insight into puzzling features of the physiopathology of retrovirus infections. A large body of recent data indicates that retroviruses utilize a variety of unrelated cell surface recep-

tors to initiate infection and modulate the homeostasis of the target cell following receptors binding. As an example, I discuss here the tremendous capacity of HIV-1 envelope glycoproteins to modulate kinases activation and nuclear translocation of transcription factors following binding to surface receptors CD4 and CXCR4. Viral envelope glycoproteins interaction with CD4 controls cell activation and proliferation required for virus production whereas interaction with CXCR4 favors apoptosis thereby decreasing the host immune response.

### INTRODUCTION SUR LES RÉTROVIRUS PATHOGÈNES POUR L'HOMME

Depuis le début des années 80, aucun groupe de virus n'a fait l'objet d'autant d'attention de la part des scientifiques que les rétrovirus. Même si cela peut paraître surprenant sinon effrayant pour certains, chaque individu

porte en lui des séquences rétrovirales endogènes (HERV) intégrées dans son génome et qu'il transmet par conséquent à sa descendance (Lower *et al.*, 1996). Bien que pouvant être à l'origine de pathologies graves (autoimmunité, cancers), les endorétrovirus jouent probablement un rôle biologique important favorable à l'évolution des génomes en favorisant la création de pseudogènes.

Par opposition aux endorétrovirus, les rétrovirus humains exogènes (il serait préférable de les qualifier de « rétrovirus rencontrés chez l'Homme » plutôt que de « rétrovirus humains », des infections interspécies par des virus de Primates étant l'hypothèse la plus communément admise pour situer l'origine de ces virus « humains ») sont retrouvés exclusivement chez les individus infectés et, plus précisément, dans les sous-populations cellulaires qui expriment les récepteurs aux protéines d'enveloppe du virus considéré. Une fois dans la cellule, la capacité du virus à se répliquer sera étroitement dépendante de « facteurs » cellulaires favorisant la réplication; le fait qu'une cellule soit infectable ne présume en rien du fait que l'infection soit « productive » (en d'autres termes qu'elle permette la génération de nouvelles particules virales infectieuses). Pour que le processus réplcatif puisse être réalisé en totalité, il est évident qu'un véritable « dialogue moléculaire » doit s'instaurer entre les protéines virales et les protéines de l'hôte. Les résultantes de ces informations déterminent le devenir des deux partenaires. L'approche réductionniste visant à comprendre la fonction de ces interactions entre protéines virales et cellulaires est une nécessité pour percer le mystère de la physiopathologie des infections rétrovirales.

Plusieurs rétrovirus exogènes ont été identifiés chez l'Homme comme étant les agents étiologiques de syndromes sévères. Il s'agit en particulier du *human immunodeficiency virus* (HIV) responsable d'un syndrome d'immunodéficience appelé SIDA, dont le premier représentant du type 1 (HIV-1) a été identifié en 1983 (Barré-Sinoussi *et al.*, 1983) et des « human T cell leukemia virus » (HTLV) à l'origine d'une pathologie dégénérative neuromusculaire, dont le premier représentant (HTLV-I) a été identifié en 1980 (Poiesz *et al.*, 1980). D'autres rétrovirus ne sont pour l'instant pas clairement associés à une pathologie; c'est le cas du HFV (« human foamy virus ») isolé pour la première fois chez l'homme en 1971 (Saïb & de Thé, 1996).

Les rétrovirus rencontrés chez l'Homme utilisent différents récepteurs membranaires (certains connus mais pour la plupart non encore identifiés) pour pénétrer dans les cellules permissives (Weiss & Taylor, 1995). C'est l'étude de ces interactions qui nous occupe depuis quelques années et plus particulièrement le problème de la signalisation induite par un contact entre les protéines d'enveloppe du virus et les molécules de surface des cellules de l'hôte. En effet, le choix des récepteurs n'est pas aléatoire comme on pourrait s'y attendre d'une molécule servant simplement à l'attachement d'un virus. En se glissant subrepticement dans « la peau » (l'enveloppe!) d'un rétrovirus, on pourrait presque qualifier ce choix de judicieux car il détermine toute une série d'événements qui seront critiques pour les relations entre le rétrovirus et la cellule hôte.

Une fois dans la cellule, la quantité d'informations échangées entre le virus et la cellule ne fait que croître avec, pour unique objectif, la prise de contrôle de la cellule par les protéines virales. L'exemple du HTLV-I est en cela très instructif. Le HTLV-I est un rétrovirus trans-

formant. Ce virus est responsable d'une maladie dégénérative du système nerveux central, la paraparésie spastique tropicale ou myélopathie associée à HTLV-I (TSP/HAM) et du développement d'une prolifération maligne des lymphocytes T, la leucémie T de l'adulte ou ATL (*Adult T cell Leukemia*). Les cellules transformées par HTLV-I sont généralement des cellules T CD4<sup>+</sup> présentant des anomalies chromosomiques. Ces cellules portent dans leur ADN une copie intégrée du génome de HTLV-I, confirmant l'implication du virus dans l'établissement de la transformation et de la prolifération cellulaire. Ce rétrovirus induit l'activation des cellules T grâce à la synthèse d'une protéine virale (Tax) impliquée dans l'activation de la transcription des gènes viraux (Yoshida, 1995; Mesnard & Devaux, 1999). Tax agit en modifiant l'activité de protéines cellulaires se fixant sur l'ADN. Ces facteurs cellulaires interagissant avec l'ADN appartiennent principalement à la famille des protéines ATF/CREB (*Activating Transcription Factor/cAMP Response Element Binding protein*) (Gachon *et al.*, 1998; Lemasson *et al.*, 1998). Tax agit également sur la transcription de gènes cellulaires par l'intermédiaire de facteurs comme NF- $\kappa$ B, SRF (*Serum Response Factor*), et des bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*).

Les conséquences des effets de Tax sur la transcription sont multiples. Par exemple, Tax perturbe la transcription de plusieurs gènes cellulaires impliqués dans l'activation et la division de la cellule. Ainsi, la transcription du gène de l'interleukine 2 (IL-2) est activée par Tax de même que la transcription de la chaîne  $\alpha$  de son récepteur (IL-2R $\alpha$ ) (Maruyama *et al.*, 1987), ce qui permet une forte prolifération cellulaire.

En agissant sur des bHLH, Tax est aussi capable de bloquer l'expression de certains gènes comme celui de la  $\beta$ -polymérase, enzyme impliquée dans la réparation de l'ADN (Jeang *et al.*, 1990). Le blocage de l'expression de cette enzyme pourrait engendrer une impossibilité pour la cellule de réparer l'ADN cellulaire endommagé, ce qui pourrait contribuer à l'apparition d'anomalies chromosomiques communément rencontrées dans les cellules d'ATL. Toujours par l'intermédiaire des bHLH, Tax induit une forte baisse de l'expression de la protéine p56<sup>lck</sup> (Lemasson *et al.*, 1997), une tyrosine kinase qui joue un rôle essentiel dans la transduction de signaux consécutifs à une liaison entre un ligand extracellulaire et la molécule transmembranaire CD4. Ceci provoque vraisemblablement un déficit fonctionnel de la cellule infectée.

En fait, chaque rétrovirus a développé un ensemble de stratégies différentes et extrêmement élaborées visant à prendre le contrôle de la cellule qu'il infecte en conservant cependant un certain état d'équilibre avec l'hôte. En effet, si l'objectif est la réplication virale (chez un individu qui sert de réservoir avant transmission à d'autres individus), un rétrovirus doit scrupuleusement respecter certaines règles de survie. Si l'on prend l'exemple du HIV, il paraît évident que ce virus ne peut pas se permettre de supprimer son hôte trop rapidement, sachant que le HIV ne se transmet pas très efficacement (par rapport à d'autres virus). De même, ce virus doit gérer

une situation conflictuelle car, d'une part, sa réplication nécessite une activation cellulaire mais, d'autre part, l'activation cellulaire est synonyme de réponse immunitaire défavorable à sa réplication. Ces quelques exemples démontrent l'ambiguïté des relations entre rétrovirus et cellule-cible.

## LE HIV-1 AGENT ÉTIOLOGIQUE DU SIDA

Le HIV-1 appartient à la famille des rétrovirus et à la sous-famille des lentivirus. Il présente une organisation génomique caractéristique des rétrovirus avec trois gènes de structure (*gag*, *pol*, *env*). Il a cependant une particularité : celle de disposer d'un nombre relativement élevé de séquences qui codent pour des protéines de régulation. Ceci suggère qu'il est parfaitement adapté aux cellules dans lesquelles il se réplique et que de nombreuses interactions entre protéines cellulaires et virales doivent exister (ce qui est largement confirmé par les données récentes de nombreux laboratoires), gérant des relations complexes entre le virus et la cellule-cible. Ce virus est responsable du SIDA. Les cellules infectées par HIV-1 sont principalement des cellules CD4<sup>+</sup>. Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> infectés par HIV-1 peuvent contenir de une à plusieurs copies intégrées du génome viral dans leur ADN.

Depuis quelques années, il est clairement démontré que le HIV peut infecter les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes. Dans ces cellules, la rétrotranscription peut se réaliser, cependant le cycle viral est incomplet (Stevenson *et al.*, 1990; Zack *et al.*, 1990). En effet, on ne peut mettre en évidence ni intégration, ni transcription, ni production virale. Le génome viral est retrouvé sous forme de copies ADN extrachromosomiques. Bien que cette forme virale soit instable, elle peut jouer le rôle d'ADN « intermédiaire » pouvant servir de support à un événement d'intégration sous réserve que la cellule fasse l'objet d'une stimulation exogène (activation *in vitro* par le TcR/CD3, par un ester de phorbol etc., ou par des protéines d'enveloppe du HIV-1 comme nous le verrons plus loin; activation *in vivo* spécifique d'antigène ou induite par certains ligands de CD4). Ceci suggère très fortement que cette étape nécessite, pour se réaliser, la présence de « facteurs » cellulaires inducibles (qui restent encore à définir).

En 1994, nous avons démontré que l'interaction entre les protéines d'enveloppe du HIV-1 et les molécules CD4 à la surface de la cellule-cible provoque une activation cellulaire caractérisée par une translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Benkirane *et al.*, 1994). Cette « DNA-binding protein » est connue pour influencer fortement l'expression des gènes du HIV. Il est par conséquent évident que le virus s'est adapté de façon à maîtriser sa réplication en agissant sur l'activation cellulaire par l'intermédiaire de ses protéines d'enveloppe *via* le récepteur CD4. Depuis l'obtention de ces premiers résultats, nous avons démontré que cette activation est suffisante pour induire une production virale à partir de cellules quiescentes infectées par HIV-1 (ces cellules étant non productrices de virus en l'absence de stimulation exogène) (Briant *et al.*, 1996).

## RÔLE DU COMPLEXE CD4-P56<sup>lck</sup> DANS L'ACTIVATION CELLULAIRE T

La molécule CD4 est une glycoprotéine monomorphe de 58 kDa, constituée d'une partie extracellulaire de 370 acides aminés, d'un segment transmembranaire de 21 acides aminés et d'un court domaine intracytoplasmique comportant 40 résidus. La partie extracellulaire du CD4 est organisée en quatre domaines distincts. La structure tridimensionnelle du CD4 humain est connue (Wang *et al.*, 1990). La conformation du premier domaine de CD4 présente une forte similitude avec celle des régions variables des immunoglobulines et contient des régions de type « hypervariable » CDR1 (a.a. 15-26), CDR2 (a.a. 42-49), et CDR3-like (a.a. 85-97). Les mécanismes mis en jeu dans la signalisation CD4 sont complexes dans la mesure où, suivant le type de ligand utilisé, la nature du signal transmis à la cellule diverge et peut soit inhiber, soit activer la transcription.

La molécule CD4 est un récepteur cellulaire indispensable pour le HIV (plus précisément, pour la majorité des virus HIV-1 et HIV-2), lequel se lie au CD4 par l'intermédiaire de sa glycoprotéine d'enveloppe, la gp120. Il a été mis en évidence un site de haute affinité ( $K_d = 10^{-9}$ M) pour la gp120 dans le premier domaine du CD4, au niveau de la région CDR2-like. La molécule CD4 peut jouer un rôle important dans la transduction de signaux qui modulent l'activation cellulaire T et, par conséquent, la transcription des gènes du HIV.

Il a été démontré depuis plusieurs années que l'association entre la molécule transmembranaire CD4 et la protéine intracytoplasmique p56<sup>lck</sup> est requise pour permettre la transduction de signaux CD4-dépendants aux cellules T (Veillette *et al.*, 1989). La p56<sup>lck</sup> est une protéine tyrosine kinase (PTK) de la famille *src*. Les protéines de la famille *src* sont des kinases intracellulaires de 55-62 kDa dépourvues de domaine extracellulaire et transmembranaire, qui participent à la transmission ou la modulation de signaux extracellulaires. Ces protéines, impliquées dans le contrôle de la croissance et de la différenciation cellulaire, possèdent un acide myristique N-terminal permettant leur ancrage à la membrane plasmique, un domaine SH2/SH3 régulateur, un domaine catalytique et un domaine unique N-terminal conférant des propriétés biologiques spécifiques à chacune de ces kinases. L'activation de la kinase p56<sup>lck</sup> nécessite son interaction avec la portion intracytoplasmique de la molécule CD4 ainsi que la formation de dimères de CD4.

## ACTION DES GLYCOPROTÉINES D'ENVELOPPE DU HIV-1 SUR L'ACTIVATION CELLULAIRE T

Au cours des dernières années, plusieurs équipes dont la nôtre ont démontré que la molécule CD4 peut jouer un rôle important dans la transduction de signaux qui modulent l'activation cellulaire T, et par conséquent, la transcription des gènes du HIV. En effet, la liaison entre les glycoprotéines d'enveloppe du HIV-1 et la molécule

CD4 induit la translocation nucléaire du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans des cellules exprimant la molécule CD4 « wild type », cet effet étant inhibé par du CD4 recombinant soluble. Enfin ce signal n'est pas induit dans des cellules exprimant une molécule CD4 tronquée de son domaine cytoplasmique. Nous avons pu mettre en évidence une corrélation étroite entre la capacité d'une cellule à transloquer le facteur NF- $\kappa$ B suite à une interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe du HIV et CD4 et un début rapide de transcription des gènes viraux (Benkirane *et al.*, 1994).

Comme on pouvait s'y attendre, il a été démontré par la suite que la portion intracytoplasmique de la molécule CD4 et la p56<sup>lck</sup> sont impliquées dans l'activation cellulaire induite par HIV. Nous avons observé que la liaison entre les glycoprotéines d'enveloppe du HIV-1 et CD4 induit une forte activation des facteurs NF- $\kappa$ B et AP-1 dans les cellules exprimant simultanément CD4 et p56<sup>lck</sup> (Briant *et al.*, 1998a). En absence d'une de ces deux molécules, aucune activation de ces facteurs de transcription n'a été observée. Ceci est à rapprocher d'autres observations qui suggèrent des conclusions similaires (Merzouki *et al.*, 1995). Enfin, nous avons observé une activation de la MAP kinase (ERK-2) dans des lignées lymphoblastoïdes CD4<sup>+</sup> exposées à du HIV-1 inactivé par la chaleur (Benkirane *et al.*, 1995).

Progressivement les expériences rapportées par les différents groupes impliqués dans cette recherche livrent de nouvelles informations sur la cascade de signalisation concernée. Des travaux du groupe de P. Pitha (Popik & Pitha, 1996) ont démontré l'activation de la kinase Raf-1 (inducteur de la voie ERK) sous l'effet de la liaison entre les glycoprotéines d'enveloppe du HIV-1 et CD4. Cette activation serait soit p21<sup>Ras</sup>-indépendante (d'après P. Pitha), soit p21<sup>Ras</sup>-dépendante (Flory *et al.*, 1998). Nous avons récemment confirmé l'implication de la voie ERK dans les phénomènes d'activation cellulaire induits par la fixation des glycoprotéines d'enveloppe du HIV-1 au récepteur CD4. L'implication des kinases MEK et ERK a été prouvée à l'aide de lignées lymphoblastoïdes transfectées, exprimant constitutivement les kinases MEK-1 ou ERK-1 soit « wild type » soit sous forme de mutants transdominants négatifs (Briant *et al.*, 1998b). Ces résultats ont été confirmés par ailleurs (Popik *et al.*, 1998).

En parallèle, nous avons accumulé un certain nombre d'informations sur l'activation de facteurs de transcription induite après une stimulation cellulaire par les glycoprotéines d'enveloppe du HIV-1. Mises en commun avec les résultats de plusieurs groupes américains, canadiens, et européens, nos données indiquent que l'interaction entre les protéines d'enveloppe du HIV-1 et les molécules CD4 active une cascade de signalisation (CD4>p56<sup>lck</sup>>(p21<sup>Ras</sup>?)>p74<sup>Raf</sup>>p45<sup>MEK</sup>) qui aboutit à l'activation de ERK. L'activation de p42<sup>ERK</sup> débouche d'une part sur l'activation du facteur AP-1 (*via* la cascade p42<sup>ERK</sup>>Fos[+Jun]>AP-1) qui contrôle l'expression de gènes cellulaires (comme celui codant pour l'IL-2, interleukine impliquée dans la prolifération cellulaire) et d'autre part sur la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B, qui

régule l'expression de gènes cellulaires et l'activation du promoteur du HIV-1 (Voir la Fig. 1).

De nombreuses questions persistent au sujet du mécanisme moléculaire qui lie p42<sup>ERK</sup> à NF- $\kappa$ B. Pour l'instant, cinq membres de la famille NF- $\kappa$ B ont été caractérisés (p65 [RelA], Rel [c-Rel], RelB, p50[NFKB1]/précurseur p105 et p52[NFKB2]/précurseur p100) (Baeuerle & Baltimore, 1996). Les protéines de la famille NF- $\kappa$ B sont séquestrées dans le cytoplasme des cellules non stimulées sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. La séquestration de NF- $\kappa$ B est due aux interactions non covalentes entre le domaine d'homologie à Rel et les motifs ankryne de protéines inhibitrices appelées I- $\kappa$ B, cette liaison masquant la séquence de localisation nucléaire du facteur de transcription. Sept molécules sont répertoriées dans cette sous-famille (I- $\kappa$ B $\alpha$ , I- $\kappa$ B $\beta$ , I- $\kappa$ B $\gamma$ , I- $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3, p100, p105). Le complexe le mieux

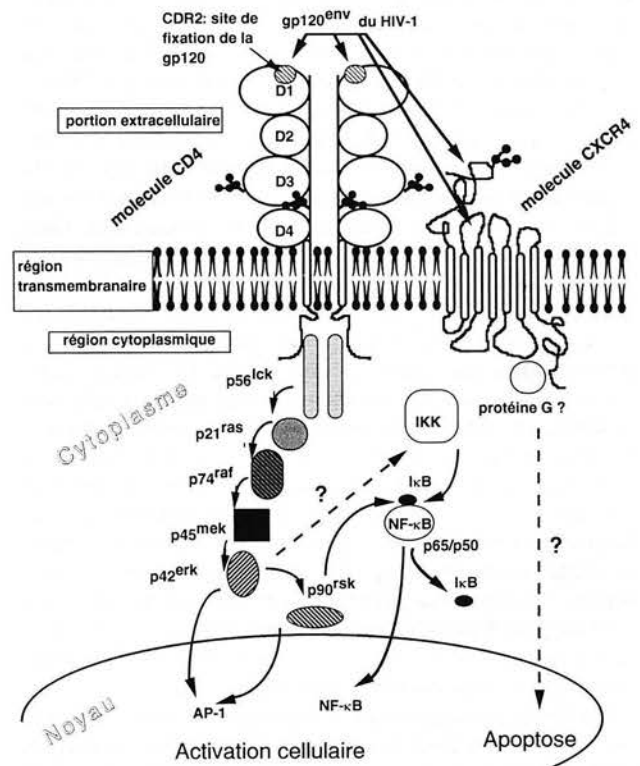


FIG. 1. — Modèle proposé pour l'activation des cascades de signalisation induites après interaction entre les glycoprotéines d'enveloppe du HIV-1 et les récepteurs membranaires CD4 et CXCR4 à la surface de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Ce qui est indiqué par « gp120<sup>env</sup> du HIV-1 » fait référence aux glycoprotéines d'enveloppe exprimées à la surface d'une cellule infectée, mais également à des complexes entre de la gp120 soluble et des anticorps anti-gp120 ou des glycoprotéines d'enveloppe exprimées à la surface d'un virus inactivé par la chaleur. Le schéma illustre le processus d'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B par la voie CD4. La cascade de signalisation qui conduit à la mort cellulaire programmée par la voie CXCR4 reste à déterminer en totalité (elle n'implique cependant pas les kinases p38MAPK, JNK et PI-3K). Il faudra également définir comment s'établit la hiérarchie des signaux qui, suivant le cas, vont activer la cellule ou l'orienter vers la mort.

étudié dans le mécanisme d'activation du promoteur HIV par NF- $\kappa$ B, est l'hétérodimère p50/p65 qui est normalement associé à I- $\kappa$ B $\alpha$  dans le cytoplasme cellulaire. Lors d'une activation cellulaire, I- $\kappa$ B $\alpha$  est phosphorylée sur les sérines Ser32 et Ser36 puis subit une ubiquitinylation des Lys21 et Lys22 avant d'être dégradée par le protéasome 26S, libérant ainsi le complexe p50/p65 qui se dirige vers le noyau cellulaire pour finalement aller se fixer sur l'ADN et agir sur la transcription.

Ce n'est que très récemment, avec le clonage de plusieurs protéines nouvelles qu'a pu être imaginée la cascade d'événements qui conduisent à l'activation de NF- $\kappa$ B par des signaux CD4-dépendants (Stancovski & Baltimore, 1997). En réponse à des signaux extracellulaires (tels que le TNF $\alpha$  et IL-1), la protéine NIK (*NF- $\kappa$ B-inducing kinase*) est activée, laquelle s'associe avec et phosphoryle des protéines kinases appelées IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  (pour I- $\kappa$ B kinase) dans le complexe I- $\kappa$ B kinase qui phosphoryle ensuite I- $\kappa$ B libérant de ce fait le facteur NF- $\kappa$ B. Il faut également noter que certains signaux (UV, phorbol-acétate TPA) activent directement le complexe I- $\kappa$ B kinase. Enfin, il faut faire mention d'un site consensus Ser-X-X-X-Ser d'activation par les MAP kinase kinase dans IKK $\alpha$  et IKK $\beta$ , ce site étant également retrouvé dans I- $\kappa$ B. Il est par conséquent probable que p42<sup>ERK</sup> peut induire l'activation de protéines de la famille des IKK. Alternativement, ERK pourrait également agir sur I- $\kappa$ B par l'intermédiaire de la kinase p90<sup>rk</sup> qui peut phosphoryler I- $\kappa$ B et qui dans d'autres modèles expérimentaux, a été montrée comme étant sous contrôle de p42<sup>ERK</sup> (Ghoda L. *et al.*, 1997). Des expériences sont en cours dans notre laboratoire pour trancher entre ces deux hypothèses qui sont illustrées de manière schématique par la Figure 1. Nos résultats préliminaires suggèrent que la molécule IKK $\alpha$  pourrait être impliquée dans cette cascade.

### **RÔLE DU CO-RÉCEPTEUR CXCR4 DANS LA SIGNALISATION CELLULAIRE INDUITE PAR LES GLYCOPROTÉINES D'ENVELOPPE DU HIV-1**

Plusieurs données de la littérature indiquent que la molécule CD4 est nécessaire mais pas suffisante pour rendre les cellules CD4<sup>+</sup> susceptibles à l'infection par HIV-1. C'est seulement en 1996 (Feng *et al.*, 1996; Alkhatib *et al.*, 1996) qu'ont été identifiés ces co-récepteurs indispensables au processus d'infection. Alors que la fusine (ultérieurement rebaptisée CXCR4) est le co-récepteur des virus HIV-1 ayant un tropisme pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, les récepteurs aux chimiokines (dont le représentant principal est CCR5) sont les co-récepteurs des HIV-1 ayant un tropisme pour les macrophages. Ces molécules qui permettent la fusion (d'où le nom de fusine donné à la première molécule décrite) appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques. Il est admis depuis de nombreuses années que les récepteurs à 7 domaines transmembranaires peuvent,

par l'intermédiaire des protéines G hétérotrimériques et d'autres messagers intracellulaires, moduler l'activité de récepteurs tyrosines kinases, de récepteurs couplés à des tyrosines kinases, ou des tyrosines kinases après contact avec leurs ligands respectifs. Tous les résultats récents convergent pour indiquer que les ligands naturels des co-récepteurs du HIV-1 (SDF-1 pour CXCR4 et RANTES pour CCR5) possèdent ces propriétés. Enfin, les glycoprotéines d'enveloppe de HIV-1 peuvent également induire des signaux cellulaires *via* CXCR4 et CCR5.

Plusieurs équipes viennent de démontrer que les glycoprotéines d'enveloppe de virus à tropisme macrophagique peuvent induire des signaux cellulaires majeurs *via* CCR5 (activation de ERK et p38<sup>MAPK</sup>) alors que les glycoprotéines d'enveloppe de virus à tropisme lymphocytaire n'induisent pas de signaux cellulaires *via* CXCR4 pouvant activer ERK ou p38<sup>MAPK</sup> (l'activation de PYK-2 a cependant été observée) (Davis *et al.*, 1997; Popik & Pitha, 1998; Popik *et al.*, 1998; Kinter *et al.*, 1998). Des résultats de notre groupe (Briant *et al.*, 1998a) et du groupe de Pitha (Popik & Pitha, 1998), indiquent que CXCR4 n'est pas nécessaire à la transduction de signaux qui conduisent à l'activation de NF- $\kappa$ B après contact entre les glycoprotéines du HIV-1 et CD4. Par contre CXCR4 s'avère être un récepteur dont l'importance physiopathologique va vraisemblablement s'imposer prochainement. En effet, nous avons démontré récemment (Guillerm *et al.*, 1998) la capacité de particules virales HIV-1 à induire l'apoptose (mort programmée) de cellules T exprimant un CD4 « wild type » mais également un CD4 dépourvu de portion intracytoplasmique. Ces résultats confirment ceux rapportés par une équipe de l'Institut Pasteur (Jacotot *et al.*, 1997). Si l'on raisonne suivant le principe qui veut que l'apoptose corresponde à l'induction d'un programme de mort consécutif à un signal membranaire, ces résultats suggèrent que la molécule CD4 ne peut pas être responsable de l'induction du signal de mort. Cette fonction pourrait être attribuée à CXCR4.

Plusieurs équipes, dont la nôtre, viennent de confirmer cette hypothèse (Hesselgesser *et al.*, 1998; Herbein *et al.*, 1998; Biard-Piechaczyk *et al.*, 1999). Grâce à l'utilisation de transfectants stables qui expriment soit CD4 (une forme tronquée de la portion intracytoplasmique), soit CXCR4, soit les deux molécules, nous venons de démontrer que l'expression de surface de CXCR4 est nécessaire pour la transduction d'un signal apoptotique à la suite de l'interaction entre des protéines d'enveloppe du HIV exprimées à la surface d'une cellule « inductrice » et les molécules CXCR4 de la cellule cible.

### **CONSÉQUENCES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA SIGNALISATION INDUITE PAR L'ENVELOPPE DU HIV-1 VIA CD4 ET CXCR4**

Actuellement le rôle que l'on pourrait attribuer au récepteur CD4 en dehors de la phase d'infection, est un rôle d'activateur de réplication virale (mais cet effet est

certainement fortement restreint par la modulation du CD4 de surface dans les cellules infectées productrices de particules) et surtout un rôle facilitateur de cycle viral dans les cellules infectées quiescentes qui ne produisent pas de virus en l'absence de stimuli exogènes (et qui expriment des molécules CD4 en surface).

Afin d'étudier l'effet de l'interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe du HIV-1 et CD4 sur la réactivation de l'infection et la transcription des gènes viraux, nous avons exposé des PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) quiescentes, préalablement infectées, à différents stimuli incluant du HIV-1 inactivé par la chaleur (iHIV-1), des complexes gp120-anticorps anti-gp120, et de la gp120 soluble. Ces expériences démontrent que la liaison iHIV-1/CD4 et gp120/CD4 (sous réserve d'un «cross-linking» de la gp120 par des anticorps anti-gp120) est suffisante pour induire la translocation nucléaire des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 dans les PBMCs quiescentes. Au-delà de la translocation de facteurs de transcription, il est possible de démontrer que les cellules quiescentes infectées s'activent après un contact avec du iHIV-1 (ceci se traduit par une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation cellulaire classiques tels que les molécules HLA-DR et CD25, ainsi que par l'entrée des cellules en phase mitotique) (Briant *et al.*, 1996). La conséquence de cette activation de cellules quiescentes infectées est qu'elle entraîne l'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte et une production rapide de particules virales. La spécificité de cette réaction est démontrée par la préincubation de la préparation iHIV-1 avec du CD4 soluble : dans ce cas, aucune activation n'est observée. Un résultat équivalent (réactivation virale) est obtenu lorsque le CD4 est complexé avec des anticorps anti-CD4 dirigés contre le site de fixation de la gp120 (boucle CDR2) alors que des anticorps anti-CD4 dirigés contre la boucle CDR3 n'induisent pas de réactivation du virus (Than *et al.*, 1997 ; Briant *et al.*, 1999).

Contrairement à ce qu'on a pu penser pendant une période, le virus infectieux, même à forte concentration, ne semble pas induire de réactivation virale. Dans une certaine mesure ce résultat est attendu puisque le virus infectieux n'infecte pas de façon productive des cellules T quiescentes (Briant *et al.*, 1999). Par contre, ce résultat implique que les glycoprotéines d'enveloppe exprimées à la surface des particules infectieuses ne se fixent pas aux molécules CD4 de la même manière que des glycoprotéines d'enveloppe exprimées en surface de cellule infectées, en surface de iHIV-1, ou des gp120 recombinantes complexées par des anticorps anti-gp120 puisque *in fine*, le résultat sur l'activation cellulaire diffère suivant le type de ligand de CD4 utilisé. Ceci reste un paradoxe qu'il faudra bien élucider prochainement (l'explication réside peut-être dans des interactions avec des sites secondaires de CD4, dans des changements de conformation de CD4, ou des interactions avec d'autres molécules de surface).

Chez des patients séropositifs, la présence de complexes immuns circulants gp120-anticorps anti-gp120 (dans le cas, par exemple, d'une charge virale plasma-

tique élevée et d'une forte réponse sérologique) pourrait entraîner une activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Dans ce contexte, l'activation lymphocytaire ainsi générée pourrait réactiver le cycle viral dans les lymphocytes T infectés quiescents de ces patients. De même, des auto-anticorps anti-CD4 pourraient induire une réactivation du virus. Nos résultats expérimentaux et ceux d'équipes américaines soutiennent totalement cette hypothèse.

Le rôle que l'on pourrait attribuer au récepteur CXCR4 en dehors de la phase d'infection, est certainement un rôle d'inducteur d'apoptose. Les glycoprotéines d'enveloppe exprimées sur une cellule infectée ont la capacité d'induire l'apoptose de cellules (infectées ou non) qui expriment la molécule CXCR4 (il peut s'agir par exemple de lymphocytes CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>/CXCR4<sup>+</sup> mais également de cellules cytotoxiques CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>), avec pour conséquence immédiate de ce phénomène une diminution rapide des défenses de l'individu infecté.

Au cours de l'infection par HIV-1, le tropisme du virus change. Au début de l'infection sont rencontrés, chez les patients, des virus ayant un tropisme pour des cellules de phénotype CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>/CCR5<sup>+</sup>. Ceci pourrait correspondre à une phase invasive lente prenant en compte un système immunitaire quantitativement intact et fonctionnellement efficace. Progressivement, on assiste à une augmentation de la charge virale (les glycoprotéines d'enveloppe du HIV-1 pouvant alors agir par l'intermédiaire de CD4 et CCR5 sur l'activation cellulaire produisant de ce fait un effet de type «boucle de rétrocontrôle positif») et à une évolution vers des variants à tropisme CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>/CCR5<sup>-</sup>.

L'acquisition d'un tropisme préférentiel pour le récepteur CXCR4 s'explique par l'accumulation de mutations dans la boucle V3 de la gp120 qui favorisent les interactions avec ce récepteur (Ohagen *et al.*, 1999). Ces variants sont très agressifs (leur phénotype se caractérisant par l'induction de syncytiums) et, en l'absence de traitement médicamenteux efficace, détruisent complètement le système immunitaire (Penn *et al.*, 1999). L'implication, dans cette destruction du système immunitaire de l'hôte, d'un processus d'apoptose dépendant de la molécule CXCR4, pourrait prochainement devenir une évidence qui bouleversera notre connaissance de la physiopathologie de l'infection par HIV-1.

**Remerciements.** – Je tiens à remercier tout particulièrement Madame le Professeur M. M. Loubatières, Secrétaire Générale de la Filiale Montpelliéraine de la Société de Biologie, pour m'avoir accordé le privilège de présenter les résultats de notre équipe dans le cadre des manifestations organisées pour la célébration du cent cinquantième de la Société de Biologie. Mes remerciements vont évidemment à l'ensemble de mes collaborateurs du laboratoire « Infections rétrovirales et signalisation cellulaire » qui contribuent, depuis presque une décennie, à la notoriété de l'équipe; bien que trop nombreux pour les nommer tous ici, qu'ils sachent cependant qu'il est extrêmement facile et très agréable de représenter un groupe dont l'efficacité et la motivation sont sans faille. Enfin, comme sans argent il est impossible de confronter ses hypothèses au verdict de l'expérimentation, je ne saurais oublier le soutien permanent du CNRS, de l'ANRS, de la FRM (programme Sidaction) et de l'ARC à nos multiples projets.

## BIBLIOGRAPHIE

- Alkatib G., Combadière C., Broder C. C., Feng Y., Kennedy P. E., Murphy P. M. & Berger E. A., CC CKR5: a Rantes, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science*, 1996, 272, 1955-1958.
- Baeuerle P. A. & Baltimore D., NF- $\kappa$ B: Ten years after *Cell*, 1996, 87, 13-20.
- Barré-Sinoussi F., Chermann J.-C., Rey F., Nugeyre M.-T., Chamaret S., Gruest J., Dautet C., Axler-Blin C., Brun-Vezinet F., Rouzioux C., Rozenbaum W. & Montagnier L., Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from patients at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science*, 1983, 220, 868-870.
- Benkirane M., Jeang K.-T. & Devaux C., The cytoplasmic domain of CD4 plays a critical role during the early stages of HIV infection in T-cells. *EMBO J.*, 1994, 13, 5559-5569.
- Benkirane M., Schmid-Antomarchi H., Littman D. R., Hirn M., Rossi B. & Devaux C., The cytoplasmic tail of CD4 is required for inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by antibodies that bind to the immunoglobulin CDR3-like region in domain 1 of CD4. *J. Virol.*, 1995, 69, 6904-6910.
- Biard-Piechaczyk M., Robert-Hebmann V., Richard V., Roland J., Hipskind R. A., Devaux C., Cell membrane-associated human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins induce apoptosis of cells expressing the chemokine receptor CXCR4. *Blood*, 1999, soumis pour publication.
- Briant L., Coudronnière N., Robert-Hebmann V., Benkirane M. & Devaux C., Binding of HIV-1 virions or gp120-anti-gp120 immune complexes to HIV-1-infected quiescent peripheral blood mononuclear cells reveals latent infection. *J. Immunol.*, 1996, 156, 3994-4004.
- Briant L., Robert-Hebmann V., Acquaviva C., Pelchen-Matthews A., Marsch M. & Devaux C., The protein tyrosine kinase p56lck is required for triggering NF- $\kappa$ B activation upon interaction of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120 with cell surface CD4. *J. Virol.*, 1998a, 72, 6207-6214.
- Briant L., Robert-Hebmann V., Sivan V., Brunet A., Pouyssegur J. & Devaux C., Involvement of extracellular signal-regulated kinase module in HIV-mediated CD4 signals controlling activation of nuclear factor- $\kappa$ B and AP-1 transcription factors. *J. Immunol.*, 1998b, 160, 1875-1885.
- Briant L., Reynes J., Coudronnière N., Benezech J.-P. & Devaux C., HIV-1 reactivation in resting PBMCs of infected adults upon *in vitro* CD4 cross-linking by ligands of the CDR2-loop in the extracellular domain 1. *J. AIDS Hum. Retrovir.*, 1999, 21, 9-19.
- Davis C. B., Dikic I., Unutmaz D., Hill C. M., Arthos J., Siani M. A., Thompson D. A., Schlessinger J. & Littman D. R., Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J. Exp. Med.*, 1997, 186, 1793-1798.
- Feng Y., Broder C. C., Kennedy P. E. & Berger E. A., HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 1996, 272, 872-876.
- Flory E., Weber C. K., Chen P., Hoffmeyer A., Jassoy C. & Rapp U. R., Plasma membrane-targeted Raf kinase activates NF- $\kappa$ B and human immunodeficiency virus type 1 replication in T lymphocytes. *J. Virol.*, 1998, 72, 2788-2794.
- Gachon F., Peleraux A., Thebaud S., Dick J., Lemasson I., Devaux C., & Mesnard J.-M., CREB-2, a cellular CRE-dependent transcription repressor, functions in association with Tax as an activator of the human T-cell leukemia virus type 1 promoter. *J. Virol.*, 1998, 72, 8332-8337.
- Ghoda L., Lin X. & Greene W. C., The 90-kDa ribosomal S6 kinase (pp90rsk) phosphorylates the N-terminal regulatory domain of I kappa B alpha and stimulates its degradation *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 21281-21288.
- Guillerm C., Coudronnière N., Robert-Hebmann V. & Devaux C., Delayed human immunodeficiency virus type 1-induced apoptosis in cells expressing truncated forms of CD4. *J. Virol.*, 1998, 72, 1754-1761.
- Herbein G., Mählkecht U., Batliwalla F., Gregersen P., Pappas T., Butler J., O'Brien W. A. & Verdin E., Apoptosis of CD8<sup>+</sup> T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature*, 1998, 395, 189-194.
- Hesselgeser J., Taub D., Baskar P., Greenberg M., Hoxie J., Kolson D. L. & Horuk R., Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 $\alpha$  is mediated by the chemokine receptor CXCR4. *Curr. Biol.*, 1998, 8, 594-598.
- Jacotot E., Krust B., Callebaut C., Laurent-Crawford A. G., Blanco J. & Hovanessian A. G., HIV-1 envelope glycoproteins-mediated apoptosis is regulated by CD4 dependent and independent mechanisms. *Apoptosis*, 1997, 2, 47-60.
- Jeang K.-T., Widen S. G., Semmens IV O. J. & Wilson S. H., HTLV-1 trans-activator protein, Tax, is a transrepressor of the human  $\beta$  polymerase gene. *Science*, 1990, 247, 1082-1084.
- Kinter A., Catanzaro A., Monaco J., Ruiz M., Justement J., Moir S., Arthos J., Oliva A., Ehler L., Mizell S., Jackson R., Ostrowski M., Hoxie J., Offord R. & Fauci A. S., CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4<sup>+</sup> T cells: role of signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 11880-11885.
- Lemasson I., Robert-Hebmann V., Hamaia S., Duc Dodon M., Gazzolo L. & Devaux C., Transrepression of lck gene expression by human T-cell leukemia virus type 1-encoded p40tax. *J. Virol.*, 1997, 71, 1975-1983.
- Lemasson I., Thébaud S., Sardet C., Devaux C., & Mesnard J.-M., Activation of E2F-mediated transcription by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein in a p16INK4A-negative T-cell line. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 23598-23604.
- Lower R., Lower J. & Kurth R., The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93, 5177-5184.
- Maruyama M., Shibuya H., Harada H., Hatakeyama M., Seiki M., Fujita T., Inoue J.-I., Yoshida M. & Taniguchi T., Evidence for aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop by HTLV-1-encoded p40x and T3/Ti complex triggering. *Cell*, 1987, 48, 343-350.
- Merzouki A., Patel P., Cassol S., Ennaji M., Tailor P., Turcotte F. R., O'Shaughnessy M. & Arella M., HIV-1gp120/160 expressing cells up-regulate HIV-1 LTR directed gene expression in a cell line transfected with HIV-1 LTR-reporter gene constructs. *Cell. Mol. Biol.*, 1995, 41, 445-452.
- Mesnard J.-M. & Devaux C., Multiple control levels of cell proliferation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *Virology*, 1999, 257, 277-284.
- Ohagen A., Ghosh S., He J., Huang K., Chen Y., Yuan M., Osathanondh R., Gartner S., Shi B., Shaw G. & Gabuzda D., Apoptosis induced by infection of primary brain cultures with diverse human immunodeficiency virus type 1 isolates: evidence for a role of the envelope. *J. Virol.*, 1999, 73, 897-906.
- Penn M. L., Grivel J.-C., Schramm B., Goldsmith M. A. & Margolis L., CXCR4 utilization is sufficient to trigger CD4<sup>+</sup> T cell depletion in HIV-1-infected human lymphoid tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 663-668.
- Poiesz B. J., Ruscetti F. W., Gazdar A. F., Bunn P. A., Minna J. D. & Gallo R. C., Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77, 7415-7419.
- Popik W. & Pitha P. M., Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 induces association of lck and Raf-1 by a Ras-independent pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 1996, 16, 6532-6541.
- Popik W. & Pitha P. M., Early activation of mitogen-activated protein kinase kinase, extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and c-Jun N-terminal kinase in response to binding of simian immunodeficiency virus to Jurkat T cells expressing CCR5 receptor. *Virology*, 1998, 252, 210-217.
- Popik W., Hesselgeser J. E. & Pitha P. M., Binding of human immunodeficiency virus type 1 to CD4 and CXCR4 receptors differentially regulates expression of inflammatory genes and activates the MEK/ERK signal pathway. *J. Virol.*, 1998, 72, 6406-6413.

- Saïb A. & de Thé H., Molecular biology of the human foamy virus. *J. AIDS Hum. Retrovir.*, 1996, 13, 254-260.
- Stancovski I. & Baltimore D., NF- $\kappa$ B activation: the I $\kappa$ B kinase revealed? *Cell*, 1997, 91, 299-302.
- Stevenson M., Stanwick T. L., Dempsey M. P. & Lamonica C. A., HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J.*, 1990, 9, 1551-1560.
- Than S., Oyaizu N., Tetali S., Romano J., Kaplan M. & Pahwa S., Upregulation of human immunodeficiency virus (HIV) replication by CD4 cross-linking in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected adults. *J. Virol.*, 1997, 71, 6230-6232.
- Veillette A., Bookman M. A., Horak E. M., Samelson L. E. & Bolen J. B., Signal transduction through CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Nature*, 1989, 338, 257-259.
- Wang J., Yan Y., Garrett T. P. J., Liu J., Rodgers D. W., Garlick R. L., Tarr G. E., Husain Y., Reinherz E. L. & Harrison S. C., Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature*, 1990, 348, 411-418.
- Weiss R. A. & Taylor C. S., Retrovirus receptors. *Cell*, 1995, 82, 531-533.
- Yoshida M., HTLV-I oncoprotein Tax deregulates transcription of cellular genes through multiple mechanisms. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1995, 121, 521-528.
- Zack J. A., Arrigo S. J., Weitsman S. R., Go A. S., Haislip A. & Chen I. S. Y., HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes : molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell*, 1990, 61, 213-222.
-