

La protéine Tat du VIH-1 induit la production d'IL-10 par le monocyte humain : implication de la voie PKC et de la voie calcique

par Bennasser Yamina¹, Contreras Xavier¹, Moreau Marc², Leclerc Catherine², Badou Abdallah¹ et Elmostafa Bahraoui¹

¹Laboratoire d'Immuno-Virologie et

²Unité Mixte de Recherche 5547 CNRS, Université Paul Sabatier 118, route de Narbonne, 31062 Toulouse

Reçu le 22 mars 2001

RÉSUMÉ

Chez les patients infectés par le VIH-1 en phase asymptomatique, la quantité d'IL-10 produite, cytokine fortement immunosuppressive, est associée à l'évolution de la maladie vers le stade SIDA. Dans cette étude nous montrons que la protéine Tat induit la production de l'IL-10 par les monocytes humains du sang périphérique. L'analyse des voies de transduction du signal montre que la protéine kinase C joue un rôle cru-

cial dans cette induction et que la stimulation par Tat a pour conséquence d'activer la translocation nucléaire du facteur de transcription NFκB dont l'activation semble nécessaire pour la production d'IL-10. Nous avons également observé par des techniques de microscopie confocale et microspectrofluorimétrie que Tat induit une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire du monocyte.

SUMMARY HIV-1 Tat protein induces IL-10 production by human monocyte : involvement of the PKC and calcium pathways

In asymptomatic patients infected by HIV-1, the level of IL-10, a cytokine with immunosuppressive activity, is associated with the course of HIV infection towards AIDS. We show that HIV-1 Tat, a viral protein secreted by infected cells, induces IL-10 production by human peripheral blood monocytes. The analysis of the signal transduction pathways strongly

suggests that the protein kinase C may play an essential role in this induction. Stimulation by Tat induces nuclear translocation of the transcription factor NFκB the activation of which seems to be necessary for IL-10 production. Using microspectrofluorimetry and confocal microscopy, we also show that Tat induces a calcium influx.

Chez les patients infectés par le VIH, on observe avant le déclin du nombre de lymphocytes T CD4 un dysfonctionnement de la réponse immunitaire (Clerici *et al.*, 1993). Les mécanismes cellulaires et moléculaires de cet affaiblissement du système immunitaire ne peuvent être expliqués uniquement par l'effet lytique du virus sur les cellules infectées. Le VIH pourrait échapper à la défense du système immunitaire en utilisant d'autres stratégies impliquant des facteurs viraux et cellulaires.

L'un des candidats potentiels serait la protéine Tat du VIH, protéine de 14 Kda connue pour son activité transcriptionnelle sur le génome viral (Laspia *et al.*, 1989). Tat participe également à la pathogenèse liée au VIH (Sabatier *et al.*, 1991), elle est retrouvée dans le serum de patients infectés par le VIH : elle est sécrétée par les cel-

lules infectées (Ensoli *et al.*, 1993) et peut interagir avec d'autres cellules qu'elles soient infectées ou non (Mann *et al.*, 1991). Ainsi, Tat active les cellules T CD4 quiescentes, les rendant sensibles à l'infection par le VIH notamment en augmentant l'expression des corécepteurs aux chimiokines CXCR4 et CCR5 (Huang, *et al.*, 1998). La protéine Tat par une action directe sur les cellules du système immunitaire perturbe la réaction immunitaire, particulièrement la réponse cellulaire : d'une part en inhibant les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I comme cela a été rapporté avec les lignées Jurkat (Purvis *et al.*, 1992 ; Howcroft *et al.*, 1993) ; en inhibant les cellules NK (Natural Killer) (Zocchi *et al.*, 1998), mais aussi en inhibant la production d'interleukine-12, cytokine-clé qui induit la différenciation des

cellules précurseurs en cellules TH1, par le monocyte et les cellules dendritiques en bloquant par compétition les canaux calciques de type L (Ito *et al.*, 1998). En parallèle, la protéine Tat induit la production de l'IL-6, cytokine qui, en induisant l'IL-4, permet la mise en place d'une réponse de type Th2 (Scala *et al.*, 1994). Cette dérégulation de la production de cytokines contribue à l'inefficacité du système immunitaire face au virus. A partir d'une étude réalisée sur plus de 1 000 patients (Clerici *et al.*, 1994), l'équipe de Shearer a identifié 4 catégories de patients selon la capacité des lymphocytes T CD4 à répondre à différents stimuli (mitogène, alloantigène, antigène du virus influenza, peptides de l'enveloppe virale du VIH-1). La perte progressive de ces fonctions est associée à l'évolution vers le stade SIDA. Chez ces patients, on observe une importante production d'IL-10 par les cellules mononucléées du sang périphérique, alors que cette cytokine n'est pas produite, ou faiblement, par les cellules de personnes non infectées, production dont le niveau serait d'autant plus élevé que les patients ont une fonction T CD4 altérée. De plus, l'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-IL-10 permet de restaurer une réponse T CD4+ efficace dirigée notamment contre des antigènes spécifiques tels que les peptides de l'enveloppe du VIH (Clerici *et al.*, 1994). La production de l'interleukine 10 médiée par le VIH, une cytokine à activité immunosuppressive (Moore *et al.*, 1993) contribuerait à l'évolution de l'infection vers le stade SIDA.

Le but de notre étude est de : 1) déterminer si Tat pourrait avoir un effet direct sur le monocyte humain, cible du VIH, mais aussi élément-clé du système immunitaire, en induisant la production de l'IL-10 et 2) mettre en évidence les mécanismes intracellulaires responsables de cette production.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Isolement des monocytes

Les cellules mononucléées du sang périphérique sont isolées sur gradient de Ficoll/Paque à partir de sang de donneurs sains non infectés par le VIH obtenu auprès du centre de transfusion sanguine. Les monocytes sont isolés par adhérence et mis en culture dans du milieu Iscove (60 %)/AimV (30 %) (Gibco BRL) complété par du sérum de veau fœtal (10 %), pénicilline (100 unités/ml) et streptomycine (100 µg/ml) à 37°C, 5 % CO₂, en atmosphère humide.

Protéine Tat du VIH-1 recombinante

La protéine recombinante, obtenue par clonage chez *E. coli* de l'ADNc codant pour la protéine Tat de la souche VIH-1 LAI, nous a été fournie par l'Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA. Les mutants de délétion de Tat sont produits et purifiés comme des protéines de la fusion avec GST. Ces protéines contiennent moins de 0,3 UE/µg comme l'atteste le test de

Lysat d'Amebocyte de Limule (LAL). Ces préparations sont biologiquement actives (Badou *et al.*, 2000).

Stimulation des cellules

Les monocytes (10⁶/ml) sont mis en culture en absence ou en présence de la protéine Tat (10 ou 100 nM) durant 24, 48 ou 72 heures dans des plaques 24 puits. Afin d'étudier les voies de signalisation impliquées, les monocytes sont préincubés avec les inhibiteurs durant 30 min. avant d'être stimulés par Tat (10 nM) durant 24 heures.

L'IL-10 produite est dosée par ELISA (R & D systems).

Analyse de l'activation de la Protéine Kinase C (PKC)

L'activation de la PKC est suivie par sa translocation membranaire. Les monocytes sont traités durant 30 minutes par Tat (10, 100 nM) ou par le PMA (100 ng/ml), les protéines membranaires et cytoplasmiques sont isolées par centrifugation sur gradient de saccharose et soumises à une migration SDS-PAGE 10 % suivie d'un western blot révélé par un anticorps anti-PKC par chimioluminescence (ECL, Pierce).

Déplétion en PKC

Afin de dépléter les monocytes en PKC, les cellules sont prétraitées par 100 ng/ml de PMA durant 48 heures. Après élimination du surnageant et 2 lavages successifs, les monocytes sont incubés en présence de Tat comme indiqué précédemment, et la production d'IL-10 est dosée dans les surnageants 24 heures après stimulation.

Analyse de l'activation du facteur de transcription NFκB par retard sur gel

Les extraits nucléaires de monocytes stimulés par Tat sauvage ou délétée, sont préparés comme décrit précédemment (Badou *et al.*, 2000). Brièvement, l'activation de NFκB est analysée en utilisant 10⁴ cpm de sonde NFκB radiomarquée dans un volume final de 20 µl. Après 30 minutes d'incubation, le mélange est soumis à une migration sur gel polyacrylamide 5 % non dénaturant à 120 V. Après séchage, le gel est exposé sur film autoradiographique une nuit à -80°C.

Analyse de la mobilisation du calcium

Spectrofluorimétrie : Les monocytes (10⁶) sont incubés dans des cupules en verre pendant 6 h, puis chargés avec 5 µM de fluo-3 acétoxyméthylester (AM) (molecular probe) durant 20 minutes à 37°C. Les monocytes sont placés sous un microscope inversé (Diaphot, Nikon) et observés avec un objectif (x 40). La variation de concentration calcique est mesurée dans les cellules stimulées par Tat (10 ou 100 nM). L'émission de fluorescence à 525 nm du fluo-3 associé au calcium, obtenue en réponse à une excitation à 490 nm est détectée par une caméra

CCD (Hamamatsu C2400-80). Les images sont prises toutes les 5 secondes. La mesure du rapport fluorescence des cellules stimulées (F)/fluorescence des cellules au repos (F0) permet de mesurer les variations de la concentration calcique.

Microscopie confocale : Les monocytes chargés au fluo-3-AM, comme décrit précédemment sont placés sous un microscope confocal dans un milieu HBSS contenant 1 % de SVF. La variation de concentration calcique est mesurée dans les cellules stimulées par Tat (10 ou 100 nM). Le microscope confocal utilisé est équipé d'un laser argon, possédant une raie à 488 nm (Zeiss, modèle LSM 410). La sonde est excitée par la raie 488 nm du laser, Ar. Les images, prises toutes les 5 secondes, ont été recueillies au niveau du plan équatorial des cellules.

RÉSULTATS

Tat induit la production d'IL-10 par le monocyte humain

L'addition de concentrations croissantes de Tat (10, 100 nM) à des monocytes humains isolés à partir de donneurs sains induit une forte production d'IL-10 dépendante de la dose atteignant 2 000 pg/ml lorsque les cellules sont stimulées par 100 nM de Tat. Cette production observée à 24 heures augmente lorsque les monocytes sont incubés durant 48 ou 72 heures. Ainsi Tat induit une production d'IL-10 de manière dépendante de la dose et du temps de stimulation (Fig. 1A). L'effet spécifique de Tat a été analysé par deux approches, ainsi la protéine préincubée avec des anticorps monoclonaux anti-Tat devient incapable d'induire la production d'IL-10, de même la protéine Tat oxydée (forme inactivée mais restant immunogène) n'induit plus d'IL-10 (Fig. 1B). Afin de déterminer si cette production est uniquement due aux monocytes, les cellules mononucléées du sang périphérique ont été déplétées en mono-

cytes par plusieurs passages d'adhérence. Les cellules non adhérentes ainsi obtenues, dépourvues de monocytes, sont incapables de produire de l'IL-10 après traitement dans les mêmes conditions par la protéine Tat (Fig. 1C).

La protéine Tat contenant plusieurs régions actives dont le domaine riche en cystéine, la région basique ou encore le tripeptide RGD, nous avons voulu identifier la région impliquée dans cette induction d'IL-10. La stimulation des monocytes par des mutants de délétion de Tat a montré que la région N-terminale 1-45 contenait le domaine actif pour cette induction (Fig. 2A). Comme la protéine Tat contient une séquence de localisation nucléaire, deux modes d'action sont envisageables : au niveau membranaire ou nucléaire. La protéine Tat immobilisée sur des puits de culture reste capable d'induire de l'IL-10 suggérant qu'une interaction membranaire serait suffisante (Fig. 2B).

Dès lors quelle est la voie de transduction du signal initiée par Tat pour induire la production d'IL-10 au niveau du monocyte ? Deux voies prédominantes de signalisation au sein du monocyte connues pour induire l'expression de gènes de cytokine ont été étudiées : la voie de la PKC et la voie calcique (Fig. 3).

La PKC est indispensable pour l'induction d'IL-10 par Tat

Alors que, dans le monocyte non stimulé, la PKC a une localisation cytoplasmique, la stimulation par Tat induit une translocation de la PKC à la membrane, localisation témoignant de son activation (Fig. 4A). Donc Tat active la PKC monocyttaire. L'implication de la PKC, ainsi activée par Tat, dans la production d'IL-10 a été étudiée en utilisant deux approches complémentaires. Ainsi, les monocytes prétraités par le RO31-8220, un inhibiteur spécifique de la PKC, ne produisent plus d'IL-10 suite à la stimulation par Tat. Cette inhibition est dépendante de la dose d'inhibiteur, devenant totale pour 5 μ M (Fig. 4B). Afin de caractériser davantage l'implication de

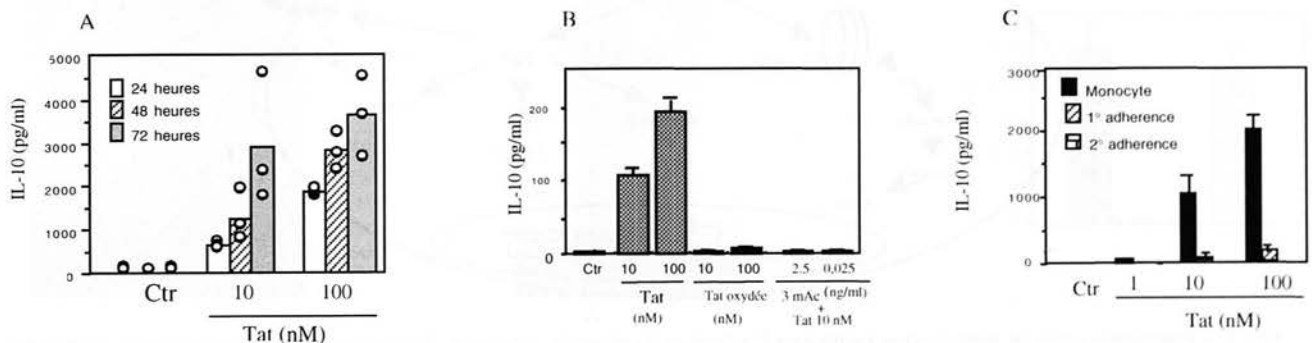


FIG. 1. — A : Les monocytes (10^6) sont incubés en absence ou en présence de Tat (10, 100 nM) durant 24, 48 ou 72 heures. En B : les monocytes sont stimulés par la protéine Tat oxydée 1 heure à 27°C en présence de 3 % H_2O_2 ou par Tat (10 nM) préalablement incubée avec un mélange de 3 anticorps monoclonaux anti-Tat. C : les cellules mononucléées du sang périphérique sont déplétées en monocytes après 3 passages d'adhérence et incubées avec la protéine Tat (1, 10, 100 nM). Les surnageants de culture sont récupérés et la présence d'IL-10 est évaluée par ELISA. Les résultats sont exprimés en pg/ml.



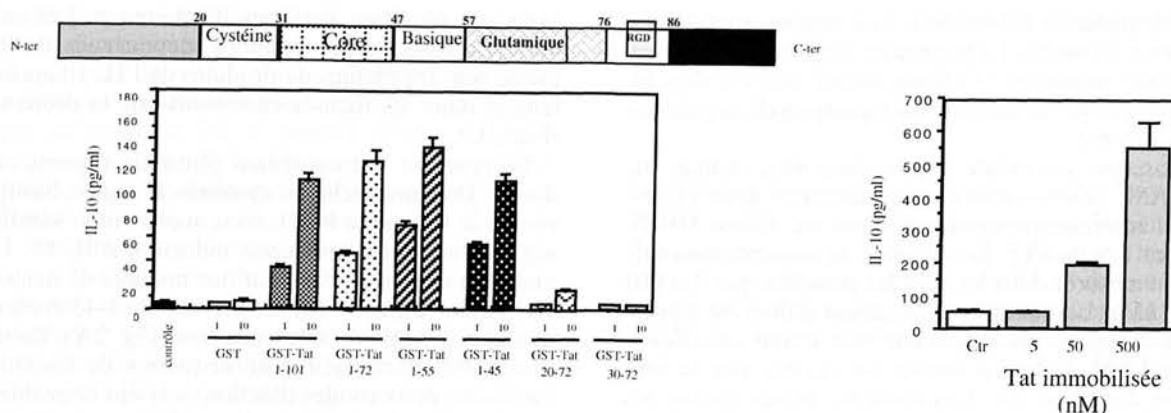


FIG. 2. – A : Les monocytes sont stimulés par les mutants de délétion (protéines recombinantes) GST-Tat 1-72, GST-Tat 1-55, GST-Tat 1-45, GST-Tat 20-72, GST-Tat 30-72 ou par la protéine sauvage GST-Tat 1-101. À titre de témoin des monocytes sont traités par la GST. Après une incubation de 24 heures, l'IL-10 produite est évaluée dans les surnageants par ELISA. En B, la protéine a été immobilisée sur les puits de culture (2 heures à 37 °C), après plusieurs lavages, les monocytes sont mis en culture dans les puits contenant Tat immobilisée. L'IL-10 produite est dosée par ELISA.

la voie de la PKC, les monocytes ont été déplétés en PKC par de longs traitements au PMA (un activateur de la PKC). En absence de PKC, les monocytes deviennent incapables de produire de l'IL-10 en réponse à une stimulation par Tat (Fig. 4C). Ces résultats suggèrent fortement un rôle crucial de la PKC dans cette induction.

Les voies recrutées en aval de la PKC ont été recherchées, pour cela l'implication d'un substrat connu de la PKC a été étudiée : le facteur de transcription NFkB.

Le facteur de transcription NFkB est impliqué dans cette induction

Le facteur de transcription NFkB semble un candidat pour la transactivation du gène de l'IL-10 car l'étude du

promoteur du gène codant pour cette cytokine montre la présence de 9 sites NFkB. Dans les conditions normales, NFkB est séquestré dans le cytoplasme par la protéine inhibitrice Ikb qui masque sa séquence de localisation nucléaire. Pour être actif, NFkB doit être transloqué dans le noyau, cela nécessite la dégradation de Ikb qui une fois phosphorylé est dégradé dans la voie du protéasome. La capacité de Tat à activer NFkB a été analysée par retard sur gel (Fig. 5). On observe que Tat active NFkB dans le monocyte humain, cela de manière spécifique puisque le site NFkB muté n'est pas retardé par l'extrait nucléaire de monocytes traités par Tat (100 nM) (Fig. 5A, ligne 4). Cette activation de NFkB par Tat a été corrélée à la production d'IL-10 : les mutants de délétion GST-Tat 1-72 et GST-Tat 1-45 activent NFkB alors

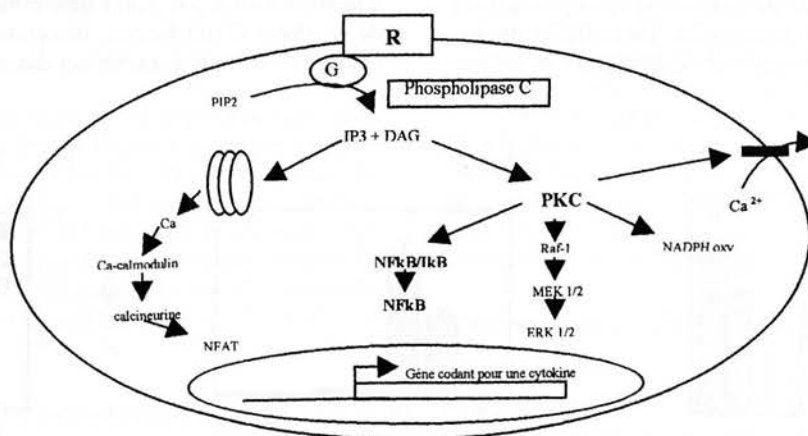


FIG. 3. – Principales voies de signalisation permettant l'induction de gènes de cytokines : la voie calcique et l'activation de la protéine kinase C (PKC). Ainsi, l'utilisation simultanée d'un ionophore calcique tel que l'ionomycine et d'un activateur de la PKC tel que le PMA permet la stimulation de la production de la plupart des cytokines (notamment l'IL-2 et l'IL-4). Ces voies sont activées suite à la fixation d'un ligand sur son récepteur, la phospholipase C clive alors le phosphatidyl inositol biphosphate (PIP2) en inositol 1,4,5 triphosphate (IP3), responsable de la mobilisation du calcium intracellulaire, et en diacylglycérol initiant l'activation de la PKC. Ces deux voies aboutissent à la phosphorylation et à l'activation de protéines (MAP kinases) et de facteurs de transcription (NF-AT, NFkB, AP-1, Raf-1, CREB) responsables de l'induction de gènes de cytokines.

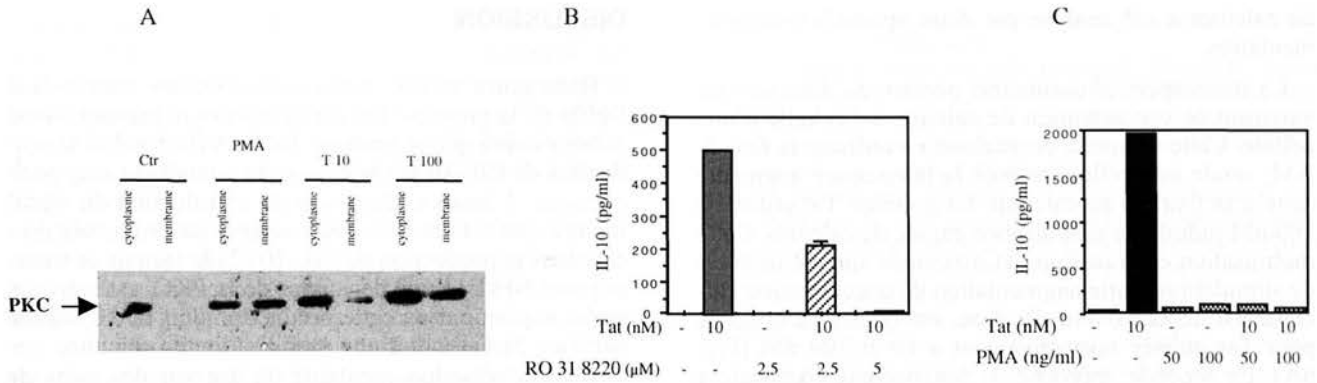


FIG. 4. – A : L'activation de la PKC est suivie par sa translocation membranaire. Les monocytes sont traités durant 30 minutes par Tat (10, 100 nM) ou par le PMA (100 ng/ml), les protéines membranaires et cytoplasmiques sont isolées et soumises à une migration SDS-PAGE 10 % suivie d'un western blot révélé par un anticorps anti-PKC (MC5) suivi d'un ECL. B : Les monocytes sont préincubés durant 30 minutes avec le RO 318220, un inhibiteur de la PKC, puis stimulés par Tat (10 nM). La production d'IL-10 est évaluée par ELISA. C : Les monocytes sont déplétés en PKC par un traitement au PMA (100ng/ml) pendant 48 heures, puis incubés avec 10 nM de protéine Tat. La production d'IL-10 dans le surnageant est dosée par ELISA.

qu'aucune activation n'est observée lorsque les monocytes sont stimulés par les mutants GST-Tat 20-72 et GST-Tat 30-72 (Fig. 5B). L'implication de NFκB dans l'induction de l'IL-10 a été analysée en utilisant le TLCK, un inhibiteur de sérines protéases inhibant la dégradation de IκB. Le prétraitement des monocytes par le TLCK inhibe la production d'IL-10 induite par Tat, inhibition qui devient totale lorsque l'inhibiteur est utilisé à 100 μM (concentration non cytotoxique) (Fig. 5C). L'ensemble de ces résultats suggère que Tat active NFκB, facteur de transcription qui serait impliqué dans cette induction d'IL-10.

Tat induit une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire

Initiée par la présence d'inositol 1,4,5 triphosphate, responsable de la mobilisation de calcium intracellulaire, cette voie permet l'activation de la calcineurine, phosphatase qui active le facteur de transcription NF-AT en le déphosphorylant. Sous cette forme déphosphorylée NF-AT est transloqué dans le noyau où il se fixe sur un site spécifique au niveau de promoteur de gènes cellulaires notamment de gènes codant pour des cytokines (Fig. 3). Dans le but d'évaluer l'implication de cette voie dans la production d'IL-10, l'effet de Tat sur la variation

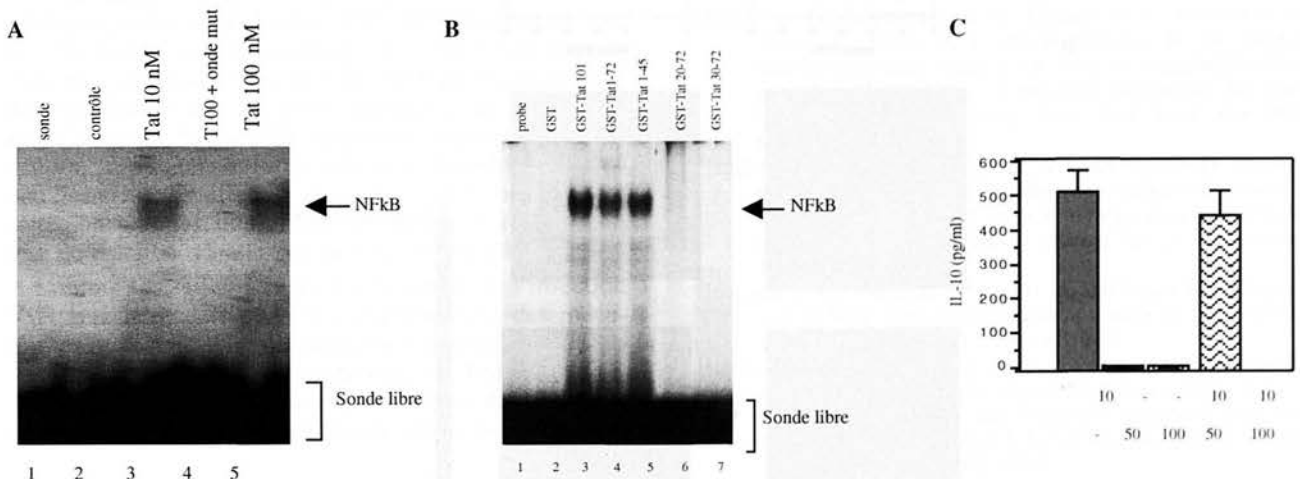


FIG. 5. – Étude de l'activation de NFκB par retard sur gel. Les extraits protéiques nucléaires de monocytes traités par Tat (10, 100 nM) en A, ou par les mutants GST-Tat 1-72, GST-Tat 1-45, GST-Tat 20-72 GST-Tat 30-72, en B, sont incubés avec une séquence NFκB sauvage ou mutée (mut.) radiomarquée. Le mélange réactionnel est soumis à une électrophorèse non dénaturante 5 % acrylamide, le gel est séché et exposé sur film autoradiographique une nuit à -80°C. C : Effet du N-tosyl lysine chlorométhyl cetone (TLCK), inhibiteur de NFκB, sur la production d'IL-10 induite par Tat. Les monocytes préincubés avec le TLCK (50, 100 μM) sont traités par Tat (10 nM), l'IL-10 produite est dosée par ELISA.

de calcium a été analysé par deux approches complémentaires.

La microspectrofluorimétrie permet de détecter une variation de concentration de calcium à l'échelle d'une cellule. Cette mesure a été réalisée en utilisant le fluo-3-AM, sonde intracellulaire dont la fluorescence augmente suite à sa fixation au calcium. La protéine Tat utilisée à 100 nM induit une mobilisation rapide de calcium. Cette mobilisation est transitoire et maximale après 4 minutes de stimulation. Cette augmentation de concentration calcique est dépendante de la dose, atteignant 12 et 25 % pour Tat utilisée respectivement à 10 et 100 nM (Fig. 6A). En seconde approche, la microscopie confocale a été utilisée. Cette méthode permet de mettre en évidence la distribution spatiale des variations de concentrations de calcium au niveau des différents compartiments cellulaires. Après stimulation des monocytes par la protéine Tat (10, 100 nM), on observe une augmentation de la fluorescence et donc de la concentration de calcium (Fig. 6B). Cette augmentation est dépendante de la dose utilisée. L'inspection visuelle des figures montre que la fluorescence semble se localiser à la périphérie des cellules près de la membrane plasmique. L'ensemble de ces résultats suggère fortement que la protéine Tat induit une mobilisation de calcium chez le monocyte humain.

DISCUSSION

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés à l'effet de la protéine Tat sur le monocyte humain. Nous avons montré que la protéine Tat du VIH-1 induit la production de l'IL-10 par le monocyte humain du sang périphérique. L'analyse des voies de transduction du signal montre que : 1) la voie PKC semble jouer un rôle crucial dans la production de l'IL-10 ; 2) le facteur de transcription NFkB, l'une des cibles de la PKC, est activé et serait impliqué dans cette production de l'IL-10 induite par Tat ; 3) Tat induit une mobilisation de calcium.

L'immobilisation préalable de Tat sur des puits de culture, afin d'empêcher sa pénétration intracellulaire, permet une induction de l'IL-10 similaire à celle obtenue avec la protéine Tat soluble. Ce résultat indique que l'effet de Tat ne nécessite pas sa pénétration et passerait probablement par l'interaction avec un récepteur membranaire. Différentes régions de Tat ont été impliquées dans les interactions avec des protéines membranaires : la région N-terminale avec le récepteur CD26 (Gutheil *et al.*, 1994), le tripeptide RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$, des cellules dendritiques (Zocchi *et al.*, 1997), la région basique avec les lipides membranaires et le récepteur VEGF des cellules

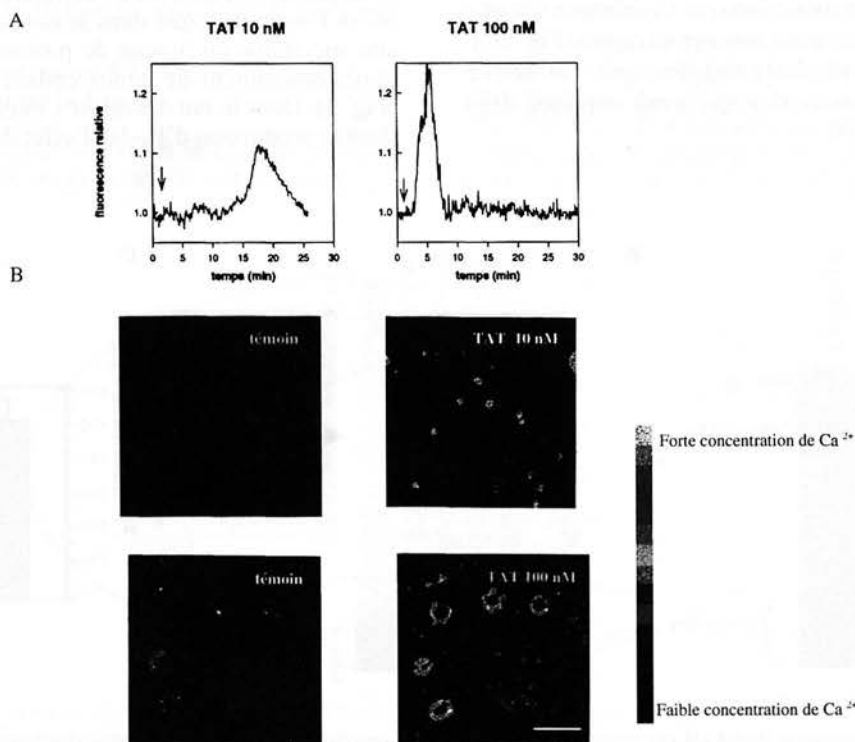


FIG. 6. – Analyse de la variation de calcium intracellulaire en A par microspectrofluorimétrie et en B par microscopie confocale. A : les monocytes préincubés avec le fluo-3-AM stimulés par Tat (10, 100 nM) sont placés sous microscope, la fluorescence est analysée durant 20 min. B : analyse par microscopie confocale de la fluorescence émise par les monocytes au temps $t = 5$ min. après stimulation par Tat (10, 100 nM).

endothéliales (Albini *et al.*, 1996), et il a été suggéré que la région 24-51 interagirait avec un récepteur aux chimiokines (Albini *et al.*, 1998). Parmi cette panoplie de récepteurs potentiels pour Tat, il nous reste à déterminer le ou (les) récepteur(s) qui interviennent dans la transduction du signal conduisant à la production de l'IL-10 après stimulation par Tat.

En plus de l'activation des PKC et NFkB, nous avons montré, à l'aide des méthodes de microspectrofluorimétrie et de microscopie confocale, que la protéine Tat induit une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire dans le monocyte. Les résultats de fluorescence, obtenus par microscopie confocale, des monocytes traités par Tat montrent que la fluorescence est localisée préférentiellement au niveau membranaire, suggérant l'implication de canaux calciques membranaires. Par ailleurs, il a été montré que la stimulation électrique des lignées promonocytaires U937 et THP-1 s'accompagne d'une induction du gène de l'IL-10 (Lehmann *et al.*, 1998). Le mécanisme moléculaire proposé impliquerait une entrée du calcium dans les cellules suite à l'ouverture des canaux calciques. Des travaux récents ont montré que la protéine Tat agit sur le signal calcique à plusieurs niveaux (Rubartelli *et al.*, 1998). Elle est capable de se lier et ainsi, de bloquer les canaux calciques voltage dépendants de type L dans les cellules dendritiques (Poggi *et al.*, 1998) et dans les cellules NK (Zocchi *et al.*, 1998). Il a été aussi montré que la région 24-51 de Tat est capable d'induire un signal calcique chez le monocyte/macrophage en mimant le rôle de certaines chimiokines et ainsi jouant un rôle dans la chimioattraction des neutrophiles (Albini *et al.*, 2000). Enfin, d'autres études ont montré le rôle essentiel dans la production de TNF α de la libération de calcium des pools intracellulaires induite par la protéine Tat (Haughey *et al.*, 2000).

Cette variation de la concentration calcique est-elle impliquée dans la production d'IL-10? En plus de Tat, il a été montré que les protéines du VIH-1 Nef et gp41 induisent la production de l'IL-10 dans le monocyte humain (Barcova *et al.*, 1999; Brigino *et al.*, 1997). La stimulation par Nef semble emprunter une voie de signalisation impliquant la voie calcium/calmoduline phosphodiesterase. En effet, en présence de W7, inhibiteur de cette phosphodiesterase, ou en présence d'EGTA, chélateur de calcium, l'induction de l'IL-10 est inhibée.

Comme l'IL-10 contribue à l'évolution de l'infection VIH vers le stade SIDA, la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu dans la production de cette cytokine permettra, par l'identification de nouvelles cibles spécifiques, d'envisager d'éventuelles cibles thérapeutiques ciblées afin de neutraliser ces effets.

BIBLIOGRAPHIE

Albini A., Ferrini S., Benelli R., Sforzini S., Giunciuglio D., Aluigi M. G., Proudfoot A. E. I., Alouani S., Wells T. N. C., Mariani G., Rabin R. L., Farber J. M. and Noonan D. M.,

- HIV-1 Tat mimicry of chemokines. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95, 13153-13158.
- Albini A., Soldi R., Giunciuglio D., Giraudo E., Benelli R., Primo L., Noonan D., Salio M., Camussi G., Rockl W. and Bus-solino F., The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat. Med.*, 1996, 2, 1371-1375.
- Badou A., Bennasser Y., Moreau M., Leclerc C., Benkirane M. and Bahraoui E., Tat protein of Human Immunodeficiency Virus-1 induces Interleukin-10 in Human Peripheral Blood Monocytes : Implication of Protein Kinase C-dependent Pathway. *J. Virol.*, 2000, 74, 10551-10562.
- Barcova M., Speth C., Kacani L., Überall F., Stoiber H. and Die-rich M. P., Involvement of adenylate cyclase and p70s6-kinase activation in IL-10 up-regulation in human monocytes by gp41 envelope protein of human immunodeficiency virus type 1. *Pflügers Arch.*, 1999, 437, 538-546.
- Benelli R., Barbero A., Ferrini S., Scapini P., Cassatella M., Bus-solino F., Tacchetti C., Noonan D. M., Albini A., Human immunodeficiency virus transactivator protein (Tat) stimulates chemotaxis, calcium mobilization, and activation of human polymorphonuclear leukocytes : implications for tat-mediated pathogenesis. *J. Infect. Dis.*, 2000, 182, 6, 1643-1651.
- Brigino E., Haraguchi S., Koutsonikolis A., Cianciolo G. J., Owens U., Good R. A. and Day N. K., Interleukin 10 is induced by recombinant HIV-1 Nef protein involving the calcium/calmodulin-dependent phosphodiesterase signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, 94, 3178-3182.
- Clerici M. and Shearer G. M., A TH1/TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunology Today*, 1993, 14, 107-111.
- Clerici M., Wynn T. A., Berzofsky J. A., Blatt S. P., Hendrix C. W., Sher A., Coffman R. L. and Shearer G. M., Role of Interleukin-10 in T Helper Cell Dysfunction in Asymptomatic Individuals Infected with the Human Immunodeficiency Virus. *J. Clin. Invest.*, 1994, 93, 768-775.
- Ensoli B., Buonaguro L., Barillari G., Fiorelli V., Gendelman R., Morgan R. A., Wingfield P. and Gallo R. C., Release, Uptake, and Effects of Extracellular Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Protein on Cell Growth and Viral Transactivation. *J. Virol.*, 1993, 67, 277-287.
- Gutheil W. G., Subramanyam M., Flenpke G. R., Sanford D. G., Munoz E., Huber B. T. and Bachovchin W. W., Human immunodeficiency virus 1 Tat binds to dipeptidyl amino-peptidase IV (CD26) : A possible mechanism for Tat's immunosuppressive activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, 91, 6594-6598.
- Haughey N. C., Holden C. P., Nath A. and Geiger J. D., Involvement of Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Regulated stores of intracellular calcium in calcium dysregulation and neurone cell death caused by HIV-1 protein Tat. *J. Neurochem.*, 1999, 73, 1363-1374.
- Howcroft T. K., Strebel K., Martin M. A. and Singer D. S., Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV. *Science*, 1993, 260, 1320-1322.
- Huang L., Bosch I., Hofmann W., Sodroski J. and Pardee A., Tat Protein Induces Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Coreceptors and Promotes Infection with both Macrophage-Tropic and T-Lymphotropic HIV-1 Strains. *J. Virol.*, 1998, 72, 8952-8960.
- Ito M., Ishida T., He L., Tanabe F., Rongge Y., Miyakawa Y. and Terunuma H., HIV type 1 Tat protein inhibits interleukin-12 production by human peripheral blood mononuclear cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1998, 14, 845-849.
- Laspi M. F., Rice A. P. and Mathews M. B., Tat protein increases transcription initiation and stabilizes elongation. *Cell*, 1989, 59, 283-292.

- Lehmann M. H. and Berg H., Interleukin-10 expression is induced by increase of intracellular calcium levels in the monocytic cell line U937. *Pflugers Arch.*, 1998, 435, 868-870.
- Mann D. A. and Frankel A. D., Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO Journal.*, 1991, 10, 1733-1739.
- Moore K. W., O'Garra A., De Waal Malefyt R., Vieira P. and Mosmann T. R., Interleukin-10. *Ann. Rev. Immunol.*, 1993, 11, 165-190.
- Poggi A., Rubartelli A. and Zocchi M. R., Involvement of Dihydropyridine-sensitive Calcium Channels in Human Dendritic Cell Function. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 7205-7209.
- Purvis S. F., Georges D. L., Williams T. M. and Lederman M. M., Suppression of interleukin-2 receptor expression in Jurkat cells stably expressing the human immunodeficiency virus Tat protein. *Cell. Immunol.*, 1992, 144, 32-41.
- Rubartelli A., Poggi A., Sitia R. and Zocchi M. R., HIV-1 Tat : a polypeptide for all seasons. *Immunology Today.*, 1998, 19, 543-545.
- Sabatier J., Vives E., Mabrouk K., Benjouad A., Rochat H., Duval A., Hue B. and Bahraoui E., Evidence for Neurotoxic Activity of tat from Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Virol.*, 1991, 65, 961-967.
- Scala G., Ruocco M. R., Ambrosino C., Mallardo M., Giordano O., Baldassarre F., Dragonetti E., Quinto I. and Venuta S., The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 Tat protein. *J. Exp. Med.*, 1994, 179, 961-969.
- Zocchi M. R., Poggi A. and Rubartelli A., The RGD-containing domain of exogenous HIV-1 Tat inhibits the engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells. *AIDS*, 1997, 11, 1227-1235.
- Zocchi M. R., Rubartelli A., Morgavi P. and Poggi A., HIV-1 Tat inhibits human natural killer cell function by blocking L-type calcium channels. *J. Immunol.*, 1998, 161, 2938-2943.
-