



HAL
open science

Vers une méthode inédite de détection des rétrovirus humains : activation de provirus recombinants HIV-1 LacZ par le produit du gène tat

Claire Bonnerot, Nathalie Savatier, Jean Francois Nicolas

► **To cite this version:**

Claire Bonnerot, Nathalie Savatier, Jean Francois Nicolas. Vers une méthode inédite de détection des rétrovirus humains : activation de provirus recombinants HIV-1 LacZ par le produit du gène tat. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie, 1988, 307 (6), pp.311-6. hal-01974062

HAL Id: hal-01974062

<https://hal.science/hal-01974062>

Submitted on 24 Apr 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Comptes rendus de
l'Académie des sciences. Série
3, Sciences de la vie

Académie des sciences (France). Auteur du texte. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie. 1988-06.

1/ Les contenus accessibles sur le site Gallica sont pour la plupart des reproductions numériques d'oeuvres tombées dans le domaine public provenant des collections de la BnF. Leur réutilisation s'inscrit dans le cadre de la loi n°78-753 du 17 juillet 1978 :

- La réutilisation non commerciale de ces contenus est libre et gratuite dans le respect de la législation en vigueur et notamment du maintien de la mention de source.
- La réutilisation commerciale de ces contenus est payante et fait l'objet d'une licence. Est entendue par réutilisation commerciale la revente de contenus sous forme de produits élaborés ou de fourniture de service.

[CLIQUER ICI POUR ACCÉDER AUX TARIFS ET À LA LICENCE](#)

2/ Les contenus de Gallica sont la propriété de la BnF au sens de l'article L.2112-1 du code général de la propriété des personnes publiques.

3/ Quelques contenus sont soumis à un régime de réutilisation particulier. Il s'agit :

- des reproductions de documents protégés par un droit d'auteur appartenant à un tiers. Ces documents ne peuvent être réutilisés, sauf dans le cadre de la copie privée, sans l'autorisation préalable du titulaire des droits.
- des reproductions de documents conservés dans les bibliothèques ou autres institutions partenaires. Ceux-ci sont signalés par la mention Source gallica.BnF.fr / Bibliothèque municipale de ... (ou autre partenaire). L'utilisateur est invité à s'informer auprès de ces bibliothèques de leurs conditions de réutilisation.

4/ Gallica constitue une base de données, dont la BnF est le producteur, protégée au sens des articles L341-1 et suivants du code de la propriété intellectuelle.

5/ Les présentes conditions d'utilisation des contenus de Gallica sont régies par la loi française. En cas de réutilisation prévue dans un autre pays, il appartient à chaque utilisateur de vérifier la conformité de son projet avec le droit de ce pays.

6/ L'utilisateur s'engage à respecter les présentes conditions d'utilisation ainsi que la législation en vigueur, notamment en matière de propriété intellectuelle. En cas de non respect de ces dispositions, il est notamment passible d'une amende prévue par la loi du 17 juillet 1978.

7/ Pour obtenir un document de Gallica en haute définition, contacter utilisation.commerciale@bnf.fr.

Vers une méthode inédite de détection des rétrovirus humains : activation de provirus recombinants HIV-1 LacZ par le produit du gène *tat*

Claire BONNEROT, Nathalie SAVATIER et Jean-François NICOLAS

Résumé — Chez certains rétrovirus, le niveau de synthèse des protéines virales est fortement augmenté par l'expression de gènes régulateurs. Ainsi pour HIV, la protéine TAT correspond à un activateur codé par le virus qui agit sur des séquences cibles présentes dans la longue terminaison répétée (LTR). Des rétrovirus recombinants HIV-1 où les gènes *gag*, *pol* et une partie du gène *env* ont été remplacés par le gène témoin *nlsLacZ* ont été construits. Ils n'expriment alors le gène témoin qu'en présence de TAT. Si le rétrovirus recombinant est déficient pour *tat*, cette activité peut lui être conférée par un second plasmide le portant. L'expression de *nlsLacZ* peut alors être détectée dans les cellules individuelles par une méthode histochimique simple. Si cette complémentation peut être aussi obtenue par un rétrovirus sauvage, alors la détection et le titrage de ceux-ci s'en trouveront simplifiés.

Towards a new method of detection of human retrovirus: activation of HIV-1 LacZ recombinant provirus by the *tat* gene product

Abstract — For a few of retroviruses, the level of synthesis of viral proteins is greatly increased in the presence of a transactivator gene which is encoded by the virus. For instance, for HIV, TAT acts on target sequences present in the viral long terminal repeat (LTR). HIV-1 recombinant retrovirus (RRV), where the *gag*, *pol* and part of *env* genes have been exchanged for the reporter *nlsLacZ* gene, expresses the reporter gene only in presence of TAT. When the RRV is *tat* defective, this activity can be complemented by *tat* present on a second molecule. The expression of *nlsLacZ* can then be detected by a simple histochemical staining. If this complementation can also be provided by a wild type virus, then their detection and titration would be greatly simplified.

Abridged English Version — The tests commonly used to detect the presence of the retroviruses HIV ([1], [2]) or HTLV [3] are poorly adapted to precise quantification of infectious viral particles ([4]-[6]). A new possibility would be to detect in tester cells the expression of a viral gene active early after the infection. Some retroviruses from mammals have developed a complex regulatory machinery whose function is to control the expression and spread of the provirus (*see* references in [7]-[9]). Thus, TAX protein (HTLV) or TAT protein (HIV) are activators acting on target sequences in the U3 or R, respectively of the viral LTR (*see* references in [9] and [10]). When this region is positioned upstream from an heterologous gene, it specifically confers to the gene the property of being activable by TAX or TAT respectively. Here we show that the LTR alone of HIV-1 in recombinant retrovirus (RRV) constructs does not allow the expression of the *nlsLacZ* reporter gene ([10], [11]) at a level detectable by the histochemical method with 4-Cl-5-Br-3 indolyl- β -galactoside (X-gal) [11] even when a high copy number of the HIV-1 RRV is used. In contrast, the presence of the TAT protein leads to high expression from this LTR. Therefore, cells transfected with an HIVLacZ RRV may be useful for the detection of HIV by transactivation.

The recombinant retrovirus HIV-1 *nlsLacZ* (*Fig.*, A) does not include the genes coding for the structural elements of the viral particle or the sequences for *rev* and *tat*. It keeps the two intact LTR of HIV-1 [14] which include the promoter and the *cis* sequences necessary for transactivation by TAT. The recombinant retrovirus HIV-1 *nlsLacZ tat* (*Fig.*, B) includes in addition the HIV-1 genome from nucleotide 5289 to 9194 [15] that

Note présentée par François JACOB.

encodes the *tat*, *rev*, *nef* and *env* genes and target sequences for REV. This recombinant molecule is expected to regulate its own expression and, if no regulatory signal is included in the deleted part of the virus, to possess the properties of a gag-pol RNA.

When the nlsLacZ gene is under the control of HIV-1 promoter, very few cells express β -galactosidase (4 instead of $4.5 \cdot 10^3$ obtained with the control plasmid L7RH β gal or with HIV-1 SVnlsLacZ *tat*, Table, column pGem). We are now exploring whether these rare positive cells are due to rearrangements of the RRV during transfection or to the presence of rare variant cells which would have the property of transactivating the construct. To determine whether or not the plasmids encoding the HIV-1 nlsLacZ express β -galactosidase after transactivation by the *tat* gene, we co-transfected HIV-1 nlsLacZ with either pLET or pSET [10] which encode the *tat* gene under the control of the HIV-1 LTR or under the control of the promoter of the SV40 virus, respectively, or we transfected HIV-1 nlsLacZ *tat* alone. Under these three experimental conditions, the expression of the nlsLacZ was detected in a high number of cells ($2.8 \cdot 10^1$ to $1.4 \cdot 10^3$ for a total number of $5 \cdot 10^4$ cells, Table). These observations demonstrate that the nlsLacZ reporter gene under the control of an HIV-1 LTR confers β -galactosidase positive phenotype to cells only if the region coding for the regulatory elements of the virus is introduced with it.

This activation is obtained independently of whether TAT is provided on a separate molecule or not. It suggests that it may be possible to detect the infection of a wild type virus by simply following the activation of the reporter gene. Useful tester cells to titrate HIV will contain HIV-1 nlsLacZ stably integrated to the genome of a cell line which is sensitive to the retrovirus in order to reproduce the characteristics describe here with wild type virus. This principle may be adapted to any retrovirus for which a transactivation is necessary for viral expression (HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, BLV).

INTRODUCTION. — Les tests utilisés pour détecter la présence de rétrovirus HIV ([1], [2]) ou HTLV [3] sont indirects et de ce fait se prêtent mal à la quantification du nombre de particules infectieuses. Certains de ces tests sont basés sur la mise en évidence d'une réponse du système immunitaire envers des antigènes du virus [4], d'autres sur des effets du virus sur les cellules [5] d'autres enfin sur la présence de provirus [6]. Une autre façon serait de détecter l'expression d'un gène du virus présent précocement après l'infection de cellules cibles. Lorsqu'une méthode pourra être mise au point où des cellules témoins infectées pourront être individuellement repérées, alors le titrage des particules virales infectieuses sera possible.

Les rétrovirus des mammifères supérieurs possèdent un système régulateur complexe dont la fonction est de contrôler l'expression et la propagation du provirus (*voir* les références citées dans [7]-[9]). Les éléments de ce système correspondent à des molécules qui ont des propriétés d'activateur ou de répresseur. Ils règlent le niveau des ARN génomiques et subgénomiques et de leurs produits en agissant non seulement au niveau de l'initiation de la transcription mais aussi de la stabilité des ARN et de l'efficacité de la traduction [9]. Ainsi, les produits du gène *tax* (HTLV) ou *tat* (HIV) correspondent à des activateurs qui agissent sur une séquence cible localisée dans la région U3R du LTR du virus correspondant (*voir* les références citées dans [10]). Si ce fragment est placé en 5' d'un gène hétérologue, il confère spécifiquement à ce gène la propriété d'être activable par le produit du gène *tax* ou *tat*. Cette activation possède un haut degré de spécificité [10].

Dans le but d'obtenir un test quantitatif d'une grande sensibilité, nous utilisons un gène témoin dont l'activité peut être aisément décelée au niveau de la cellule ([11], [12]).

Nous montrons ici que le LTR du virus HIV-1 ne permet pas l'expression du gène témoin nlsLacZ [12] à un niveau suffisant pour être détectée par la technique de marquage, pourtant très sensible, utilisant le 4-Cl-5-Br-3 indolyl- β -galactoside (X-gal) [11]. Cela est vrai même lorsque le nombre de copies du rétrovirus recombinant est très élevé. Par contre, en présence du produit du gène *tat*, le LTR du virus HIV-1 entraîne une expression du gène témoin nlsLacZ comparable à celle obtenue dans un système où pourtant la réponse est déjà amplifiée (le promoteur de la région précoce de SV40 contenant une origine de répllication, dans les cellules CV1 exprimant les antigènes T/t de ce virus, lignée COS, référence [13]). Cette activation a lieu que le gène *tat* soit présent sur la même molécule que le gène témoin et utilise le même promoteur viral ou qu'il soit fourni par une molécule distincte.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES. — *Construction des plasmides.* — Les plasmides pHIV-1 nlsLacZ et pHIV-1 nlsLacZ *tat* ont été obtenus par ligation du fragment Sal I- Bam HI de pMMuLV nlsLacZ [12] qui contient le gène nlsLacZ (après en avoir complété les extrémités cohésives à l'aide du fragment de Klenow de la polymérase de Kornberg) avec respectivement le fragment Sph I- Bam HI et Sph I-Eco RI de pBAG LAV 4-3-2 [14] (après traitement par la nucléase « Mung Bean » pour éliminer les extrémités cohésives).

Le plasmide pHIV-1 SVnlsLacZ *tat* a été obtenu par ligation du fragment Sal I-Bam HI de pMMuLV SVnlsLacZ [12] qui contient le gène nlsLacZ sous le contrôle du promoteur précoce de SV40 (après traitement par le fragment de Klenow de la polymérase de Kornberg) avec le fragment Sph I-Eco RI de pBAG LAV 4-3-2 [14] (après traitement par la nucléase « Mung Bean »).

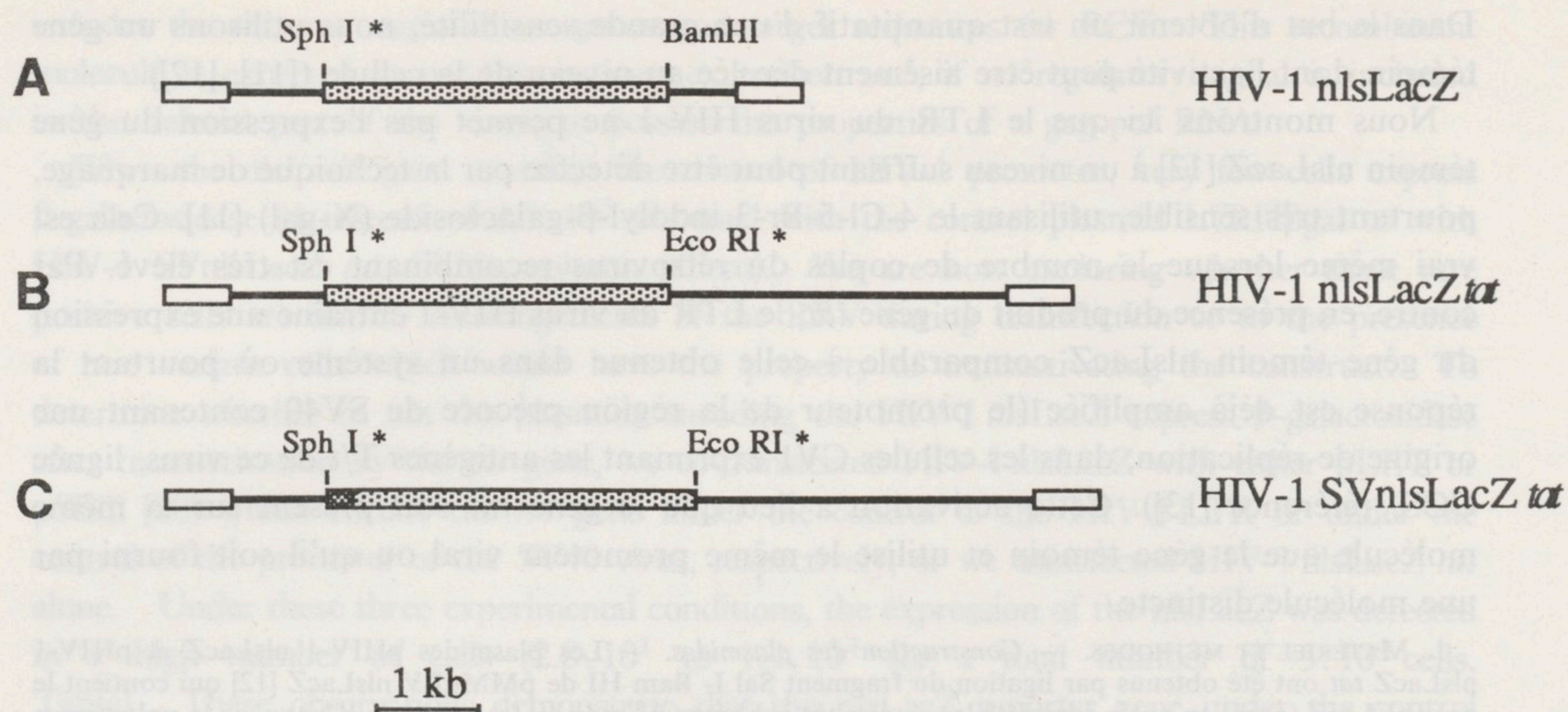
Transfections des cellules COS. — Les transfections ont été faites par copréciptation phosphocalcique dans des conditions standards en utilisant un mélange de 5 μ g de plasmide portant le gène témoin et de 5 μ g de plasmide pGem (contrôle), pLET ou pSET [10].

Détection de l'activité β -galactosidase. — La coloration histochimique a été décrite par Sanes et coll. [11].

2. RÉSULTATS. — *Les rétrovirus recombinants HIV-1 nlsLacZ, HIV-1 nlsLacZ tat et HIV-1 SVnlsLacZ tat.* — Le rétrovirus recombinant HIV-1 nlsLacZ (*fig.*, A) ne contient ni les gènes codant pour les éléments de structure de la particule virale ni les séquences codant pour les protéines à fonction régulatrice REV et TAT. Il ne contient pas non plus les séquences *cis* nécessaires à la régulation par le produit du gène *rev*. Il conserve les deux LTR du virus HIV-1 ainsi que des régions immédiatement adjacentes. La région U3R qui contient le promoteur et les séquences nécessaires à l'activation par le produit du gène *tat* n'a pas été modifiée par rapport au provirus d'origine. Le signal donneur d'épissage (nucléotide 290, référence [15]) des ARN sous-génomiques a été conservé, mais il ne reste pas de signal d'épissage accepteur connu. Le gène témoin nlsLacZ qui code pour la β -galactosidase d'*E. Coli* fusionnée à un peptide lui conférant une localisation nucléaire a été placé en aval du LTR 5'. L'expression du gène nlsLacZ est donc directement sous contrôle du LTR du virus HIV-1 et devrait suivre les régulations qui l'affectent.

Le rétrovirus recombinant HIV-1 nlsLacZ *tat* (*fig.*, B) contient, en plus des séquences décrites pour HIV-1 nlsLacZ, les séquences régulatrices de la région 3' délimitée par les nucléotides 5289 à 9194 [15]. Ces séquences incluent, outre le gène *tat*, la région codante pour les gènes *env*, *rev* et *nef* et les séquences *cis* cible du gène *rev*. Cette molécule recombinante devrait donc autoréguler son expression. L'ARN codant pour la β -galactosidase devrait avoir les propriétés d'un ARN gag-pol si aucun signal de régulation n'est contenu dans la région délétée.

Le rétrovirus recombinant HIV-1 SVnlsLacZ *tat* (*fig.*, C) contient en plus des régions décrites pour HIV-1 nlsLacZ *tat* un fragment d'ADN correspondant au promoteur des gènes de la région précoce de SV40. Ce promoteur a été placé directement en 5' du gène nlsLacZ. La présence du promoteur interne devrait libérer le gène témoin de la nécessité



Structure des rétrovirus recombinants HIV-1 nlsLacZ. Les trois rétrovirus recombinants contiennent les séquences codant pour le gène nlsLacZ (524) [12] flanqué en 5' et 3' de séquences dérivées d'une copie provirale du virus HIV-1. Ils contiennent des LTR viraux intacts (I) [14]. Les séquences entre U5 et le site Sph I contiennent le début du gène *gag*. Les séquences entre le site EcoRI et U3 contiennent les parties codantes des gènes *tat*, *rev* et *nef* ainsi que les séquences cibles impliquées dans la régulation par REV. Les séquences entre le site BamHI et U3 ne contiennent que l'information pour le gène *nef*. Le promoteur de la région précoce de SV40 est indiqué par (525). Les sites Sph I et EcoRI ont été détruits au cours de la construction (*).

Structure of HIV-1nlsLacZ recombinant retrovirus. The three RRV encode nlsLacZ (524) [12] flanked by HIV-1 derived sequences. It includes intact viral LTR (I) [14]. The sequences between U5 and the Sph I restriction site encode part of the *gag* gene. Sequences between the EcoRI site and U3 encode the *tat*, *rev* and *nef* genes. They also include the target sequences for REV. Sequences between the BamHI restriction site and U3 encode only *nef*. The SV40 early promoter is indicated by (525). The Sph I and EcoRI restriction sites have been destroyed during the construction (*).

d'une activation pour son expression. Par contre, cette nécessité est maintenue pour la production de l'ARN génomique recombinant à partir du LTR viral.

pHIV-1 nlsLacZ ne confère pas aux cellules un phénotype β -gal⁺. — Lorsque l'expression du gène nlsLacZ est sous contrôle du promoteur de la région précoce de SV40, celle-ci peut être détectée après que le gène a été introduit par la technique de copréciptation phosphocalcique ou par infection rétrovirale où alors une seule copie de la construction est intégrée dans le génome ([11] et [12]). Ces résultats ont été reproduits avec les cellules de la lignée COS [13] utilisée dans cette étude (tableau, L7RH β gal).

Lorsque le gène nlsLacZ est sous contrôle du promoteur du virus HIV-1 (*pHIV-1 nlsLacZ*) seules de très rares cellules expriment l'enzyme (4 pour 4,5.10³ obtenues lorsque le plasmide contrôle L7RH β gal est utilisé, tableau, colonne pGem). Il importera ultérieurement de distinguer s'il s'agit là de l'expression résultant d'une modification de la structure du provirus recombinant au cours de la transfection ou de rares variants cellulaires capables de transactiver la construction.

La présence du gène *tat* confère à la cellule un phénotype β -gal⁺. — Pour voir si après transactivation les plasmides codant pour les rétrovirus recombinants HIV-1 nlsLacZ peuvent exprimer la β -galactosidase, le gène *tat* a été introduit de deux manières dans les cellules COS : — soit en utilisant la construction *pHIV-1 nlsLacZ tat* qui contient l'information génétique pour TAT — soit en utilisant une seconde molécule ajoutée lors de la transfection (plasmides pLET ou pSET, référence [10]). pLET code pour le gène *tat* mis sous contrôle du promoteur HIV. pSET code aussi pour le gène *tat* mis sous

TABLEAU

Activation de différents rétrovirus recombinants LacZ par le produit du gène *tat* du virus HIV-1. Un mélange d'un plasmide contenant le gène témoin nlsLacZ en aval d'un promoteur viral (HIV-1 ou, pour L7RH β gal, SV40) et d'un plasmide codant pour la région régulatrice contenant le gène *tat* de HIV-1 (pSET et pLET) ou non (pGem, contrôle) a été utilisé pour transfecter $5 \cdot 10^4$ cellules COS [13] par la méthode de copréciptation phosphocalcique. 48 h après la transfection, l'activité β -galactosidase a été recherchée après fixation des cellules et coloration histochimique X-gal [11]. L'examen visuel des cellules a permis de dénombrer celles exprimant la β -galactosidase. Seuls les mélanges contenant TAT conduisent à une expression de l'enzyme lorsque le promoteur du gène témoin est celui du HIV-1.

*A mixture of 5 μ g of a plasmid encoding the nlsLacZ reporter gene downstream from a viral promoter (HIV-1 or for L7RH β gal SV40 early) and of 5 μ g of a plasmid encoding (pLET and pSET) or not (pGem, control) the *tat* gene has been used to transfect $5 \cdot 10^4$ COS cells [13]. 48 hrs. later, β -galactosidase activity has been examined by the X-gal staining [11]. Numeration of β -gal⁺ cells was done by visual examination. When the promoter of the reporter gene is from HIV-1, only transfections including *tat* lead to β -galactosidase expression.*

| | pGem | pSET | pLET |
|---------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| pHIV-1 nlsLacZ | 4 | $2,8 \cdot 10^1$ | $1,4 \cdot 10^3$ |
| | 8 | $9,7 \cdot 10^2$ | $2,3 \cdot 10^2$ |
| pHIV-1 nlsLacZ <i>tat</i> | 10^2 | $4 \cdot 10^2$ | $5 \cdot 10^2$ |
| pHIV-1 SVnlsLacZ <i>tat</i> | $8 \cdot 10^3$ | $1,3 \cdot 10^3$ | $9,6 \cdot 10^3$ |
| L7RH β gal | $4,5 \cdot 10^3$ | $1,2 \cdot 10^4$ | $1,6 \cdot 10^4$ |
| | $1,9 \cdot 10^3$ | $4 \cdot 10^3$ | $3,7 \cdot 10^3$ |

contrôle du promoteur de la région précoce de SV40. Dans ces trois situations, l'expression du gène nlsLacZ a été décelée dans un nombre important de cellules ($2,8 \cdot 10^1$ à $1,4 \cdot 10^3$, tableau). De plus, les cellules expriment individuellement l'enzyme avec une intensité de coloration atteignant souvent celle obtenue avec le plasmide contrôle L7RH β gal.

Finalement, dans les expériences où le gène *tat* a été ajouté au plasmide pHIV-1 nlsLacZ *tat*, une stimulation faible mais reproductible a été obtenue (tableau, colonne pSET et pLET). Une telle stimulation n'a pas été observée lorsque la construction comporte un promoteur interne qui gouverne l'expression du gène témoin (pHIV-1 SVnlsLacZ *tat*).

L'ensemble de ces observations montre que le gène nlsLacZ mis sous le contrôle d'un LTR HIV-1 ne confère un phénotype β gal⁺ aux cellules que si la région codante pour les éléments de régulation du virus est aussi introduite dans ces cellules.

DISCUSSION. — La régulation du cycle de certains rétrovirus des mammifères utilise des molécules codées par le virus lui-même et exprimées tôt après l'infection. Si le mécanisme d'action de ces molécules reste mal compris, par contre les éléments *cis* impliqués commencent à être bien caractérisés. Ainsi, le produit du gène *tat* qui joue un rôle central dans la régulation du virus HIV agit par l'intermédiaire d'une cible qui a été localisée dans U3R. Il sert à moduler le niveau de l'expression de certains des gènes du virus par un mécanisme transcriptionnel et post-transcriptionnel.

Les résultats présentés montrent que des gènes témoins dont l'expression est gouvernée par le LTR du virus HIV-1 s'expriment d'une manière conditionnelle. Ainsi, le rétrovirus recombinant HIV-1 nlsLacZ ne s'exprime qu'en présence de son activateur spécifique (TAT). Avant induction, l'expression est trop faible et ne peut être décelée par la méthode pourtant sensible utilisée. Après induction le niveau d'expression atteint celui de promoteurs très forts. Ces résultats ont été obtenus en dénombrant visuellement les cellules positives. Par ce critère il apparaît qu'au niveau des cellules individuelles le fonctionnement du LTR correspond à un tout ou rien : les rares cellules positives obtenues en l'absence de *tat* expriment la β -galactosidase à un niveau aussi élevé que les cellules activées. Il reste à déterminer les causes de l'expression dans ces cellules.

Cette activation est obtenue que TAT soit produit à partir d'une molécule indépendante du rétrovirus recombinant ou non. Cette observation nous suggère qu'il est possible de

décélérer une infection par un rétrovirus sauvage en repérant l'activation du gène témoin nlsLacZ. Pour atteindre cet objectif, un rétrovirus recombinant du type de celui décrit ici (HIV-1 nlsLacZ) doit être intégré au génome d'une cellule infectable par le rétrovirus qui porte le transactivateur. Ce principe pourrait s'appliquer aux rétrovirus pour lesquels une transactivation spécifique est connue (HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, BLV).

Nous remercions M. Emerman pour le don de plusieurs plasmides et pour avoir relu ce texte et F. Jacob pour son aide constante et ses commentaires sur le texte. Ce travail a bénéficié de l'aide du Centre national de la Recherche scientifique, de la Fondation pour la Recherche médicale, de l'Institut national de la Santé et de la Recherche médicale (n° 871011), de la Ligue nationale française contre le Cancer, du Programme national SIDA et de la Fondation André Meyer. C. B. et J.-F. N. appartiennent à l'I.N.S.E.R.M.

Note reçue le 7 juillet, acceptée le 12 juillet 1988.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] F. BARRÉ-SINOSSI, J. C. CHERMANN, F. REY, M. T. NUGEYRE, S. CHAMARET, J. GRUEST, C. DAUGUET, C. AXLER-BLIN, F. VEZINET-BRUN, C. ROUZIOUX, W. ROZEMBAUM et L. MONTAGNIER, *Science*, 220, 1983, p. 868-871.
- [2] M. POPOVIC, M. G. SARNAGADHARAN, E. REED et R. C. GALLO, *Science*, 224, 1984, p. 497-500.
- [3] B. J. POIESZ, F. W. RUSCETTI, A. F. GAZDAR, P. A. BUNN, J. D. MINNA et R. C. GALLO, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77, p. 7415-7419.
- [4] F. BRUN-VÉZINET, C. ROUZIOUX, F. BARRÉ-SINOSSI, D. KLATZMANN, A. G. SAIMOT, W. ROZEMBAUM, L. MONTAGNIER et J. C. CHERMANN, *Lancet*, 5, 1984, p. 1253-1256.
- [5] S. HARADA, Y. KOYANAIGI et N. YAMAMOTO, *Science*, 229, 1985, p. 563-566.
- [6] C. Y. OU, S. KWOK, S. W. MITCHELL, D. H. MACH, J. J. SNINSKY, J. W. KREBS, P. FEORINO, D. WARFIELD et G. SCHOCHETMAN, *Science*, 239, 1988, p. 295-297.
- [7] B. K. FELBER et G. N. PAVLAKIS, *Science*, 239, 1988, p. 184-187.
- [8] C. A. ROSEN, E. TERWILLIGER, A. DAYTON, J. G. SODROSKI et W. A. HASELTINE, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 1988, p. 2071-2075.
- [9] C. A. ROSEN, J. G. SODROSKI, W. CHUN GOH, A. I. DAYTON, J. LIPPLE et W. A. HASELTINE, *Nature*, 319, 1986, p. 555-559.
- [10] M. EMERMAN, M. GUYADER, L. MONTAGNIER, D. BALTIMORE et M. A. MUESING, *The E.M.B.O. Journal*, 6, 1987, p. 3755-3760.
- [11] J. R. SANES, J. L. R. RUBENSTEIN et J. F. NICOLAS, *The E.M.B.O. Journal*, 5, 1986, p. 3133-3142.
- [12] C. BONNEROT, D. ROCANCOURT, P. BRIAND, G. GRIMBER et J. F. NICOLAS, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84, 1987, p. 6795-6799.
- [13] Y. GLUZMAN, *Cell*, 1981, p. 175-182.
- [14] A. ADACHL, H. E. GENDELMAN, S. KOENIG, T. FOLKS, R. WILLEY, A. RABSON et M. A. MARTIN, *J. of Virology*, 59, 1986, p. 284-291.
- [15] R. WEISS, N. TEICH, H. VARMUS, J. COFFIN éd., *RNA Tumor Viruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1985.

Unité de Biologie moléculaire du Développement, C.N.R.S., U.A. n° 1148,
Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15.