

# Intervista a LUC MONTAGNIER

[VIRUSMYTH HOMEPAGE](#)

Luc Montagnier scoprì l'HIV?

Di Djamel Tahì

*Continuum* inverno 1997

*Testo della conferenza filmata effettuata all'Istituto Pasteur nel luglio 1997 (evidenziazione di affermazioni particolarmente significative in giallo da parte del traduttore, FF).*

*Please note: The answers by Luc Montagnier have been numbered for easier reference to the analyses in the [reply by Papadopulos-Eleopulos et al.](#)*

*DT: Un gruppo di scienziati australiani afferma che nessuno finora ha isolato il virus dell'AIDS, l'HIV. Per loro le regole dell'isolamento dei retrovirus non sono state correttamente rispettate per l'HIV. Queste regole sono: coltura, purificazione del materiale con ultracentrifugazione, fotografie con Microscopio Elettronico (EM) del materiale che si separa alla densità dei retrovirus, caratterizzazione di queste particelle, prova della infettività delle particelle.*

LM: No, questo non è isolamento. Noi effettuiamo l'isolamento poiché noi "passiamo oltre" il virus, noi facciamo una coltura del virus. Per esempio Gallo disse: "Essi non hanno isolato il virus ... e noi (Gallo et al.), noi l'abbiamo fatto emergere in abbondanza in una linea cellulare immortale." Ma prima di farlo emergere in linee cellulari immortali, noi lo facciamo emergere in colture di linfociti normali di un donatore di sangue. Questo è il criterio principale. Uno aveva qualcosa che poteva passare avanti serialmente, che uno poteva mantenere. E caratterizzarlo come un retrovirus non solo per le sue proprietà visive, ma anche biochimicamente, **l'attività della RT (transcriptasi inversa) che è propriamente specifica dei retrovirus.** Noi avevamo anche la reazione degli anticorpi contro alcune proteine, probabilmente le proteine interne. Dico probabilmente per analogia con la conoscenza di altri retrovirus. Uno non avrebbe potuto isolare questo retrovirus senza la conoscenza di altri retrovirus, questo è ovvio. Del tutto. (1)

*DT: Mi lasci tornare alle regole dell'isolamento virale che sono: coltura, purificazione alla densità dei retrovirus, fotografie al microscopio elettronico del materiale alla densità dei retrovirus, caratterizzazione delle particelle, prova della infettività delle particelle. Sono stati effettuati tutti questi passaggi per l'isolamento dell'HIV? Vorrei aggiungere che, in accordo con le numerose citazioni bibliografiche pubblicate dal gruppo australiano, la Transcriptasi inversa non è specifica dei retrovirus ed in più il Suo lavoro per individuare la transcriptasi inversa non venne forse fatto su materiale purificato?*

LM: Io penso che abbiamo pubblicato su Science (maggio 1983) un gradiente che ha dimostrato che la transcriptasi inversa (RT) aveva la densità di 1,16. Così uno aveva un picco che era la RT. Così uno ha assolto questo criterio di purificazione. Ma effettuarlo in passaggi seriali è difficile perché quando poni il materiale in purificazione, in un gradiente, i retrovirus sono molto fragili, così si

rompono uno con l'altro e perdono gran parte della loro infettività. Ma penso che anche così abbiamo mantenuto una parte della loro infettività. Ma non era così semplice come lo è oggi, perché le quantità del virus erano comunque molto basse. All'inizio noi ci imbattemmo in un virus che non uccideva cellule. Il virus veniva da un paziente asintomatico e così fu classificato tra i virus non formanti sincizi, non citopatogeni usando il co-recettore ccr5. Era il primo virus BRU. Se ne aveva una piccolissima quantità, e non si poteva passarlo nelle linee di cellule immortali. Provammo per alcuni mesi, non ci riuscimmo. Riuscimmo molto facilmente con il secondo ceppo. Ma qui sta il problema piuttosto misterioso della contaminazione di quel secondo ceppo dal primo. Questo era il LAI. (2)

*DT: Perché le fotografie al ME da Lei pubblicate provengono dalla coltura e non dalla purificazione?*

LM: C'era così poca produzione di virus che era impossibile vedere cosa poteva esserci in un concentrato di virus da un gradiente. C'era troppo poco virus per fare quello. Naturalmente lo si cercava, lo si cercava nei tessuti fin dall'inizio, così nelle biopsie. Noi vedemmo alcune particelle ma non avevano la morfologia tipica dei retrovirus. Esse erano molto differenti. Relativamente differenti. Così con le colture ci vollero molte ore per trovare le prime immagini. Fu uno sforzo titanico! E' facile criticare dopo l'evento. Quello che non avevamo, ed io l'ho sempre riconosciuto, era la dimostrazione che fosse veramente la causa dell'AIDS. (3)

*DT: Come è possibile senza la fotografie con microscopio elettronico dalla purificazione sapere se queste particelle sono virali ed appartengono ad un retrovirus, più in particolare ad uno specifico retrovirus?*

LM: Bene c'erano fotografie della gemmazione. Noi pubblicammo immagini della gemmazione che sono caratteristici dei retrovirus. Avendo detto ciò, unicamente sulla morfologia non si poteva affermare che era veramente un retrovirus. Per esempio, uno specialista francese di Microscopia elettronica pubblicamente mi ha attaccato dicendo: "Questo non è un retrovirus, è un arena virus". Questo perché ci sono altre famiglie di virus che gemmano e hanno estroflessioni sulla superficie, etc. (4)

*DT: Perché questa confusione? Le fotografie con Microscopio Elettronico non mostravano chiaramente un retrovirus?*

LM: In quel momento i retrovirus meglio conosciuti erano quelli di tipo C, che erano molto tipici. Questo retrovirus non era di tipo C ed i lentivirus erano poco conosciuti. Io stesso l'ho riconosciuto cercando tra le fotografie del virus dell'anemia infettiva equina nella biblioteca, e poi il virus Visna. Ma, io ripeto, non era solamente la morfologia della gemmazione, c'era la transcriptasi inversa ... era l'associazione di queste proprietà che mi indusse a dire che era un retrovirus (5).

*DT: A proposito di transcriptasi inversa, è rivelata nelle colture. Quindi c'è la purificazione dove uno trova particelle retrovirali. Ma a questa densità ci sono molti altri elementi, tra gli altri quelli che uno chiama "simil-virali".*

LM: Esattamente, esattamente. Se preferisce non è una proprietà ma l'insieme delle proprietà che ci fece dire che era un retrovirus della famiglia dei lentivirus. Presi da sole nessuna delle proprietà è veramente specifica. E' l'associazione di esse. Così noi avevamo: la densità, RT, fotografie delle gemmazioni e l'analogia con il visna virus. Queste sono le quattro caratteristiche. (6)

*DT: Ma come tutti questi elementi costituiscono prova di un nuovo retrovirus? Alcuni di questi elementi potrebbero appartenere ad altre cose, "simil virali"...?*

LM: Sì, e per di più noi abbiamo retrovirus esogeni che talvolta esprimono particelle – ma di origine endogena, e che perciò non hanno ruoli patologici, in ogni caso non in AIDS. (7)

*DT: Ma uno come può cogliere la differenza?*

LM: Perché noi potevamo passare oltre al virus. Noi passammo oltre alla attività della transcriptasi inversa nei nuovi linfociti. Noi ottenemmo un picco di replicazione e tenemmo traccia del virus. Era l'associazione delle proprietà che ci portò a dire che era un retrovirus. E perché nuovo? La prima domanda a noi posta dalla Natura era: "E' o no una contaminazione di laboratorio? E' forse un retrovirus murino o un virus animale?" Così uno poteva dire no! Perché noi abbiamo dimostrato che il paziente aveva anticorpi contro le proteine di questo virus. L'associazione (delle proprietà) ha una logica perfetta! Ma è importante prenderla come un'associazione. **Se voi prendete ciascuna proprietà separatamente, essi non sono specifici. E' l'associazione che dà la specificità.** (8)

*DT: Ma alla densità dei retrovirus, avete osservato particelle che assomigliavano a retrovirus? Un nuovo retrovirus?*

LM: Alla densità di 1.5, 1.16, noi avevamo un picco di attività della transcriptasi inversa, che è l'enzima caratteristico dei retrovirus. (9)

*DT: Ma poteva quello essere qualcosa d'altro?*

LM: No nella mia opinione era molto chiaro. Non poteva essere che un retrovirus in quella maniera. Poiché l'enzima che Barré Sinoussi caratterizzò biochimicamente aveva bisogno del magnesio, così come l'HTLV. Aveva bisogno della matrice, il template, il primer che erano completamente caratteristici di una transcriptasi inversa. Questo era fuori discussione. A Cold Spring Harbour nel settembre 1983, Gallo mi domandò se io ero sicuro che era una RT: Lo sapevo, Barré Sinoussi aveva fatto tutti i controlli per quello. Non era una semplice polimerasi, era una transcriptasi inversa. Lavorava solo con i primer a RNA, formava DNA: Questo era sicuro. (10)

*DT: Con gli altri retrovirus che avete incontrato nella vostra carriera, avete seguito le stesse procedure ed avete incontrato le stesse difficoltà*

M: Direi che per l'HIV è un procedimento facile. Paragonato con gli ostacoli che uno trova con gli altri ... poiché il virus non compare o perché l'isolamento è sporadico – si riesce una volta su cinque. Sto parlando circa la ricerca attuale su altre malattie. Uno può citare **il virus della Sclerosi Multipla del prof Peron**. Egli mi mostrò il suo lavoro 10 anni fa e ci mise circa dieci anni per trovare una sequenza genica che è molto vicina a quella di un retrovirus endogeno. Vede, è molto difficile. Poiché egli non riuscì a propagare il virus, egli non poté farlo crescere in una coltura. Mentre l'HIV cresce come erba matta. Il ceppo LAI per esempio cresce come erba matta. E' così ha contaminato le altre colture. (11)

*DT: Con cosa coltivaste i linfociti del vostro paziente? Con la linea cellulare H9?*

LM: No, poiché non funzionava affatto con la H9. Noi usammo molte linee cellulari e l'unica che poteva produrlo erano i linfociti Tambon. (12)

**DT: Ma usando questi tipi di elementi, è possibile introdurre altre cose capaci di indurre una RT e proteine, ecc?**

LM: **Completamente d'accordo.** Questo è il motivo per cui non eravamo tanto entusiasti di usare linee cellulari immortali. Per coltivare il virus in grandi quantità – OK. Ma non per caratterizzarlo,

poiché noi eravamo consapevoli di portare dentro altre cose. Queste sono linee cellulari MT che sono state trovate dai Giapponesi (MT2, MT4) che replicano l'HIV molto bene e che nello stesso tempo sono trasformate dall'HTLV. Perciò voi avete una miscela di HIV e HTLV. E' una vera minestra. (13)

*DT: Quel che più conta, non è possibile che il paziente sia infettato da altri agenti infettivi?*

LM: Potevano esserci dei mycoplasmi ... potevano esserci un sacco di cose, ma per fortuna avevamo l'esperienza negativa con i virus associate con il cancro e che ci era d'aiuto, poiché avevamo incontrato tutti questi problemi. Per esempio, un giorno ebbi un bel picco di RT, che F. Barre-Sinoussi mi diede, con un gradiente di densità un po' più alto, 1,19. Ed io controllai! Era un mycoplasma, non un retrovirus. (14)

*DT: Come accorgersi della differenza tra cosa è virale e cosa non lo è? Perché a questa densità c'è un sacco di altre cose, incluse particelle "simil virali", frammenti cellulari ...*

LM: Sì, questo è il motivo con le colture di cellule poiché uno vede le fasi della produzione virale. Voi avete l'estroffessione. Charles Dauge (uno specialista in microscopia elettronica) guardava piuttosto alle cellule. Ovviamente guardava anche il plasma, il concentrato, ecc non vide niente di importante. Poiché se fai un concentrato, è necessario fare sottili sezioni [per vedere con EM], e per fare sottili sezioni è necessario avere un concentrato almeno della grandezza di una testa di spillo. Queste sono le enormi quantità di virus che sono necessarie. All'opposto, si fa una sezione di cellule molto facilmente ed è in queste sezioni sottili che Charles Dauge trovò il retrovirus, in differenti fasi di estroffessione. (15)

*DT: Quando si guarda alle fotografie elettroniche, per lei che è un retrovirologo, è chiaramente un retrovirus, un nuovo retrovirus?*

LM: No, a quel punto non si può dire. Con le prime immagini di estroffessione, potrebbe essere un virus tipo C. Non si può distinguere. (16)

*DT: Non potrebbe essere qualcosa d'altro che un retrovirus?*

LM: No, ebbene, dopotutto, sì. Ma c'è un ... noi abbiamo un atlante. Uno riconosce qualcosa per la padronanza dell'argomento, cos'è un retrovirus e cosa non lo è. Con la morfologia uno può distinguere, ma presuppone una certa buona conoscenza. No ... bene, dopo tutto sì ... avrebbe potuto essere un altro virus ad estrofflettersi. Ma c'è un ... noi abbiamo un atlante. Uno conosce un po' dalla somiglianza, cosa è un retrovirus e cosa non lo è. Con la morfologia uno può distinguere, ma presuppone una certa familiarità. (17)

*DT: Perché nessuna purificazione?*

LM: Ripeto, noi non purificammo. Noi purificammo per caratterizzare la densità della RT, che era certamente quella di un retrovirus. Ma non cogliemmo il picco ... o non funzionò ... poiché se purifichi allora danneggi. Così per le particelle infettive è meglio non toccarle granché. Così, tu prendi semplicemente il soprannatante delle colture dei linfociti che hanno prodotto il virus e le poni in piccola quantità in altre colture di linfociti. E così segue che tu passi il retrovirus serialmente e trovi sempre le stesse caratteristiche e tu aumenti la produzione ogni volta che effettui un passaggio. (18)

*DT: Così lo stadio della purificazione non è necessario?*

LM: No, no, non è necessario. Quello che è essenziale è passare avanti il virus. Il problema che Peron ebbe con il virus della sclerosi multipla era che non poteva passare il virus da una coltura ad un'altra. Questo è il problema. Egli provò un poco, non a sufficienza per caratterizzarlo. Ed oggi giorno caratterizzare significa soprattutto allo standard molecolare. Se tu vuoi la procedura va più velocemente. Per farlo: un DNA, clonare questo DNA, amplificarlo, determinarne la sequenza, ecc. Così tu hai il DNA, la sequenza di DNA che ti dice se questo è realmente un retrovirus. Uno conosce la struttura familiare dei retrovirus, tutti i retrovirus hanno una struttura genomica familiare con questo e quel determinato gene che sono caratteristici. (19)

*DT: Così, per l'isolamento dei retrovirus lo stadio di purificazione non è obbligatorio? Si può isolare senza purificare?*

LM: Sì, non si è obbligati a trasmettere materiale puro. Sarebbe meglio, ma c'è il problema che si danneggia (il virus) e si diminuisce la infettività dei retrovirus. (20)

*DT: Senza andare attraverso questo stadio di purificazione, non c'è un rischio di confusione sulle proteine che uno identifica e anche sulla transcriptasi inversa che potrebbe venire da qualcos'altro?*

LM: No, dopotutto, ripeto che noi abbiamo un picco di RT alla densità di 1,15, 1,16, ci sono 999 probabilità su 1000 che è un retrovirus. Ma questo poteva essere un retrovirus di origine diversa. Ripeto, **ci sono alcuni retrovirus endogeni**, pseudo-particelle che possono essere emesse dalle cellule, ma anche così, dalla parte del genoma che codifica i retrovirus. E che uno acquisisce attraverso l'ereditarietà, nelle cellule per un tempo molto lungo. Ma infine io penso per la prova – poiché le cose evolvono nel modo consentito dalla biologia molecolare che permette persino una più facile caratterizzazione questi giorni – è necessario procedere molto velocemente alla clonazione. E questo venne fatto molto velocemente, sia da Gallo sia da noi stessi. Clonare e sequenziale, e così uno ha la completa caratterizzazione. Ma io ripeto, la prima caratterizzazione appartiene alla famiglia dei lentivirus, la densità l'estroffessione, ecc, le proprietà biologiche, l'associazione con le cellule T4. Tutte queste cose sono parte della caratterizzazione, e fummo noi a farlo. (21)

*DT: Ma viene il momento in cui uno deve effettuare la caratterizzazione del virus. Questo significa: quali sono le proteine di cui è composto?*

LM: Questo è il punto. Così dunque, l'analisi delle proteine del virus richiede produzione di massa e purificazione. E' necessario fare questo. E là io dovrei dire che questo parzialmente ha fallito. J.C. Chermann aveva questo incarico, almeno per le proteine interne. Ed egli ebbe difficoltà nel produrre il virus e non funzionava. Ma questa era una possibile strada, l'altra era di ottenere l'acido nucleico, clonare, ecc. E' questo il modo che ha funzionato molto velocemente. La prima strada non funzionava poiché noi avevamo a quel tempo un sistema di produzione che non era efficiente a sufficienza. Uno non aveva a disposizione abbastanza particelle prodotte per purificare e caratterizzare le proteine virali. Non poteva essere fatto. Uno non poteva produrre una adeguata quantità di virus a quel tempo, perché quel virus non si manifestava nelle linee cellulari immortali. Noi potemmo farlo con il virus LAI, ma a quel tempo noi non lo sapevamo. (22)

*DT: Gallo lo fece?*

LM: **Gallo? .. Non so se egli realmente purificò. Non lo credo.** Io credo che si lanciò molto velocemente sulla parte molecolare, il che significa sulla clonazione. Quello che fece è il Western Blot. Noi usammo la tecnica RIPA, così quello che fecero era nuovo cioè dimostrarono alcune proteine che non si erano viste bene con le altre tecniche. C'è un altro aspetto della

caratterizzazione del virus. Non puoi purificarlo ma se conosci qualcuno che ha gli anticorpi contro le proteine del virus, puoi purificare il complesso antigene/anticorpo. Questo è quello che si fece. **E così uno aveva una banda visibile, marcata radio attivamente, che si chiamò proteina 25, p25. E Gallo ne vide altre. C'era la p25 che egli chiamò p24, c'era la p41, che egli vide ...** (23)

*DT: Riguardo gli anticorpi, numerosi studi hanno mostrato che questi anticorpi regiscono con altre proteine o elementi che non sono parte dell'HIV. E che non sono sufficienti a caratterizzare le proteine dell'HIV*

LM: No! Poiché avevamo controlli. Noi avevamo persone che non avevano l'AIDS e non avevano anticorpi contro queste proteine. E le tecniche che abbiamo usato erano tecniche che io stesso avevo perfezionato alcuni anni prima, per individuare il gene src. Lei vede il gene src che fu anch'esso identificato con la immunoprecipitazione. Era la p60 (proteina 60). Ero molto abile, e così i miei tecnici, con la tecnica RIPA. Se uno ottiene una specifica reazione, è specifica. (24)

*DT: Ma noi sappiamo che I pazienti con AIDS sono infettati da una moltitudine di altri agenti infettivi che sono suscettibili a ...*

LM: Ah, sì, ma gli anticorpi sono molto specifici. Essi sanno come distinguere una molecola tra un milione. C'è una grandissima affinità. Quando gli anticorpi hanno una sufficiente affinità, Lei identifica qualcosa di realmente molto specifico. Con anticorpi monoclonali, Lei "pesca" realmente **una sola** proteina. Tutto questo è usato per la determinazione diagnostica dell'antigene. (25)

*DT: Per Lei la p41 non era di origine virale e così non apparteneva all'HIV. Perché questa contraddizione?*

LM: Noi eravamo entrambi ragionevolmente corretti. Intendo dire che io con la mia tecnica RIPA ... in effetti ci sono proteine cellulari che uno incontra dovunque – c'è un "rumore di fondo" non-specifico, e tra queste proteine ce n'è una molto abbondante nelle cellule, che è l'actina. E questa proteina ha un peso molecolare di 43.000kd. Così, era lì presente. Così io avevo ragionevolmente ragione, ma quello che Gallo vide d'altra parte era la gp41 dell'HIV, poiché stava usando il Western Blot. E questo l'ho riconosciuto. (26)

*DT: Per Lei la p24 era la proteina più specifica dell'HIV, per Gallo no assolutamente. Si sa grazie ad altri studi che gli anticorpi diretti contro la p24 erano spesso trovati in pazienti che non erano infettati con l'HIV, e persino in certi animali. Infatti oggi, una reazione anticorpale con la p24 è considerata non specifica.*

LM: **Non è sufficiente per diagnosticare l'infezione da HIV.** (27)

*DT: Nessuna proteina è sufficiente?*

LM: **Nessuna proteina è sufficiente in ogni caso.** Ma allora il problema non si è rivelato tale. Il problema era sapere se c'era un HTLV o no. L'unico retrovirus conosciuto era l'HTLV. E noi mostrammo chiaramente che non era un HTLV, che gli anticorpi monoclonali di Gallo contro la p24 dell'HTLV non riconosceva la p25 dell'HIV. (28)

*DT: Alla densità dei retrovirus, 1,16, c'è un quantità di particelle, ma solamente il 20% di quelle appartengono all'HIV. Perché l'80% delle proteine non sono virali e le altre sì? Come uno può stabilire la differenza?*

LM: Ci sono due spiegazioni. Per una parte, alla densità dove hai quello che uno chiama microvescicole di origine cellulare, che hanno approssimativamente la stessa dimensione del virus, e poi il virus stesso, nell'estrofflettersi dalla cellula si porta dietro proteine cellulari. Così effettivamente queste proteine sono non virali, sono di origine cellulare. Così come stabilire la differenza?! Francamente con questa tecnica uno non può farlo con precisione. Quello che possiamo fare è purificare al massimo il virus con successivi gradienti, e tu ti ritrovi sempre con le stesse proteine. (29)

*DT: Le altre spariscono?*

LM: Diciamo che le altre si riducono un po'. Voi togliete le microvescicole, ma ogni volta perdetevi una grande quantità di virus, così è necessario avere una grande quantità di virus per cominciare in modo di mantenerne un po' quando arrivi alla fine. E di nuovo, c'è l'analisi molecolare, è la sequenza di queste proteine che permette di dire se esse sono di origine virale o no. Questo è quanto cominciamo per la p25, che fallì, e l'altra tecnica consiste nell'effettuare la clonazione, e così tu hai il DNA e dal DNA tu ottieni le proteine. Tu deduci la sequenza delle proteine e la loro dimensione, ed arrivi di nuovo su quello che hai già osservato con l'immunoprecipitazione o con elettroforesi in gel. E uno sa per analogia con la dimensione delle proteine di altri retrovirus, uno può dedurre con buona sicurezza queste proteine. Così poi avete la p25 che era vicino alla p24 dell'HTLV, avete la p18 ... alla fine gli altri. D'altra parte quella che era molto differente era la proteina molto grande, la p120. (30)

*DT: Oggigiorno, sono stati risolti i problemi riguardo la produzione di massa del virus, fotografie al Microscopio elettronico a 1,16?*

LM: Sì, certo. (31)

*DT: Esistono le fotografie dell'HIV al microscopio elettronico dalla purificazione?*

LM: Sì, ovviamente. (32)

*DT: Sono state pubblicate?*

LM: Non potrei dirLe ... ne abbiamo alcuni da qualche parte ... ma non riveste interesse, non è di nessun interesse. (33)

*DT: Oggigiorno con la produzione in massa del virus, è possibile vedere una fotografia al Microscopio elettronico, dopo purificazione, un grande numero di virus?*

LM: Sì, sì assolutamente. Uno può vederli, uno vede persino bande visibili. (34)

*DT: Così per Lei l'HIV esiste?*

LM: Oh, è chiaro. Ho l'ho visto e l'ho incontrato. (35)

*Notes: Go [here](#) for the reply by the Perth Group.*