

Université de Montréal

**Étude de facteurs cellulaires et viraux influençant le site
d'assemblage et l'infectivité du virus d'immunodéficience
humaine type 1 (VIH-1)**

par

Guillermo Cervantes Acosta

**Département de Microbiologie et immunologie
Faculté de Médecine**

**Thèse présentée à la Faculté des études supérieures en vue de
l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph. D.) en
Virologie et immunologie**

Août, 2001

© Guillermo Cervantes Acosta, 2001



W
4
U58
2002
v. 050

**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Cette thèse intitulée

**Étude de facteurs cellulaires et viraux influençant le site
d'assemblage et l'infectivité du virus d'immunodéficience
humaine type 1 (VIH-1)**

présentée par

Guillermo Cervantes Acosta

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Soudeyns, Hugo	Président-rapporteur
Lemay, Guy	Directeur de recherche
Cohen, Éric	Codirecteur
Arella, Maximilien	Membre du jury
Poliquin, Laurent	Examineur externe
Brakier Gingras, Lea	Répresentante du doyen de la FES

Thèse acceptée le: _____

TABLE DES MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
DÉDICACE	xiv
SOMMAIRE	xv
ABSTRACT	xvii
RESUMEN	xix
CHAPITRE 1: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	1
1 INTRODUCTION	2
2 LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE	
2.1 CLASSIFICATION	3
2.2 PATHOLOGIE DE L'INFECTION PAR LE VIH	3
2.3 STRUCTURE VIRALE ET PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES	4
2.4 ORGANISATION GÉNOMIQUE	6
2.5 LA MULTIPLICATION VIRALE	6

2.5.1	Établissement de l'infection	8
2.5.1.1	Pénétration du virus	8
2.5.1.2	Transcription inverse et intégration du génome proviral	10
2.5.2	L'expression provirale	12
2.6	LES PROTÉINES VIRALES	15
2.6.1	Les protéines de structure	15
2.6.1.1	La protéine de la matrice	16
2.6.1.2	La protéine de la capside	17
2.6.1.3	La protéine de la nucléocapside	18
2.6.1.4	La protéine p6	18
2.6.2	Les enzymes virales	19
2.6.3	Les protéines auxiliaires	20
2.6.3.1	Les protéines régulatrices	20
	Protéine Tat	20
	Protéine Rev	20
2.6.3.2	Les protéines accessoires	21
	Protéine Nef	21
	Protéine Vpr	23
	Protéine Vif	23
	Protéine Vpu	24
	Dégradation de la protéine CD4	24
	Augmentation de la relâche virale	26
2.6.4	Les glycoprotéines d'enveloppe	28
2.6.4.1	Glycoprotéine d'enveloppe gp120	29

2.6.4.2	Glycoprotéine d'enveloppe gp41	31
	Ciblage de la glycoprotéine d'enveloppe	35
	Endocytose de la glycoprotéine d'enveloppe	36
2.7	IMPORTANCE BIOLOGIQUE DE LA RÉGULATION NÉGATIVE DE CD4	36
2.8	ASSEMBLAGE ET RELÂCHE VIRALE	39
3	CELLULES POLARISÉES	41
3.1	CELLULES ÉPITHÉLIALES	41
	3.1.1 Structure des cellules épithéliales	42
	3.1.2 Les jonctions cellulaires	44
3.2	CELLULES LYMPHOCYTAIRES	45
3.3	AUTRES TYPES DE CELLULES POLARISÉES	
	Les neurones	45
3.4	TRANSPORT DE PROTÉINES MEMBRANAIRES	47
	3.4.1 Translocation à travers le réticulum endoplasmique	47
	3.4.2 Modifications post-traductionnelles des protéines de membrane	50
	3.4.3 Transport vésiculaire du RER vers la membrane cytoplasmique	51

3.5 LE TRANSPORT DE PROTÉINES MEMBRANAIRES ÉPITHÉLIALES	55
3.5.1 Modèle de transport direct	57
3.5.1.1 Domaine apical	57
Les signaux apicaux	57
Les ectodomains	57
Le glycosylphosphatidylinositol (GPI)	58
3.5.1.2 Domaine basolatéral	60
Signaux basolatéraux	60
3.5.2 Mécanismes de transport indirect	62
3.5.2.1 La transcytose	62
3.5.3 Transport par défaut	63
3.6 CULTURE DE CELLULES ÉPITHÉLIALES IN VITRO	63
3.7 CELLULES MDCK	64
3.8 ASSEMBLAGE POLARISÉ DE VIRUS ENVELOPPÉS DANS DES CELLULES ÉPITHÉLIALES	66
4 INTRODUCTION AU PROJET DE RECHERCHE	69
4.1 OBJECTIF GÉNÉRAL ET BUTS DU TRAVAIL DE RECHERCHE	70
CHAPITRE 2: ARTICLE 1	72

Influence of HIV-1 envelope glycoproteins YXXL
endocytosis/polarization signal on viral accessory
proteins functions

AVANT-PROPOS	73
ABSTRACT	75
INTRODUCTION	76
MATERIALS AND METHODS	79
RESULTS	83
DISCUSSION	87
ACKNOWLEDGEMENTS	90
REFERENCES	91
FIGURES	99

CHAPITRE 3: ARTICLE 2 113

Human Jurkat lymphocytes clones differ in their capacity to support
productive human immunodeficiency virus type 1 multiplication

AVANT-PROPOS	114
ARTICLE	115

CHAPITRE 4 122

Établissement d'une lignée de cellules MDCK infectables par le
VIH-1.

AVANT-PROPOS	123
INTRODUCTION	124
MATÉRIEL ET MÉTHODES	125
RÉSULTATS	128
FIGURES	131
DISCUSSION	139

DISCUSSION GÉNÉRALE 142

CONTRIBUTIONS MAJEURES	151
REMERCIEMENTS	153
RÉFÉRENCES	155
ANNEXE	199

LISTE DE FIGURES

À l'intérieur de la revue de la littérature

Fig. 1-1. Modèle de la structure de la particule virale du VIH.	5
Fig. 1-2. Organisation génomique du VIH.	7
Fig. 1-3. Récepteurs pour le VIH.	9
Fig. 1-4. Structure LTR 5' de l'ADN proviral du VIH-1.	11
Fig. 1-5. Schéma général du cycle de réplication du VIH.	14
Fig. 1-6. Représentation schématique de la protéine gp120.	30
Fig. 1-7. Représentation schématique de la glycoprotéine gp41.	32
Fig. 1-8. Mécanisme hypothétique de l'entrée du VIH dans la cellule.	34
Fig. 1-9. Schéma de la protéine accessoire Vpu.	38
Fig. 1-10. Schéma des cellules épithéliales.	43
Fig. 1-11. Topologie des protéines membranaires.	48
Fig. 1-12. Microphotographie d'une vésicule à clathrine	54
Fig. 1-13. Modèle proposé pour la formation d'une vésicule à clathrine	56
Fig 1-14. Composants de la machinerie du transport membranaire impliqués dans le transport polarisé chez les cellules épithéliales.	59

Fig. 1-15. Culture de cellules épithéliales <i>in vitro</i>	65
À l'intérieur du chapitre 2	
Fig. 2-1. (1 dans l'article) Effet des protéines accessoires virales sur le ciblage basolatéral.	100
Fig. 2-2. (2 dans l'article) Représentation schématique des constructions provirales isogéniques.	102
Fig. 2-3. (3 dans l'article) Expression du phénotype des protéines accessoires en présence ou absence de la glycoprotéine d'enveloppe Y712S du VIH.	104
Fig. 2-4. (4 dans l'article) Effet de Vpu sur l'infectivité virale.	106
Fig. 2-5. (5 dans l'article) Comparaison de l'effet de Vpu en présence ou absence de CD4.	108
Fig. 2-6. (6 dans l'article) Effet des mutants de Vpu sur la stimulation de l'infectivité virale.	110
Fig. 2-7. (7 dans l'article) Incorporation de la glycoprotéine d'enveloppe au virion.	112
À l'intérieur du chapitre 4	
Fig. 4-1. Capacité des différents clones de cellules MDCK à être infectés par le VIH.	132
Fig. 4-2. Détermination de la relâche virale polarisée.	134
Fig. 4-3. Potentiels infectieux des virus relâchés par les cellules MDCK infectables.	136

Fig. 4-4. Effet de Nef et Vpu sur l'infectivité des virus relâchés par les cellules MDCK infectables.

138

LISTE D'ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AP	« Adaptor protein »
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
C1 - C5	région constante (1 à 5)
CA	capside
Cdk9	protein kinase-9 cyclin-dépendente
COP	« Coatomer protein »
CypA	Cyclophiline A
DAF	« Decay Accelerating Factor »
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay »
Env	Enveloppe
Gag	« Group antigen »
gp	glycoprotéine
GPI	glycosylphosphatidylinositol
HA	Hémagglutinine
HTLV	Virus de la leucémie humaine T tropique
IgA	immunoglobuline A
IN	intégrase
LDL-R	Récepteur du « Low density lipoprotein »
LTR	« Long Terminal Repeat »
MA	Matrice
MDCK	« Mardin Darby Canine Kidney »
MHR	« Major Homology Region »
NC	nucléocapside
Nef	HIV-1 Negative factor
NSF	« N-ethylmaleimide Fusion Protein»
PBS	« Primer Binding Site »
Pig (-R)	Récepteur polymérique de l'immunoglobuline
PR	Protéase
RE	réticulum endoplasmique
RER	réticulum endoplasmique rugueux
RMN	Résonance magnétique nucléaire

RRE	« Rev Responsive Element »
RT	transcriptase inverse
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SNARE	« SNAP-Receptor »
SNAP	« Soluble NSF Attachment Protein »
SRP	« Signal Recognition Protein »
TAR	« <i>trans</i> activating Response Element »
TR-R	récepteur de la transférine humaine
V1 - V5	région variable (1 à 5)
Vif	Viral infectivity factor
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VIS	Virus de l'immunodéficience simienne
VLM	Virus de la leucémie murine
Vpr	Viral protein r
Vpu	Viral protein u
VSV	Virus de la stomatite vésiculaire
VSV G	Glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire

À
Mateo, Juan, Lucas
et
Zégher,

en témoignage de ma gratitude pour leur soutien et leur
encouragement indéfectibles ainsi que pour leur inlassable
patience.

SOMMAIRE

Le développement d'une infection virale en général, et par le VIH en particulier, est déterminé par la nature des interactions entre les protéines du virus et de la cellule hôte. Ces interactions font en sorte que plusieurs événements reliés aux différentes étapes de la réplication soient contrôlés par des mécanismes et protéines appartenant à la cellule hôte. Plusieurs phénotypes des protéines du VIH dépendent du type cellulaire, démontrant une interaction fonctionnelle ou une complémentation entre facteurs cellulaires et viraux. Les résultats et observations présentés dans cette thèse démontrent que des aspects reliés à la multiplication virale, tels que la cytopathogénicité et l'infectivité spécifique, peuvent être modulés non seulement par des facteurs viraux mais par la cellule hôte.

Dans la première partie de ce travail, une interaction de type fonctionnelle entre la protéine accessoire Vpu et les signaux de polarisation/endocytose localisés dans la région intracytoplasmique de la glycoprotéine gp41 du VIH est décrite. Cette interaction est révélée par la modulation différentielle de l'infectivité virale par le signal de polarisation/endocytose selon la présence ou l'absence de Vpu. Dans le deuxième volet de ces travaux, une étude comparative de l'infection par le VIH chez trois clones différents dérivés de la lignée cellulaire Jurkat a été effectuée. Les observations réalisées ont démontré que les trois clones présentent différents niveaux d'effets cytopathiques, différents niveaux de relâche virale et, surtout, une infectivité différente des virus produits. Enfin, dans la dernière partie du travail, une lignée de cellules MDCK infectables par le VIH a été établie. Ces cellules épithéliales polarisées ont été précédemment utilisées pour l'étude de la polarisation du VIH mais étant d'origine canine ne pouvaient être infectées par le virus. Les essais d'infection réalisés ont démontré que l'expression par transfection du récepteur et du co-récepteur viral, les molécules CD4 et CXCR-4, est suffisante pour permettre une infection productive par le VIH chez ces cellules. L'infection de ces cellules ensemencées sur un système de filtres semi-perméables a permis de mesurer l'infectivité spécifique des virions sortant des domaines apical et basolatéral de la membrane cellulaire. Une diminution de l'infectivité des

virions relâchés du domaine basolatéral a été interprétée comme une modulation de l'infectivité par la protéine cellulaire CD4 par ciblage de cette molécule à ce pôle de la cellule.

Globalement, les résultats présentés dans cette thèse soulignent l'importance, non seulement de la présence, mais également de la localisation intracellulaire de facteurs viraux ou cellulaires lors de la réplication virale.

Mots clefs: VIH; cellules épithéliales; enveloppe virale; assemblage viral; réplication virale; protéines accessoires.

ABSTRACT

The outcome of viral infections in general and that of HIV in particular, is largely determined by the nature of the interactions between viral and host-cell proteins. It entails that these interactions are responsible for the events related to the various replication steps controlled by mechanisms and proteins of the host cell. Many HIV protein phenotypes are cell type-dependent, demonstrating a functional interaction or a complementation between cellular and viral factors. The results and observations presented in this thesis show that aspects concerning the viral multiplication like cytopathogenicity and specific infectivity may be modulated not only by viral factors but by the host cell.

The first part of this study describes a functional interaction between the Vpu accessory protein and the polarisation/endocytosis signals located in the intracytoplasmic domain of the HIV-1 gp41 glycoprotein. This interaction is revealed by the differential modulation of viral infectivity caused by the polarisation/endocytosis signal depending on the presence or absence of Vpu. The second part presents a comparative study of HIV infection in three different cell clones derived from the Jurkat cell line. The observations showed that the three clones present different levels of cytopathic effects, different viral release and especially differences in specific infectivity of progeny virions. Finally, in the last part of the study, a MDCK cell line was established. These polarized epithelial cells were previously used for HIV polarization study but being from canine origin they could not be infected by the virus. The infection assays showed that transfection of expression vectors for the receptor and coreceptor of the virus, the CD4 and CXCR-4 molecules, is sufficient to support productive HIV infection by these cells. Infection of these cells grown onto semipermeable filter system allowed us to measure the specific infectivity of the virus released from the apical and basolateral domains of the cellular membrane. A decrease in infectivity of the viruses released from the basolateral domain was interpreted as a CD4 infectivity modulation, due to the targeting of this molecule to this cell pole.

Altogether, the results presented in this thesis underline the importance not only of the presence of viral and cellular factors but of their intracellular localisation at the time of viral replication.

Keywords: HIV; epithelial cells; viral envelope; viral assembly; viral replication; accessory proteins.

RESUMEN

El desarrollo de una infección viral en general, y por el VIH en particular, es determinado por la naturaleza de las interacciones entre las proteínas del virus y de la célula huésped. Estas interacciones suceden de suerte que muchos eventos ligados a las diferentes etapas de la replicación son controlados por mecanismos y proteínas pertenecientes a la célula huésped. Varios fenotipos de las proteínas del VIH dependen del tipo celular demostrando así una interacción funcional o una complementación entre factores celulares y virales. Los resultados y observaciones presentados en esta tesis demuestran que aspectos ligados a la multiplicación viral tales como la citopatología y la infectividad específica pueden ser modulados no solamente por factores virales sino por la célula huésped.

En la primera parte de este trabajo, una interacción de tipo funcional entre la proteína accesoria Vpu y las señales de polarización/endocitosis localizadas en la región intracitoplásmica de la glicoproteína gp41 del VIH es descrita. Esta interacción es puesta en evidencia gracias a la modulación diferencial de la infectividad viral por la señal de polarización/endocitosis según la presencia o ausencia de Vpu. En la segunda parte del trabajo, un estudio comparativo de la infección por el VIH de tres clones diferentes derivados de la línea celular Jurkat fue efectuado. Las observaciones realizadas demostraron que los tres clones presentan diferentes niveles de efectos citopáticos, diferentes niveles de salida viral y, sobretodo, una infectividad diferente de los virus producidos. Finalmente, en la última parte del trabajo una línea de células MDCK infectables por el VIH fue establecida. Estas células epiteliales polarizadas han sido utilizadas anteriormente en el estudio de la polarización del VIH pero, debido a su origen canino, no podían ser infectadas por el virus. Los ensayos de infección realizados demostraron que la expresión por transfección del receptor y del coreceptor viral, las moléculas CD4 y CXCR-4, es suficiente para desarrollar una infección productiva por el VIH en estas células. La infección de dichas células sembradas en un sistema de filtros semipermeables permitió determinar la infectividad específica de los viriones emergentes de las regiones apical y basolateral de la membrana celular. Una disminución de la infectividad de los viriones emergentes de la región basolateral fue interpretada como una

modulación de la infectividad por parte de la proteína celular CD4 debido a una orientación de esta molécula hacia ese polo de la célula.

Globalmente, los resultados presentados en esta tesis subrayan la importancia no solamente de la presencia sino igualmente de la localización intracelular de factores virales o celulares al momento de la replicación viral.

Palabras claves: VIH; células epiteliales; envoltura viral; ensamblaje viral; replicación viral; proteínas accesorias.

CHAPITRE 1

Revue bibliographique

1. INTRODUCTION

Le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) est une maladie caractérisée par un effondrement du système immunitaire de telle sorte que les personnes atteintes peuvent aussi être affectées par diverses autres maladies causées par des micro-organismes opportunistes. L'agent identifié comme responsable de cette maladie est un rétrovirus nommé Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (Gallo et al., 1983; Gallo et al., 1984; Levy et al., 1984).

Le VIH a été isolé pour la première fois en 1983 à partir d'un ganglion lymphatique d'un patient caucasien présentant des signes de lymphoadénopathies qui souvent précèdent le SIDA (Barré-Sinoussi, et al., 1983). Lors de sa découverte, le VIH a été décrit comme un rétrovirus appartenant à la famille du Human T-cell leukemia virus (HTLV), c'est-à-dire, comme un oncovirus à ARN de type C. Après différentes dénominations successives, il a été finalement reconnu comme membre du groupe des lentivirus et nommé Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (Murphy et al., 1995).

La localisation asymétrique des protéines membranaires dans les cellules polarisées est contrôlée par un système organisé de transport intracellulaire. L'assemblage des virus enveloppés dans des régions particulières de la cellule se fait en utilisant la machinerie de transport cellulaire. L'assemblage des virus enveloppés est donc devenu un bon modèle pour l'étude du transport de protéines membranaires dans un système de cellules épithéliales polarisées.

Dans cette revue bibliographique une vue d'ensemble du VIH sera présentée suivie des aspects touchant l'état de la littérature sur les cellules polarisées. L'objectif poursuivi est de situer le travail effectué au cours de cette thèse de doctorat dans un contexte plus global, c'est-à-dire, celui de la recherche fondamentale. Ainsi, l'historique de la maladie, de même que les aspects cliniques et son diagnostic ne sont pas abordés. Par contre, en ce qui concerne le virus lui-même, c'est-à-dire sa composition protéique, son organisation structurale et sa multiplication, ils seront

discutés dans la première section de la revue. Par la suite, les cellules polarisées et les aspects concernant leur structure, leur culture *in vitro* et les mécanismes de transport des protéines membranaires seront abordés.

2. LE VIRUS DE L'IMMUNODÉFICIENCE HUMAINE

2.1 Classification

Le VIH appartient à la famille des Retroviridae laquelle est constituée de sept genres: les rétrovirus de mammifères de type B, les rétrovirus de mammifères de type C, les rétrovirus aviaire de type C, les rétrovirus BLV-HTLV, les Spumavirus et les Lentivirus. Le VIH est classé dans le genre Lentivirus lequel est formé par les groupes lentivirus bovin, lentivirus équin, lentivirus félin, lentivirus ovin/caprin et lentivirus de primates. Dans ce dernier groupe est compris le VIH. Il en existe deux types: le VIH type 1 et le VIH type 2 (Murphy et al., 1995).

2.2 Pathologie de l'infection par le VIH.

Le VIH est donc connu pour son association avec le syndrome d'immunodéficience acquise. Il possède la capacité d'infecter d'une façon sélective et de rendre le système immunitaire incapable d'exercer une vraie fonction de défense contre divers micro-organismes (Fauci et al., 1984; Mellors et al., 1996). L'infection par le VIH est propagée par rapport sexuel, par contact avec du sang ou des produits sanguins contaminés et périnatalement de la mère à l'enfant (Fauci et al., 1984). Indépendamment du site d'entrée du virus, le dénominateur commun de l'infection par le VIH est le tropisme du virus pour certains types de cellules du système immunitaire et du système nerveux central. Ce phénomène donne comme résultat une immunosuppression et des anomalies neuropsychiatriques (Schnittman et al., 1989; Johnson, 1995).

À la base de l'immunodéficience acquise suite à l'infection au VIH est la déplétion des sous-populations auxiliaire/inducteur de lymphocytes T qui expriment le marqueur phénotypique CD4 (des cellules T4). Bien

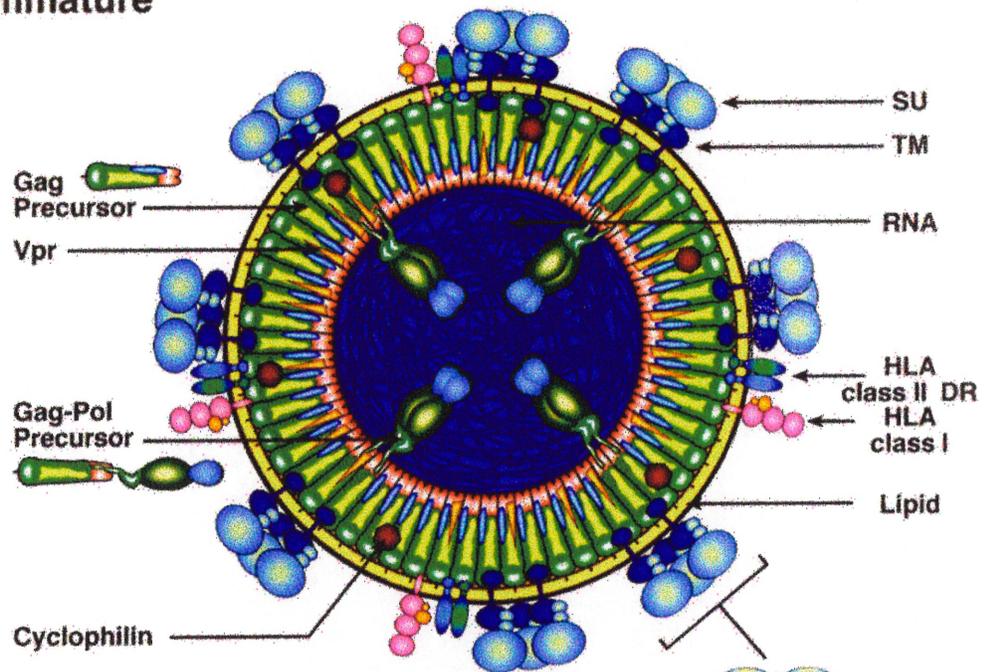
qu'un grand nombre d'anomalies immunologiques qui accompagnent l'infection par le VIH aient été décrites, la grande partie peut en être attribuée au défaut sélectif des lymphocytes T4. Le lymphocyte T4 est la cellule centrale impliquée directement ou indirectement dans l'induction d'une grande partie des fonctions immunologiques (Levy, 1993; Abbas et al., 1994)

2.3 Structure virale et propriétés physico-chimiques

En microscopie électronique, le virion du VIH possède les caractéristiques d'un lentivirus avec une capsidie en forme de cône et une membrane phospholipidique (Levy, 1993). La capsidie est formée par la protéine virale structurale, la p24 ou protéine CA. Dans cette capsidie on retrouve la ribonucléoprotéine composée par deux molécules identiques d'ARN de polarité positive, qui constituent le génome viral et par les protéines suivantes: la protéine de la nucléocapsidie, p9, et les enzymes protéase (PR), intégrase (IN) et ADN polymérase ARN dépendante. Cette dernière est nommée aussi transcriptase inverse (RT) et a comme rôle de copier l'ARN viral en ADN avant son intégration dans le génome de l'hôte. La surface intérieure de l'enveloppe virale est tapissée par une protéine myristylée, la p17 ou MA, qui constitue la matrice de la structure virale, vitale pour l'intégrité des virions (figure 1-1) (Frankel et al., 1998). Plusieurs travaux suggèrent que cette protéine est requise pour l'incorporation des glycoprotéines de l'enveloppe dans les virions matures (Yu et al., 1992; Dorfman et al., 1994b; Mammano et al., 1995).

La surface virale présente 72 spicules qui contiennent des trimères ou tétramères des glycoprotéines de l'enveloppe (Earl et al., 1990). Ces protéines sont dérivées d'un précurseur commun lequel est clivé en gp120, protéine de surface et gp41, protéine transmembranaire (McCune et al., 1988). Ces deux protéines restent liées entre elles de façon non covalente après le clivage (Helseth et al., 1991). La gp120 contient le site d'attachement au récepteur cellulaire et les principaux domaines visés par les anticorps neutralisants (Broliden et al., 1991; Shioda et al., 1991; Kwong et al. 1998; Wyatt et al. 1998), alors que la gp41 est essentielle

Immature



Mature

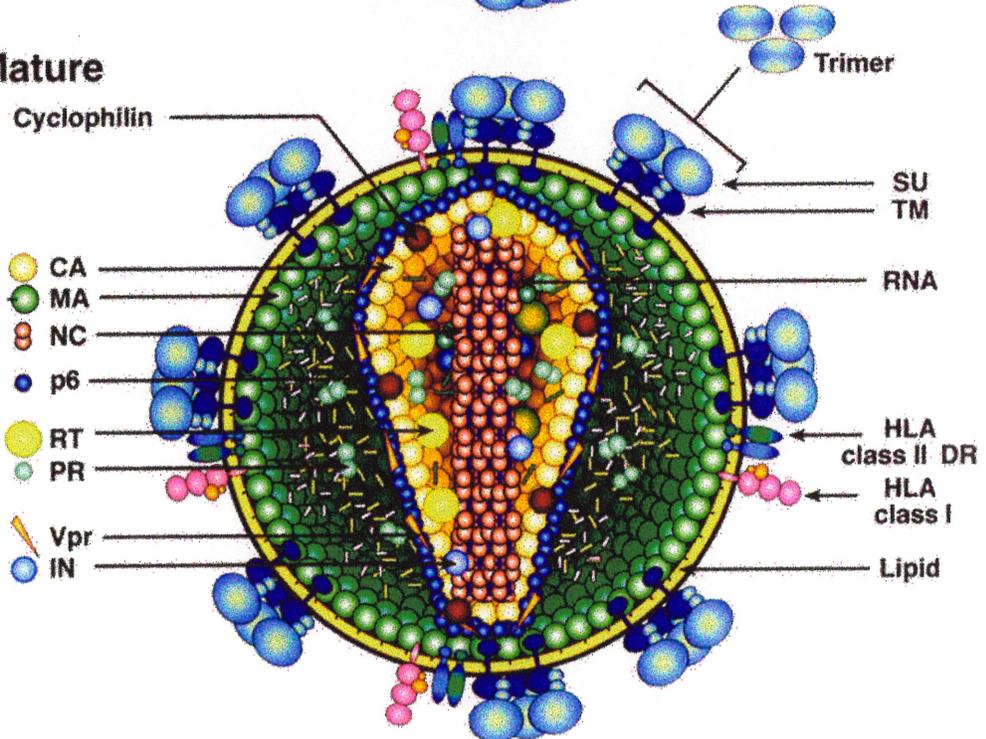


Fig. 1-1. Modèle de la structure de la particule virale du VIH. (Figure tirée de Coffin et al., 1997).

à la fusion des membranes virales et cellulaires (voir plus loin). Finalement, les protéines accessoires Vpr, Vif et Nef ont été retrouvées incorporées au virion bien qu'en quantités peu élevées pour les deux dernières (voir figure 1-1) (Cohen et al., 1990; Camaur et Trono, 1996; Welker et al., 1996).

2.4 Organisation génomique

Le génome d'environ 9000 paires de base du VIH est composé de neuf cadres de lecture ouverts qui codent pour au moins quinze protéines différentes (Frankel et Young, 1998). La synthèse de ces différentes protéines est rendue possible grâce à la formation de précurseurs polyprotéiques, la présence de plusieurs sites d'épissage, et de sites différents d'initiation de la traduction. Il existe trois types différents d'ARNs messagers (ARNm): non-épissé, mono-épissé et multi-épissé, possédant tous la même extrémité 5' non codante. Les précurseurs Pr55^{gag} et Pr160^{gag-pol} sont synthétisés à partir d'un ARNm non épissé. Les enzymes protéase, transcriptase inverse, et intégrase sont produites par clivage de Pol tandis que le clivage de Gag produit les protéines structurales p24, p17, p9 et p6 (Katz et Skalka, 1994; Wiegers et al., 1998). La protéine accessoire Vpu et la glycoprotéine d'enveloppe Env sont synthétisées à partir d'un ARNm mono-épissé commun en utilisant deux sites d'initiation différents (Schwartz et al., 1990a). Les protéines accessoires Vif et Vpr sont aussi synthétisées à partir d'ARNm mono-épissés (Schwartz et al., 1991). Finalement, les ARNm multi-épissés codent pour les protéines auxiliaires Tat, Rev et Nef (voir figure 1-2) (Schwartz et al., 1990b).

2.5 La multiplication virale

Le cycle viral du VIH peut être divisé globalement en deux étapes: l'établissement de l'infection ou étape précoce et l'expression de l'infection ou étape tardive (voir figure 1-5).

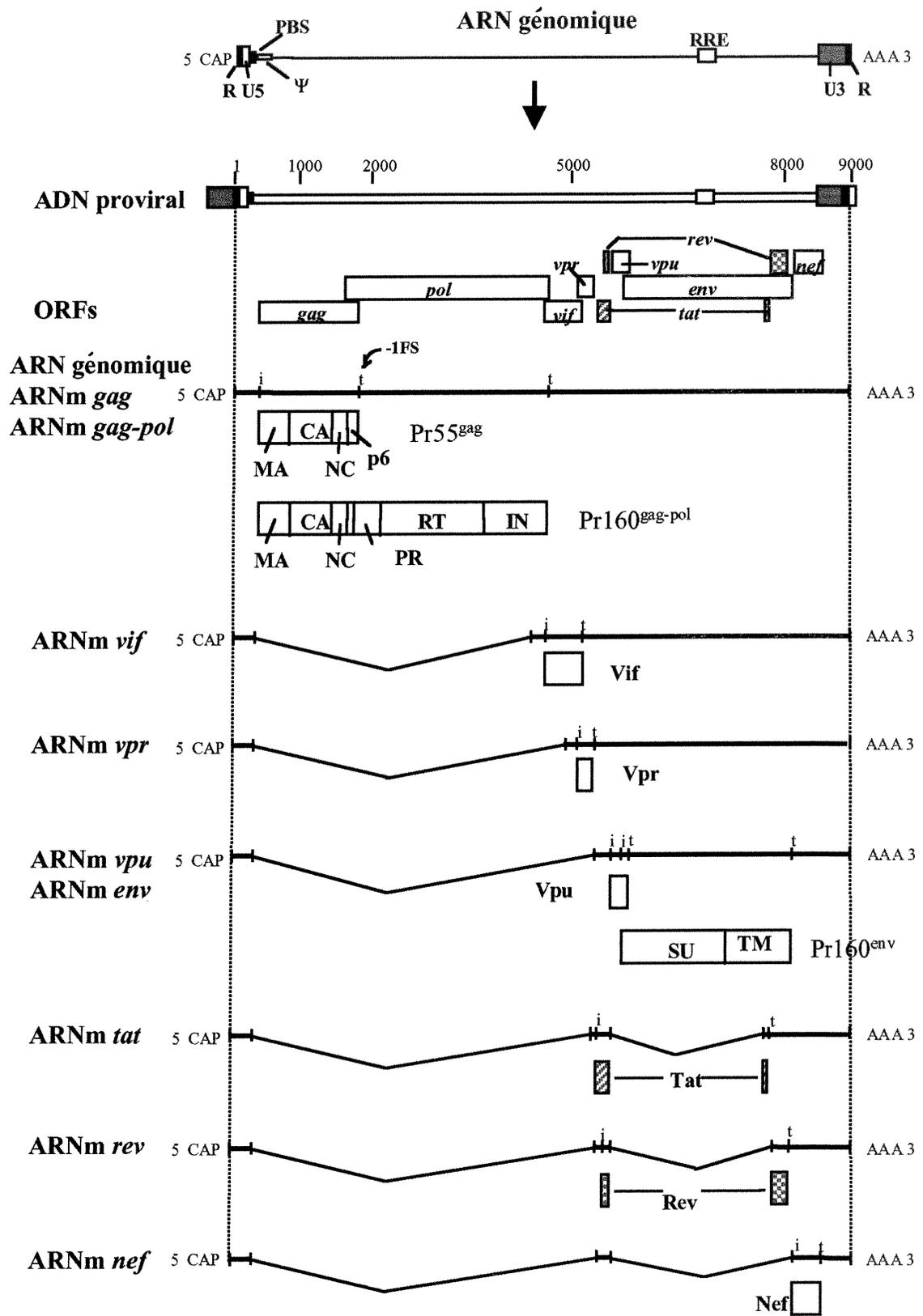


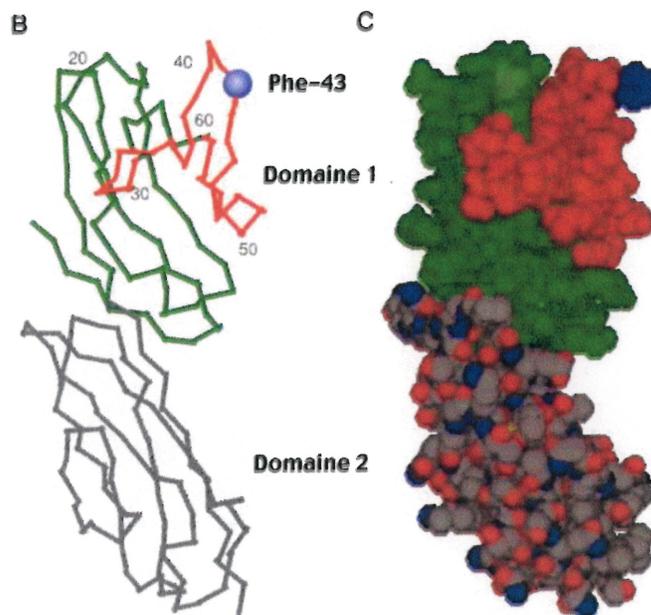
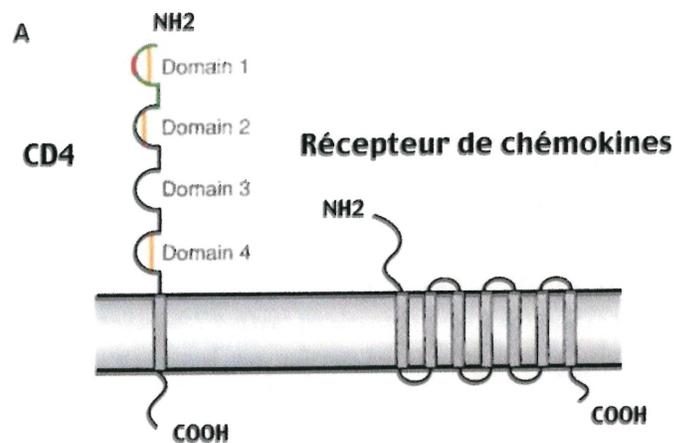
Fig. 1-2. Organisation génomique du VIH. PBS (=Primer Binding Site), RRE (=Rev responsive element), -1FS (=Frame Shift), i (=Codon d'initiation), t (=Codon de terminaison). (Figure tirée de Coffin et al., 1997).

2.5.1 Établissement de l'infection

Cette première étape comprend la série d'événement qui aboutissent à l'intégration de l'ADN proviral dans le chromosome de l'hôte.

2.5.1.1 Pénétration du virus

La molécule CD4, présente chez des sous-populations de lymphocytes, monocytes et macrophages, est le récepteur cellulaire pour le virus (Dalglish et al., 1984). Le virus s'attache à la molécule CD4 par une forte interaction de cette protéine de surface avec la glycoprotéine d'enveloppe virale, la gp120 (figure 1-3). L'interaction entre la gp120 et le récepteur viral n'est pas suffisante pour permettre l'entrée virale, qui nécessite d'autres événements. L'incapacité des cellules de souris à être infectées par le VIH, même après avoir été transfectées avec un vecteur d'expression de la protéine CD4 humaine, a suggéré qu'une autre protéine, exprimée dans les cellules T4 humaines, pourrait être requise pour l'internalisation du virus (Maddon et al., 1986). Des protéines portant sept domaines transmembranaires, et appartenant à la famille du récepteur à 7 domaines membranaires associé aux protéines G, ont été identifiées comme des corécepteurs cellulaires qui vont se lier au complexe gp120-CD4 et vont permettre l'entrée du virus (figure 1-3) (Moore et al., 1997). Le co-récepteur utilisé dépend de l'affinité de la gp120 pour ceux-ci: le récepteur de chémokines CCR-5 est utilisé par les virus dits macrophage-tropiques et le récepteurs de chémokine CXCR-4 par les virus lymphotropiques (Moore et al., 1997). Le mécanisme précis d'entrée du virus dans la cellule cible n'est pas clair, mais il a été démontré que la fusion de la portion transmembranaire (gp41) de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire est requise (voir figure 1-8) (Stein et al., 1987). Comme sera discuté dans la section 2.6.4.2, la liaison des chémokines au complexe gp120-CD4 entraîne des changements conformationnels dans les molécules gp120 et gp41. Ces changements permettent l'exposition d'une portion amino terminale de la gp41, appelée peptide de fusion, permettant d'initier la fusion des membranes virale et cellulaire (Sattentau et Moore, 1991). Une fois internalisés les virions vont subir le processus de décapsidation qui



D. Séquence du domaine de liaison à la gp120

	aa 20		aa 60
Humaine	QKKS IQFHWKNSNQIKILGNQG SFLTRG PSKLN DRAD SRRS		
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		
Souris	QKKITV FTWKFSDQIKILGQHKGVLIRGGSPSQ DFR DSRKG		

Fig. 1-3. Récepteurs pour le VIH. (A) Représentation schématique de CD4 et du récepteur des chémokines. (B) et (C) Domaines 1 et 2 de CD4 montrant les résidus importants pour la liaison à la gp120 (en rouge) et la Phe-43 critique pour cette liaison. (D) Séquences du site de liaison à la gp120 dans le domaine du CD4 humain et murin. (Figure tirée de Coffin et al., 1997).

précède la transcription inverse (figure 1-5) (Varmus, 1988; Cartier et al., 1999; Koh et al., 2000).

2.5.1.2 Transcription inverse et intégration du génome viral

Une fois le virus internalisé et décapsidé, l'ARN génomique viral est transcrit en ADN par l'enzyme viral appelé transcriptase inverse. La participation active d'une autre activité enzymatique de la transcriptase, la ribonucléase H, est aussi importante (Katz et Skalka, 1994). La synthèse de l'ADN est initiée par l'élongation d'un ARN de transfert (ARNt) cellulaire, l'ARNt^{lys3}, lié à un site près de l'extrémité 5' du génome viral appelé site de liaison de l'amorce (ou PBS= primer binding site). Cet ARNt cellulaire s'associe à l'ARN viral lors de l'assemblage viral (Barat et al., 1989). L'élongation va se continuer jusqu'à la fin du génome viral, résultant en un brin d'ADN de polarité négative. La ribonucléase H virale dégrade partiellement l'ARN (ce qui est aligné à l'ADN de polarité négative), permettant la synthèse du deuxième brin d'ADN, de polarité positive, par la transcriptase inverse. Une fois complétée la transcription inverse, on retrouve une molécule d'ADN proviral bicaténaire, copie de l'ARN génomique original, mais qui porte en plus la structure répétitive LTR (Long terminal Repeat) à chaque extrémité (figure 1-4) (Katz et Skalka, 1994).

Suite à la synthèse de l'ADN proviral, celui-ci est transporté au noyau dans un complexe de protéines appelé complexe de préintégration, constitué de l'intégrase et d'autres enzymes viraux et cellulaires (Miller et al., 1997). L'ADN proviral, lequel peut exister sous forme linéaire ou circularisé, est intégré à l'ADN chromosomique de l'hôte par un processus dépendant de l'intégrase codée par le gène viral *pol* (Varmus, 1988). Seul les formes linéaires sont intégrées. Les formes circulaires se trouvent spécifiquement au noyau des cellules infectées et constituent des impasses du processus répliatif (Levy et al., 1985). Ce même phénomène a été observé chez d'autres rétrovirus cytopathiques (Keshet et Temin, 1979).

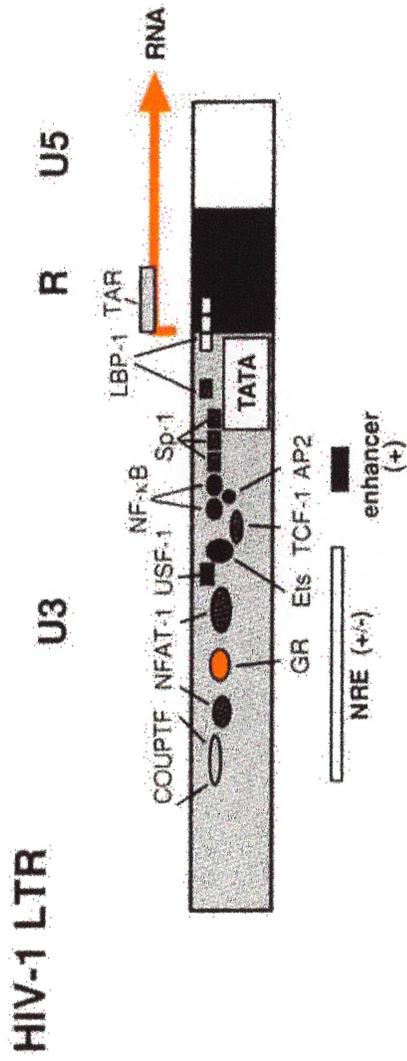


Fig. 1-4. Structure LTR 5' de l'ADN proviral du VIH-1. (Figure tirée de Coffin et al. 1997).

2.5.2 L'expression provirale

Après l'intégration, l'infection peut assumer une phase de latence avec restriction du cycle de réplication jusqu'à ce que la cellule infectée soit activée (Greene, 1991). Dans les cellules T, par exemple, l'initiation de la transcription des gènes viraux est reliée à des activations physiologiques des cellules T dû à des stimulations par des antigènes ou cytokines. Les LTRs du VIH sont donc influencés par des stimulations de la cellule hôte via les récepteur des cellules T (TCR) et les cytokines. Des lectines qui se lient au TCR, le facteur de nécrose tumorale et la lymphotoxine sont capables de stimuler l'expression des gènes du VIH dans les cellules T, probablement par induction de facteurs nucléaires qui vont se lier à des séquences pour la liaison du facteur de la transactivation NF- κ B (Greene, 1990). Suite à l'activation de la cellule l'expression des gènes de régulation du VIH va débiter suivi de celle des gènes structuraux et de ceux codant pour les fonctions enzymatiques du virus (Greene, 1991).

L'expression provirale commence avec la synthèse d'une molécule complète d'ARN viral, copie de l'ADN proviral. Le site d'initiation de la transcription prend place dans une des séquences virales terminales, le LTR en 5' (figure 1-4). La transcription est réalisée par l'enzyme cellulaire ARN polymérase II, qui se fixe à la séquence promotrice (boîte TATAA) localisée dans la région U3 de l'ADN viral (Coffin, 1991). Ce processus est contrôlé par des protéines de la cellule hôte telles que NF-KB, exprimé chez les lymphocytes (Nabel et Baltimore, 1987), et le facteur ubiquitaire SP1 (Jones et al., 1986). Des séquences spécifiques pour la liaison de ces deux activateurs de la transcription sont présentes dans la même région U3 (figure 1-4) (Nabel et Baltimore, 1987; Harrich et al., 1989).

Il a été déterminé que la population initiale d'ARN messagers (ARNm) qui atteint le cytoplasme est constituée par des ARN multi-épissés. Ces petits ARNm sont capables de traverser la membrane nucléaire pour être traduits et produire les protéines régulatrices du virus Tat, Rev et Nef (Kim et al., 1989). Le rôle assigné à Tat est la

transactivation de l'expression de tous les gènes viraux en se liant sur une structure tige-boucle appelée TAR (*trans*-activating response element). L'effet principal de Tat est de stimuler l'élongation lors de la transcription, par phosphorylation de la portion externe de l'ARN polymérase préalablement liée à l'ADN. Cette phosphorylation est accomplie par les protéines cellulaires cycline T et la protéine kinase-9 cycline-dépendante (Cdk9), recrutées par Tat lors de l'interaction avec TAR (Reines et al., 1996; Wei et al., 1998).

L'activité régulatrice de Rev est exercée au niveau post-transcriptionnel en favorisant le transport nucléocytoplasmique des ARNm non épissés et mono-épissés qui codent pour les produits des gènes *gag*, *pol* et *env* (Sodroski et al., 1986; Malim et Cullen., 1991). Comme Tat, Rev interagit avec un motif hautement structuré appelé RRE (Rev responsive element). Cette interaction entraîne le recrutement des facteurs cellulaires Exportine 1 ou CRM1 et Ran, chargés de l'exportation des ARNs vers le cytoplasme (Miller et al., 2000; Malim et al., 1989; Pollard et Malim, 1998).

Le produit du gène *nef* est une protéine exprimée très précocement dans le cours de l'infection, mais contrairement à Tat et Rev, son rôle n'est pas essentiel dans la réplication virale (Terwilliger et al., 1986). Bien qu'il y ait des controverses sur le rôle de Nef dans l'expression des gènes viraux, il existe de nombreuses données sur le phénotype associé à Nef. Celles-ci seront discutées dans la section dédiée aux protéines accessoires

La polyprotéine Gag est synthétisée sur des ribosomes libres à partir d'un ARNm non épissé. Étant donné que le gène *pol* se trouve dans un cadre de lecture différent de celui de *gag*, un changement de cadre de lecture doit avoir lieu pour la synthèse du précurseur Pr60^{gag-pol}. En général la polyprotéine Gag est produite en quantités 10 fois plus élevées que la polyprotéine Gag-Pol, ce qui reflète la faible efficacité du changement de cadre de lecture (Jacks et al., 1988). Les enzymes virales protéase, transcriptase inverse, et intégrase vont être produites par clivage du précurseur Gag-Pol (Katz et Skalka, 1994), tandis qu'une

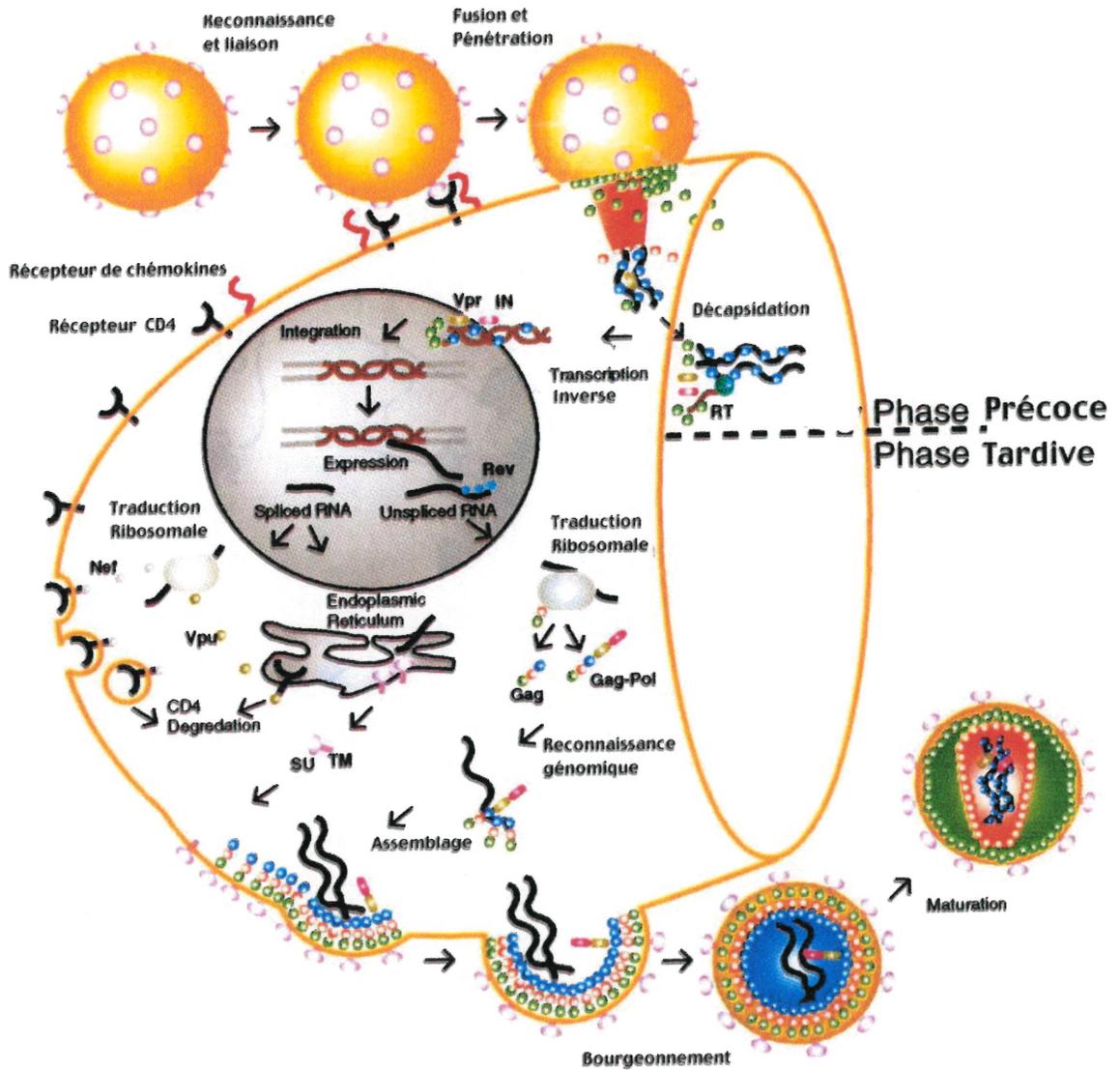


Fig. 1-5. Schéma général du cycle de réplication du VIH.
 (Figure tirée de Turner et Summers, 1999).

réaction similaire produit les protéines p24, p17, p9 et p6 à partir du précurseur Gag (Wiegers et al., 1998).

Les protéines d'enveloppe (Env) sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique sous forme d'un précurseur gp160 à partir d'un ARNm mono-épissé, qui code aussi pour la protéine accessoire Vpu (Hunter et Swanström, 1990; Schwartz et al., 1990a). Après clivage par une protéase cellulaire (furine), le précurseur est converti en gp120 et gp41 (Einfeld, 1996). Enfin, les protéines accessoires Vif et Vpr, sont aussi des protéines dépendantes de Rev (Schwartz et al., 1991).

2.6 Les protéines virales

Étant donné la complexité du VIH et les différents niveaux d'interaction qui peuvent exister entre ses composantes protéiques, celles-ci seront présentées de manière plus détaillée pour mieux comprendre leur fonction.

2.6.1 Les protéines de structure

La polyprotéine Gag interagit avec l'ARN génomique, la polyprotéine Gag-Pol, l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. Pr55Gag est aussi capable de s'assembler en pseudovirions sans la présence d'aucun autre facteur viral. Durant ou immédiatement après l'assemblage de la particule virale, l'enzyme protéase est activée et le précurseur Gag est clivé en quatre protéines: matrice (p17MA), capsid (p24CA), nucléocapsid (p9/p7NC) et la protéine p6Gag. La polyprotéine Pr160Gag-Pol est aussi clivée par la protéase pour générer les enzymes virales: protéase, transcriptase inverse et intégrase (Pavlakakis, 1997). Le mécanisme du bourgeonnement viral contrôlé par Gag a été le sujet d'investigation durant plusieurs années. Il est accepté maintenant que la protéine Gag possède trois petits domaines qui agissent ensemble pour produire des particules virales. Le domaine d'association à la membrane (domaine M), contenu dans la région de la matrice, est formé de 32 acides aminés. Ce domaine possède l'information nécessaire pour

diriger aussi des protéines hétérologues (autres que Gag) vers la membrane plasmique. Le domaine d'interaction (domaine I) est la région la plus importante pour l'interaction entre les protéines Gag et est contenue dans des séquences de la nucléocapside. Le domaine I permet un assemblage compact des protéine Gag qui résulte en la formation de particules d'une densité normale. La fonction menant à la séparation des membranes virales et cellulaires est réalisée en partie par le domaine tardif (domaine L = late) qui réside dans la séquence appartenant à p6 (Garnier et al., 1998).

2.6.1.1 La protéine de la matrice

Bien que la structure de la protéine de la matrice soit monomérique en solution, elle se cristallise sous la forme d'un trimère. Ce type de structure est considéré comme nécessaire pour la formation de la « coquille » qui protège l'intégrité du virion mature, les trimères formant une large surface basique qui interagit avec le côté intérieur acide de la membrane virale. Dans ce modèle, les résidus myristylés en position amino-terminale sont à proximité de la membrane virale et les hélices C terminales sont projetées vers le centre du virus (Nermut et Thomas, 1994).

La protéine de la matrice possède une glycine myristylée à son extrémité N-terminale, importante pour le ciblage du précurseur Gag vers la membrane cellulaire. Les 31 derniers acides aminés en position amino-terminale ont aussi été rapportés comme étant impliqués dans ce transport (Zhou et al., 1994). Une interaction spécifique de la région comprenant les 100 premiers acides aminés avec la queue intracytoplasmique de la glycoprotéine gp41 a été aussi rapportée. Cette région de la matrice semble être impliquée dans l'ancrage de la glycoprotéine d'enveloppe à la particule virale (Mammano et al., 1995).

Finalement, la matrice joue un rôle important dans la formation et le transport du complexe de preintégration vers le noyau (Bukrinski, et al., 1992). Une sous-population des protéines de la matrice qui est phosphorylée sur des résidus Tyr et Ser compose le complexe ribonucléoprotéique appelé à devenir le complexe de préintégration

(Gallay et al., 1995). En plus, l'existence d'un signal de localisation nucléaire pourrait contribuer au transport nucléaire du complexe de préintégration (Bukrinski et al., 1993; Gallay et al., 1995).

2.6.1.2 La protéine de la capsid

La protéine majeure de la capsid (CAp24) forme une structure dense en forme de cône observée au centre du virion mature, encapsidant l'ARN viral, les protéines de la nucléocapsid et les protéines enzymatiques (Turner et Summers, 1999). Des études contrôlés par RMN ont révélé l'existence de deux domaines: le domaine d'oligomérisation C-terminal et le domaine de la capsid, N terminal, les deux domaines étant essentiels pour l'intégrité virale (Gamble et al., 1997; Gitti et al., 1996). Des mutations ou délétions dans le premier domaine bloquent la réplication et empêchent la formation de particules virales, tandis que des mutations dans le deuxième domaine permettent la synthèse de virions assemblés mais qui ne sont pas infectieux et dont la capsid n'a pas une structure normale (Dorfman et al., 1994a; Reicin et al., 1995). Le domaine C-terminal (résidus 152-231) fonctionne principalement au niveau de l'assemblage et est important pour la dimérisation de CA et l'oligomérisation de Gag (Gamble et al., 1997). Le domaine N-terminal (résidus 1-151) est important pour l'infectivité, apparemment du à une participation dans la décapsidation virale par son association avec la cyclophiline A (CypA) (Luban , 1993; Thali et al., 1994).

Le site de liaison à la CypA est une boucle sur le domaine N-terminal qui contient une proline critique (Pro90) (Gitti et al., 1996). La double fonction de la CypA dans l'assemblage et l'infectivité virale est due à un rôle de chaperone, en facilitant la condensation correcte de la capsid lors du processus de maturation virale et la déstabilisation de la structure de la capsid au cours de la décapsidation (Gross et al., 1998; Gamble et al., 1996).

Finalement, la protéine CA contient la région MHR (Major Homology Region), une séquence de 20 acides aminés, une des plus conservées parmi toutes les CA rétrovirales, essentielle pour

l'assemblage de la particule virale et peut-être pour l'incorporation de Gal-Pol par son interaction avec Gag. MHR est capable d'adopter une conformation compacte et de former un réseau basé sur la formation de ponts hydrogène qui stabilisent la structure de la capsid. D'autre part, plusieurs résidus présents dans cette région, contribuent à la nature hydrophobique de la capsid (Srinivasakumar et al., 1995).

2.6.1.3 La protéine de la nucléocapsid

La majeure partie des fonctions réalisées par la nucléocapsid (NC) du VIH sont reliées à ses interactions avec l'acide nucléique. À l'intérieur du précurseur Gag, la NC est capable de reconnaître et d'encapsider le génome viral ainsi que d'incorporer l'ARN^{t^{lys3}} qui servira d'amorce à la transcription inverse (Aldovini et Young, 1990; De Rocquigny et al., 1992). Une fois maturée par clivage protéolytique, la NC catalyse la formation du dimère d'ARN génomique retrouvé dans la particule virale (Fu et al., 1994). Elle forme aussi le complexe ribonucléoprotéique et permet l'initiation de la transcription inverse en liant l'ARN^{t^{lys3}} au site de liaison de l'amorce du génome viral lors des étapes précoces de l'infection (Barat et al., 1993; Cen et al., 2000). Enfin, la NC est capable de former des interactions NC-NC interprotéiques lors de l'assemblage viral (Zang et al., 1998).

La fonction de reconnaissance et d'encapsulation du génome viral est réalisée par deux motifs en doigt de zinc, Cys-X2-Cys-X4-His-X4-Cys, (où X est n'importe quel acide aminé) qui interagissent avec une séquence d'environ 120 nucléotides située à l'extrémité 5' de l'ARN non épissé. Cette région est nommée site Ψ et est reconnue par la NC au sein du précurseur Gag (South et Summer, 1993). Des mutations qui éliminent les motifs en doigt de zinc résultent en la production de virions non-infectieux qui n'ont pas d'ARN (South et Summer, 1993; Berkowitz et al., 1995; Aldovini et Young, 1990).

2.6.1.4 La protéine p6

Les 51 derniers acides aminés C terminaux de Gag correspondent à la protéine p6. La principale fonction déterminée pour cette petite protéine est l'interaction avec Vpr, résultant en l'incorporation de la

protéine accessoire dans le virion (Bachand et al., 1999). Le motif hautement conservé L-X-S-L-F-G dans p6 semble essentiel à cette interaction (Checroune et al., 1995). p6 est impliquée aussi dans l'efficacité de relâche de la particule virale. Des acides aminés compris entre les résidus 7 et 10 de la protéine ont été rapportés comme étant importants pour cette fonction (Huang et al., 1995).

2.6.2 Les enzymes virales

Les enzymes virales sont synthétisées sous forme d'un précurseur, la polyprotéine Gal-Pol (Pr160Gag-Pol), à partir d'un ARNm non épissé. Durant ou immédiatement après le processus d'encapsidation au niveau de la membrane plasmique, la protéase (PRp11), une enzyme structurellement similaire à d'autres aspartyl protéases, est libérée du précurseur par un mécanisme d'autoclivage. L'activité catalytique de la protéase va libérer aussi les protéines de structure et les autres enzymes virales: la transcriptase inverse et l'intégrase (Peng et al., 1989; Pavlakis, 1997).

La transcriptase inverse (RTp66/p51) est un hétérodimère composé de deux molécules, les sous-unités p66 et p51. Lors du clivage par la protéase, un homodimère formé de deux molécules p66 est dérivé du précurseur Gal-Pol. Un domaine avec activité polymérase et un autre avec activité ARNase H sont présents dans chaque molécule. Un clivage au niveau du C-terminal d'une des deux sous-unités, élimine son domaine ARNase H pour donner la protéine mature, l'hétérodimère p66-p51 (Turner et Summers, 1999). La transcription inverse est initiée à partir de l'extrémité 3' de l'amorce ARN^{lys3} lié au PBS près de l'extrémité 5' de l'ARN génomique (Barat et al., 1989). La transcriptase inverse, en plus de son activité ADN-polymérase ARN-dépendante, possède aussi une activité ADN-polymérase ADN-dépendante. L'activité ARNase H est utilisée pour dégrader le brin d'ARN hybridé à l'ADN négatif pendant la réaction de transcription inverse (Katz et Skalka, 1994).

L'intégrase virale est une protéine de 31 kDa. La fonction principale qui lui est attribuée est l'intégration de l'ADN proviral au

génomique de la cellule hôte. L'intégrase possède la double activité d'endonucléase et de ligase d'ADN, essentielles pour accomplir une telle fonction (Katz et Skalka, 1994). Elle est séparée structurellement et fonctionnellement en trois domaines: un domaine N-terminal en doigt de zinc qui facilite l'oligomérisation, une région centrale possédant l'activité catalytique et une région C-terminale qui va lier l'ADN (Brown, 1997). Enfin, l'intégrase a été retrouvée comme une composante importante dans la formation du complexe de préintégration, contenant un signal de localisation nucléaire important au transport nucléaire du complexe de préintégration (Gallay et al., 1997).

2.6.3 Les protéines auxiliaires

En plus des protéines dites de structure et des enzymes nécessaires à la réplication des rétrovirus, les lentivirus, étant donné leur complexité, codent pour des protéines qui ont des rôles importants dans la biologie du virus. Le VIH, en tant que lentivirus, code donc pour des protéines appelées auxiliaires qui sont classées en deux groupes: les protéines régulatrices et les protéines accessoires. Les premières sont essentielles pour l'expression correcte des gènes viraux tandis que les secondes sont importantes, entre autres, pour l'assemblage, la relâche et l'infectivité virale.

2.6.3.1 Les protéines régulatrices

Protéine Tat

Tat est une protéine régulatrice de 16 kDa (86 acides aminés), synthétisée à partir de deux exons d'un ARNm multi-épissé qui est essentielle pour la réplication du VIH-1 (Dayton, 1986). L'ARNm codant pour cette protéine est transporté au cytoplasme d'une manière indépendante de Rev.

Protéine Rev

Rev est une protéine phosphorylée de 19 kDa qui, comme Tat, est essentielle pour la réplication du VIH-1. Cette protéine régulatrice participe au transport spécifique des ARNm, non épissés ou mono-

épissés, à partir du noyau vers le cytosol. Rev interagit sous forme d'oligomère, avec un motif localisé dans les ARNs. Ce motif appelé RRE (Rev responsive element) est localisé dans une région non épissée du gène env. Cette interaction va promouvoir le transport, la stabilité et la traduction des ARNm responsables de la production de protéines structurales du virion (Malim et al., 1989). En absence de Rev, les ARNm viraux restent séquestrés dans le noyau, où ils sont soit complètement épissés ou dégradés (Pollard et Malim, 1998). Rev contient un domaine basique riche en arginines qui possède les fonctions de signal de localisation nucléaire, d'interaction avec RRE et de multimérisation au site de l'interaction (Malim et al., 1989).

2.6.3.2 Les protéines accessoires

La désignation de « protéines accessoires » vient du fait que ces protéines auxiliaires ne sont pas indispensables pour la réplication virale et parce que des mutations qui affectent l'expression de ces protéines ne perturbent pas la cinétique de réplication virale, au moins *in vitro*. Néanmoins, ces protéines sont capables de moduler des événements importants de la réplication virale, et ce même *in vitro*. D'ailleurs leurs implications au niveau de la pathogénèse virale et de la progression de la maladie ont été démontrés. Enfin, plusieurs phénotypes associés à l'expression de chacune des protéines accessoires, Nef, Vpr, Vif et Vpu, ont été rapportés (Subbramanian et Cohen, 1994).

Protéine Nef

Cette protéine myristilée de 27 kDa est exprimée à haut niveau précocement après l'infection (Goldsmith et al., 1995). Nef a été associée au maintien élevée de la charge virale *in vivo*, aussi bien chez VIH que chez le virus d'immunodéficience simien (VIS). L'effet de Nef est aussi important dans la multiplication virale et la pathogénèse car des virus défectif pour Nef ont montré un délai considérable dans le développement de la maladie chez les individus infectés (Kestler et al. 1991; Learmont et al., 1999). Le phénotype relié à Nef qui est le mieux caractérisé est la diminution du récepteur CD4 au niveau de la surface cellulaire (Mariani et Skowronski, 1993; Mangasarian et Trono, 1997).

L'endocytose de CD4 de la surface cellulaire permet d'éviter la réinfection des cellules par les virions relâchés et d'augmenter l'incorporation de l'enveloppe dans les virions en augmentant l'infectivité virale (Lama et al., 1999). Elle prévient aussi le phénomène d'agrégation virale résultant de l'interaction de CD4 avec les glycoprotéines d'enveloppe sur les virus naissants (Ross et al., 1999). Le mécanisme d'endocytose de CD4 par Nef est décrit comme un recrutement de CD4 par Nef dans la voie de vésicules à clathrine par interaction avec le complexe d'adaptines. L'internalisation de CD4 dépend de la présence dans la région C-terminale de la protéine Nef des motifs basés sur des dileucines qui interagissent avec les complexes d'adaptines (Bresnahan et al., 1998; Greenberg et al., 1998). La sensibilité de CD4 à l'internalisation est conférée par un motif basé sur des dileucines localisé dans la région cytoplasmique de CD4 proximale à la membrane (Aiken et al., 1994). Cependant, des études ultérieures ont indiqué que ce motif dileucine sur CD4 n'est pas suffisant pour la modulation par Nef et qu'une hélice α localisée dans la queue cytoplasmique de CD4 est aussi requise (Gratton et al., 1996). Nef est capable d'interagir et de se lier de façon spécifique à la famille Src de tyrosine kinase en utilisant le motif Pro-X-X-Pro. L'observation que ce motif est essentiel pour atteindre une prolifération maximale du VIH dans des cellules primaires suggère que l'interaction de Nef avec les Src kinases peut être responsable de l'augmentation de la réplication et de l'infectivité virale (Saksela et al., 1995). Des travaux récents ont démontré l'existence d'une interaction de type fonctionnelle entre un mutant naturel de Nef et la queue intracytoplasmique de la gp41 (Olivetta et al., 2000). Nef est capable aussi d'exercer une régulation négative des récepteurs du complexe majeur d'histocompatibilité au niveau de la surface de la cellule infectée, contribuant ainsi aux mécanismes de persistance et d'évasion immunitaire du virus (Schwartz et al., 1996; Collins et al., 1998; Stumptner-Cuvelette et al., 2001). Enfin, Nef module l'activation des lymphocytes à la hausse ou à la baisse (Baur et al., 1994).

Protéine Vpr

Le produit du gène *vpr* est une protéine de 14 kDa de localisation nucléaire qui est incorporée dans la particule virale par une interaction avec le domaine p6 du précurseur Gag (Paxton et al., 1993). Cette observation suggère que Vpr est utilisée lors des étapes précoces de l'infection virale. En effet, cette protéine de localisation nucléaire fait partie, avec l'intégrase, la matrice, la transcriptase inverse et certaines protéines cellulaires, du complexe de préintégration qui importe l'ADN néosynthétisé vers le noyau (Nie et al., 1998). De plus, l'absence de Vpr dans la particule virale réduit l'efficacité d'infection des cellules qui sont en arrêt de division, comme les macrophages (Connor et al., 1995).

Une autre fonction bien caractérisée de Vpr est l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (He et al., 1995). Cette fonction de Vpr survient lors des étapes précoces de l'infection et est réalisée par la protéine présente dans le virion. De plus, cet arrêt augmente l'expression des gènes dirigée par le LTR, stimulant, en conséquence la réplication virale dans les cellules en division. L'effet positif de Vpr sur le LTR peut potentialiser la transactivation due à Tat en augmentant l'expression de celui-ci. (Hrimech et al., 1999).

Protéine Vif

Le phénotype associé à cette protéine de 23 kDa est une augmentation considérable de l'infectivité des virions matures (Fan et Peden, 1992). Cette caractéristique de Vif n'est observée que chez les virus libres. Dans le contexte d'infection par contact cellule-cellule, la capacité infectieuse n'est pas affectée en absence de Vif. Ceci suggère que la diminution de l'infectivité est reliée à un défaut des virions générés en absence de Vif (Fisher et al. 1987). L'importance de la présence de Vif dépend du type de cellule où les virus sont produits, variant de cellules non permissives ou semi-permissives jusqu'aux cellules dites permissives. Il est possible qu'un ou plusieurs facteurs au sein des cellules permissives puissent accomplir le rôle de Vif (Gabuzda et al., 1992a). Les virions produits en absence de Vif présentent une importante altération dans leur morphologie et dans les quantités des protéines Gag et Pol. Cette observation suggère que Vif joue un rôle essentiel dans les étapes

d'assemblage et/ou maturation virale (Hoglund et al., 1994). D'autre part, il a été démontré que des virions défectifs pour Vif, bien qu'ils contiennent des quantités normales d'ARN viral, sont incapables d'accomplir la synthèse d'ADN proviral après infection des cellules cibles. Ce blocage de la synthèse provirale pourrait être la conséquence d'une encapsidation anormale de la nucléoprotéine, affectant par la suite la décapsidation et/ou la reverse transcription (Sova et Volsky, 1993).

Protéine Vpu

Vpu est une protéine membranaire de type I synthétisée à partir d'un ARN bicistronique, dépendant de Rev. Ce même ARN code aussi pour la protéine d'enveloppe virale. La protéine Vpu est retrouvée exclusivement chez les virus VIH-1 et VIScpz, un isolat de chimpanzé, et aucun gène similaire n'ayant été retrouvé chez le VIH-2 ni VIS (Cohen et al., 1988; Cohen et al., 1996). Cette protéine de 81 acides aminés possède une région N-terminale transmembranaire hydrophobique et une région C-terminale cytoplasmique hydrophilique (Maldarelli et al., 1993). Cette dernière région possède deux structures en hélice α qui ont une importance fonctionnelle (Tiganos et al., 1997). Vpu peut être phosphorylée par la caséine kinase II au niveau des serines 52 et 56 (voir figure 1-9) (Schubert et al., 1994).

Vpu possède deux phénotypes bien établis et ayant des répercussions importantes dans la biologie du VIH: induction de la dégradation de la molécule CD4 au niveau du RE et augmentation de la relâche virale à partir de la membrane plasmique des cellules infectées.

Dégradation de la protéine CD4

Le précurseur de l'enveloppe, la polyprotéine gp160, après synthèse dans le RE et avant d'être clivé en protéines gp120 et gp41, est souvent retenu dans cette organelle par interaction avec la molécule CD4. Vpu induit la dégradation de CD4 à partir du complexe CD4-gp160 et peut ainsi permettre, présumément, le transport de la gp160 vers la membrane cellulaire et son incorporation dans la particule virale (Cohen et al., 1996). Il a été démontré que Vpu peut induire la dégradation de CD4 même en absence d'Env et des autres protéines virales.

La dégradation requiert la colocalisation de CD4 et Vpu dans le RE et exige la présence de séquences spécifiques localisées dans les deux molécules. L'analyse de mutants de CD4 présentant différentes spécificités de liaison à Vpu, a démontré que la sensibilité de dégradation de CD4 dépend de sa capacité à lier Vpu (Willey et al., 1994; Bour et al., 1995). Des essais d'immunoprécipitation ont révélé que des mutations qui déstabilisent des structures en hélices α de CD4, localisées dans le domaine cytoplasmique proximal à la membrane, affectent l'interaction CD4-Vpu (Tiganos et al., 1997). La stimulation de la dégradation de CD4 semble aussi requérir le domaine transmembranaire de CD4 (Buonocore et al., 1994).

En ce qui concerne Vpu, des séquences critiques pour l'interaction et l'induction de la dégradation de CD4 ont été localisées dans le domaine C-terminal cytoplasmique de la protéine. L'altération des deux hélices α localisées dans cette région a démontré qu'elles sont toutes deux essentielles pour la dégradation de CD4, mais que seulement celle localisée en position proximale à la membrane (hélice α I), est impliquée dans l'interaction entre Vpu et CD4 (Tiganos et al., 1997). En outre, des protéines Vpu mutantes dans un ou l'autre des deux sites de phosphorylation (Ser52 et/ou Ser56), sont incapables d'induire la dégradation de CD4, bien que leur capacité d'interagir avec la région cytoplasmique de CD4 reste intacte (figure 1-9) (Bour et al., 1995; Tiganos et al. 1997). Ces résultats suggèrent que l'interaction Vpu-CD4 est essentielle mais non suffisante pour induire la dégradation de CD4. Enfin, il a été proposé que l'induction de la dégradation de CD4 par Vpu requiert la participation de la voie cytosolique ubiquitine-protéasome car elle peut être bloquée par des inhibiteurs du protéasome (Schubert et al., 1998). Margottin et collaborateurs ont proposé un modèle pour la dégradation de CD4 basé sur des travaux réalisés par ce groupe et sur des observations précédentes. La rétention de CD4 dans le RE suite à la formation de complexes stables avec le précurseur gp160 permet l'interaction de Vpu exprimé dans le RE avec le domaine proximal à la membrane correspondant à la région cytoplasmique de CD4. Vpu liée à CD4 recrute la protéine cellulaire β TrCP vers la membrane formant un

complexe qui recrute la protéine Skp1p, un facteur de ciblage vers la protéolyse moyennant l'ubiquitination. L'interaction avec Skp1p entraîne l'ubiquitination et la dégradation subseuente de CD4 via le protéasome. β TrCP et Skp1p sont donc des composantes importantes d'une nouvelle voie de dégradation associée au RE et impliquée dans la protéolyse de CD4. Les séquences de β TrCP impliquées dans l'interaction avec Vpu et Skp1p sont, respectivement les motifs nommés WD et F-box. La séquence de Vpu requise pour l'interaction avec β TrCP comprend les phosphoserines 52 et 56 (Margottin et al., 1998).

L'induction de la dégradation de CD4 par Vpu entraîne des conséquences importantes pour la biologie du virus: des travaux récents suggèrent fortement que Vpu est capable d'augmenter l'infectivité virale par diminution de la quantité de CD4 exprimé à la surface de la cellule infectée et/ou incorporé au virion. Ceci favoriserait l'incorporation d'Env dans la particule virale (Lama et al, 1999). D'autre part, cette fonction de Vpu pourrait contrecarrer un effet inhibiteur de CD4 sur la relâche virale dépendante de Vpu. L'inhibition de la relâche par CD4 étant la résultante d'une disruption de la structure oligomérique de Vpu par CD4 localisée à la surface cellulaire (Bour et al., 1999).

Augmentation de la relâche virale

En plus de son rôle dans la dégradation du récepteur CD4, la molécule Vpu peut aussi stimuler la relâche virale à partir des cellules infectées. Une conséquence bien connue de cette fonction de Vpu est la réduction des effets cytopathiques du virus, due à une réduction du taux de formation de syncytia (Terwilliger et al., 1989; Klimkait et al., 1990). Bien que le domaine transmembranaire de Vpu soit considéré comme étant le déterminant principal de l'augmentation de la relâche virale, les bases moléculaires pour cette activité restent controversées. L'augmentation de la relâche virale par Vpu a été reliée à sa multimérisation et à la capacité de former des canaux ioniques. Les premières idées sont basées sur des analogies avec la protéine M2 du virus de l'influenza présentant une topologie transmembranaire similaire. La protéine M2 du virus de l'influenza est le modèle de canal

ionique d'origine virale le mieux étudié (Pinto et al., 1992; Wang et al., 1994). Les études préliminaires indiquant la formation de canaux ioniques par Vpu ont été faites *in vitro* par incorporation de la protéine purifiée dans des bicouches lipidiques et *in vivo* par expression chez *E. Coli*. Vpu fut ainsi démontré comme étant capable de former des canaux sélectifs pour cations dans les bicouches lipidiques et dans la membrane plasmique d'*E. Coli* (Ewart et al., 1996). Des expériences parallèles d'expression de Vpu dans des oocytes de *Xenopus* ont permis d'obtenir des données additionnelles (Coady et al., 1998). D'autre part, l'utilisation d'une protéine Vpu contenant des altérations dans la séquence correspondant à la région transmembranaire élimine sa capacité d'augmentation de la conduction et un peptide correspondant à cette région a montré une activité de canal ionique (Schubert et al., 1996). D'ailleurs, des études de simulation structurale ont été utilisées pour déterminer les configurations les plus probables adoptées par les hélices transmembranaires (Fisher et al., 2000). Un modèle suggéré pour la formation du canal ionique est l'adoption de conformations en hélices α par le segment transmembranaire qui seront groupées par la suite en hélices parallèles autour d'un pore central (Grice et al. 1997). L'association de la capacité de Vpu à former des canaux ioniques avec sa fonction d'augmentation de la relâche virale reste toujours à confirmer. Il est possible que Vpu ou l'interaction de Vpu avec d'autres facteurs cellulaires associés à la membrane exercent cet effet d'une façon indirecte en altérant le milieu intracellulaire près de la membrane du RE ou de la voie d'excrétion (Schubert et al., 1996). D'autre part, Vpu pourrait augmenter ou cibler l'assemblage des composantes de la structure virale dans des microdomaines de la membrane cellulaire où le processus d'assemblage est optimisé. De récentes évidences indiquent que des microdomaines membranaires résistants aux détergents, nommés radeaux lipidiques, pourraient agir comme des points de convergence pour l'enveloppe et Gag (Pickl et al., 2001)

L'action de Vpu semble être relativement non-spécifique puisque Vpu est aussi capable de promouvoir la relâche d'autres rétrovirus que le VIH (Maldarelli, et al., 1993; Göttlinger et al., 1993). L'augmentation de la relâche est un mécanisme qui ne requiert ni la présence d'Env ni celle

de CD4. Par contre, cet effet est bloqué lorsque Vpu est retenu au RE. Ces résultats suggèrent que les deux fonctions biologiques de Vpu, induction de la dégradation de CD4 et augmentation de la relâche, sont indépendantes et ont lieu dans des compartiments différents de la cellule (Yao et al., 1992; Schubert et Strebel 1994). D'autre part, il a été démontré que la fonction de relâche est dépendante de la lignée cellulaire utilisée (Sakai et al., 1995) et du statut de prolifération cellulaire. En fait il a été suggéré qu'une relâche virale efficace dans des cellules en arrêt de croissance cellulaire requièrent la présence de Vpu tandis que dans des cellules en prolifération active cette fonction de Vpu n'est pas observée (Deora et Ratner, 2001). Finalement, des analyses structurales et fonctionnelles du domaine transmembranaire de Vpu ont démontré que cette région contient des séquences responsables de l'augmentation de la relâche virale (Tiganos et al., 1998).

2.6.4 Les glycoprotéines d'enveloppe

Le premier contact du VIH avec la cellule hôte se fait via sa glycoprotéine de surface appelée gp120. Cette molécule fait partie, avec la gp41, du complexe des glycoprotéines d'enveloppe virale qui initie l'étape clé du cycle de réplication qu'est l'interaction virus-cellule.

Les glycoprotéines gp120 et gp41 sont synthétisées sur des ribosomes associés au RE, comme un précurseur glycosylé cotraductionnellement, la gp160. Une fois synthétisées, les molécules du précurseur sont repliées et assemblées en structures oligomériques, condition requise pour une exportation efficace à partir du RE (Hunter et Swanstrom, 1990). La structure adoptée de manière physiologique est un trimère. Dans le Golgi, le précurseur est clivé en gp120 et gp41 par la furine, une protéinase cellulaire (Stein et Engleman, 1990). Ce clivage se fait au niveau de la séquence hautement conservée RXXR (Einfeld, 1996). La réaction de clivage est importante parce qu'elle libère le peptide fusogénique en position N-terminale de la gp41. Il est aussi probable que le clivage soit accompagné de changements conformationnels, suggéré par le fait que la gp160 non clivée est incorporée de façon peu efficace aux virions (Dubay et al., 1995). Après

le clivage, la gp120 et la gp41 restent associées de façon non covalente. L'analyse de glycoprotéines mutantes a permis de conclure que des résidus localisés dans les régions C-terminale et N-terminale de la gp120 (régions conservées C1 et C5) pourraient jouer un rôle dans cette association (Helseth et al., 1991; Kwong et al., 1998). Dans la gp41, une région en position C-terminale du peptide fusogénique (résidus 528-562) serait aussi importante (Cao et al., 1993). Le transport des glycoprotéines vers la membrane plasmique utilise les voies classiques du transport vésiculaire, utilisées par les protéines membranaires et sécrétées de la cellule.

2.6.4.1 Glycoprotéine d'enveloppe gp120

La gp120 ou glycoprotéine de surface (SU) est une protéine hautement glycosylée qui contient cinq régions hypervariables identifiées comme régions V1 à V5 (Leonard et al., 1990; Starcich et al., 1986). Les régions V1 à V4 ont une structure en boucle exposées vers la périphérie avec des ponts disulfure à la base. Cette orientation, avec une surface externe hautement variable, pourrait jouer un rôle dans l'évasion du système immunitaire par le virus (Leonard et al., 1990; Profy et al., 1990). Les régions localisées entre les régions variables sont plus conservées et ont été appelées régions constantes (C1 à C5) (figure 1-6) (Starcich et al., 1986).

L'immunisation avec la polyprotéine Env purifiée a généré des anticorps neutralisants qui se lient à la région hypervariable V3, une boucle de 33 à 35 acides aminés fermée par une liaison disulfure très conservée. Cette région est appelée la boucle V3 et représente le déterminant principal de neutralisation pour le VIH-1 (Javaherian et al., 1989) D'autres essais avec des oligomères d'Env ont généré une grande proportion d'anticorps contre des épitopes conformationnels de la gp120 et la gp41 dont plusieurs peuvent être absents de la forme monomérique. Seulement une petite proportion a reconnu la boucle V3 et aucun anticorps n'a été obtenu contre des épitopes linéaires de la région C-terminale de la gp120. Ces résultats suggèrent donc que certaines régions de la protéine peuvent être partiellement masquées dans la structure oligomérique (Earl et al., 1994). La gp120 est responsable de la

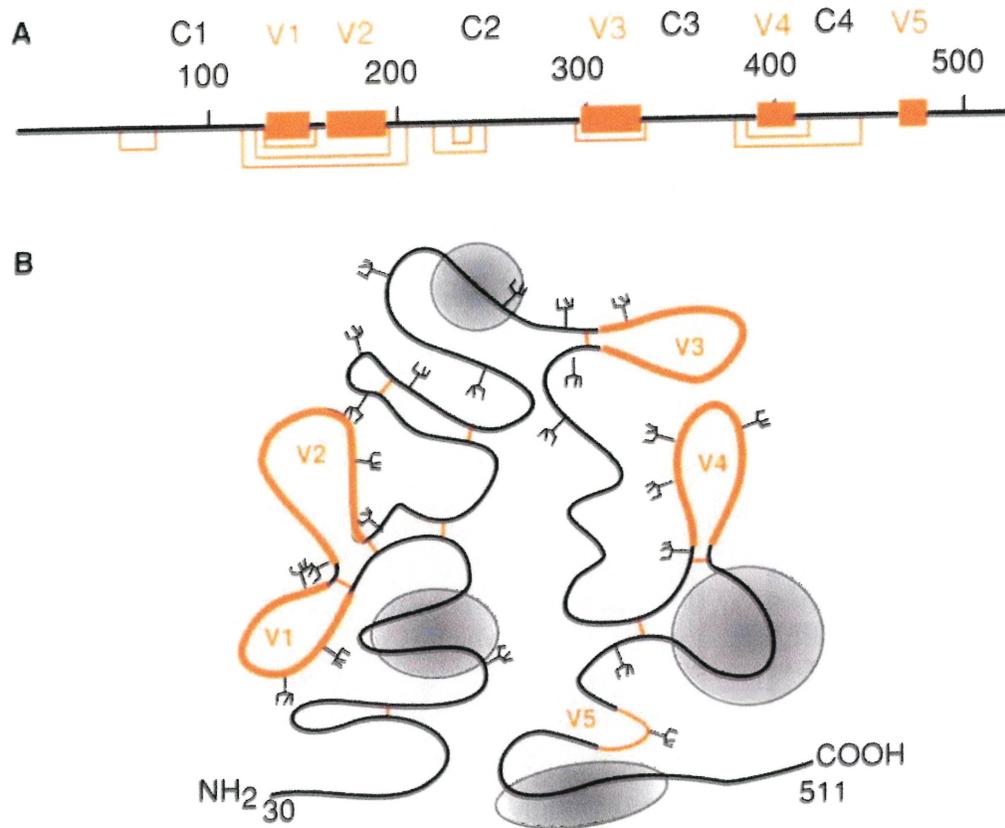


Fig. 1-6. Représentation schématique de la protéine gp120. (A) Les régions variables et constantes sont représentées comme V et C respectivement. Les lignes colorées représentent des ponts disulfure, (B) Les ponts disulfure (en couleur), les sites de glycosilation (structures en branches) et des régions interagissant avec CD4 (en gris) sont montrés. (Figure tirée de Coffin et al., 1997)

variation du tropisme cellulaire observée chez différents isolats de VIH. La région impliquée dans la détermination du tropisme cellulaire inclut des séquences qui codent pour la boucle V3 (Cann et al., 1992). Après l'interaction avec le récepteur CD4, la gp120 présente un changement conformationnel qui expose le site de liaison avec le récepteur des chémokines, favorisant l'interaction avec le corécepteur. La liaison au corécepteur, entraînerait des changements conformationnels additionnels dans la gp120 et la gp41, permettant l'exposition du peptide fusogénique et l'initiation de la fusion des membranes virale et cellulaire (voir figure 1-8) (Sattentau et Moore, 1991; Thali et al., 1993).

Au niveau du RE, l'interaction de la gp120 avec CD4, permet la rétention de CD4 dans ce compartiment. La rétention facilite la dégradation de CD4 par la protéine accessoire Vpu (Cohen et al., 1996). Cette collaboration de type fonctionnelle entre Env et Vpu, pourrait expliquer la co-localisation particulière des gènes codant pour ces deux protéines au sein d'un même ARNm.

2.6.4.2 Glycoprotéine d'enveloppe gp41

La gp41 ou protéine transmembranaire (TM) est composée d'un ectodomaine N-terminal, un domaine transmembranaire et d'un segment intraviral C-terminal qui interagit avec la matrice virale. L'ectodomaine, associé à la fusion membranaire, est un trimère symétrique, chaque monomère consistant en deux hélices α antiparallèles reliées par une boucle riche en prolines. Les hélices N-terminales sont recourbées vers la membrane virale en formant un « noyau » de trois hélices surenroulées de façon parallèle, autour desquelles sont arrangées de façon antiparallèle les hélices C-terminales. La structure finale de l'ectodomaine se présente comme une tige avec ses extrémités N et C-terminales à un bout (et, évidemment, le peptide fusogénique, due à sa localisation à la extrémité N-terminale) et la boucle à l'autre bout (figure 1-7) (Chan et al., 1997; Weissenhorn et al., 1997). Des ressemblances entre les séquences d'acides aminés de la gp41 du VIH et de la glycoprotéine HA de l'influenza, ainsi que des études biochimiques et structurales, donnent à penser que les changements conformationnels qui

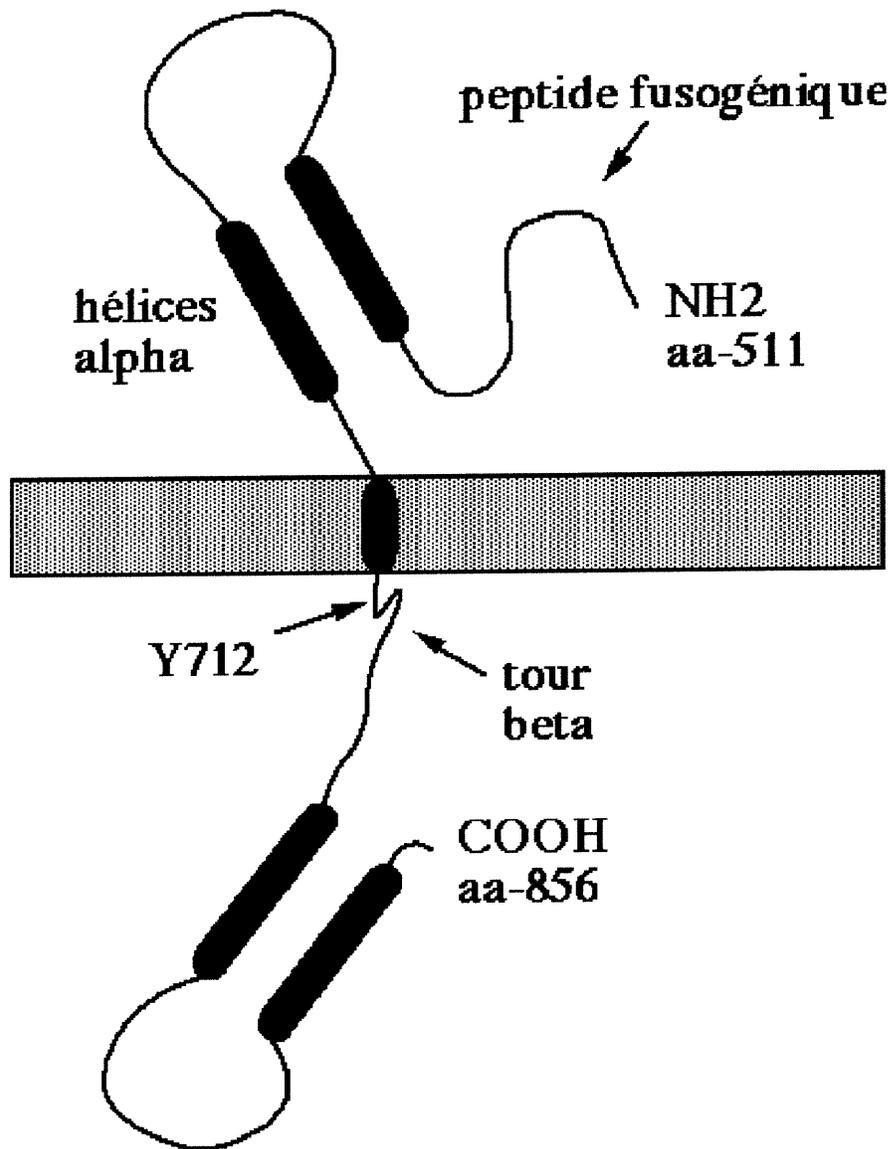


Fig. 1-7. Représentation schématique de la glycoprotéine gp41.

précèdent à la fusion intermembranaire, sont équivalents chez les deux protéines (Chan et al., 1997; Weissenhorn et al., 1997). Les particules du virus de l'influenza sont introduites dans la cellule par endocytose, une diminution du pH permettant les changements conformationnels de la protéine d'enveloppe qui initie la fusion des membranes virale et endosomale (Carr et Kim, 1993). Cependant, le VIH diffère du virus de l'influenza en ce sens que les changements conformationnels de la glycoprotéine d'enveloppe sont déclenchés par les deux récepteurs, CD4 et le récepteur de chémokines, liés à la gp120. Suite à ces changements de la gp120 et la gp41, le virus fusionne directement avec la membrane cellulaire indépendamment du pH (Sattentau et Moore, 1991; Weissenhorn et al., 1997).

La région de la protéine qui traverse la membrane comprend les acides aminés 684 à 705. Cette région, avec le domaine amino-terminal, constitue les deux domaines hydrophobes de la gp41. Des essais de substitutions faits avec les résidus 687 à 689 et 697 à 699 ont suggéré que ces acides aminés sont des composantes importantes de la séquence d'arrêt de transfert qui ancre le précurseur gp160 à la membrane. D'autre part, des mutants de substitutions des résidus basiques Lys683 et Arg696 ont affecté la fonction de fusion membranaire de la protéine et la capacité infectieuse du virus, suggérant des fonctions additionnelles à sa fonction d'ancrage (Gabuzda et al., 1991; Helseth et al., 1990).

La protéine transmembranaire des lentivirus possède un domaine cytoplasmique inhabituellement long comparé aux autres rétrovirus (Hunter et Swanstrom, 1990). Des essais d'introduction de codons de terminaison prématurés dans ce domaine ont montré qu'il n'est pas essentiel pour la fusion intermembranaire (Gabuzda et al., 1992b). Par contre, son implication dans l'incorporation de la glycoprotéine à la particule virale a été démontrée. Cette incorporation de la glycoprotéine d'enveloppe serait réalisée via une interaction avec le domaine p17 (matrice) de Gag (Dorfman et al., 1994b; Cosson, 1996). Des substitutions ou délétions qui perturbent la structure du domaine cytoplasmique de la gp41, interfèrent avec l'interaction de ce domaine avec la matrice et empêchent l'incorporation d'Env au virion (Dubay et al., 1992). Au

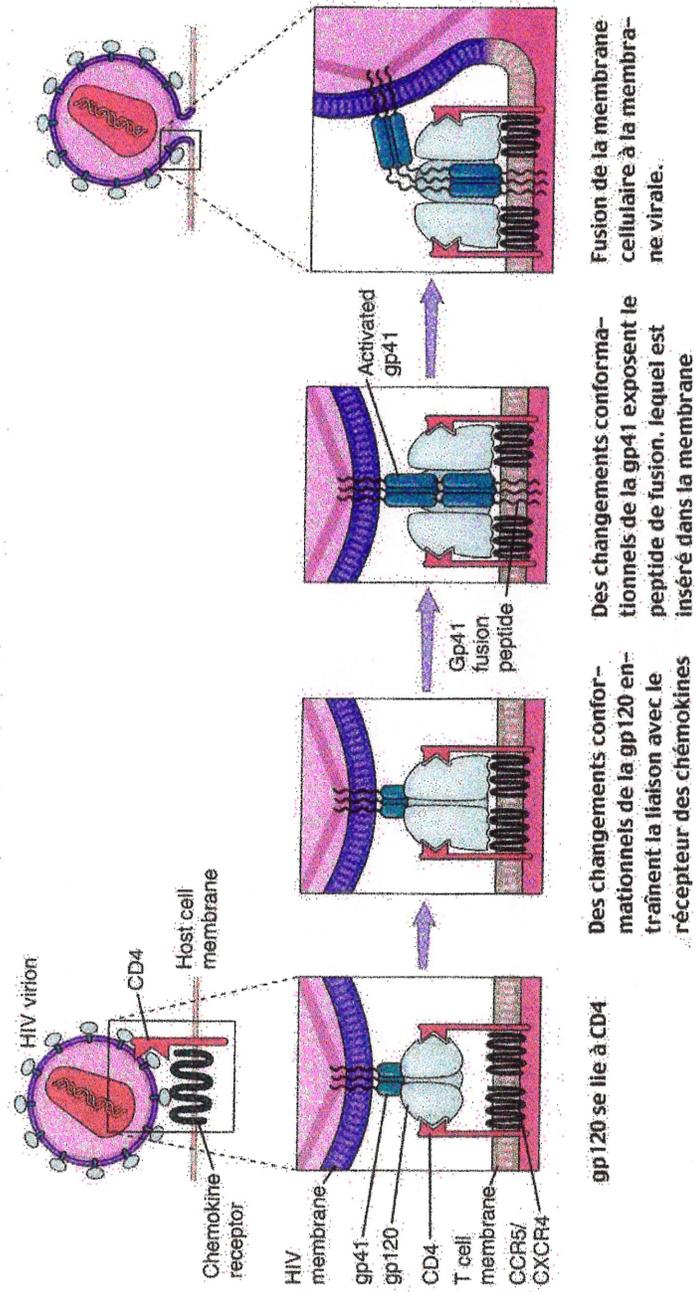


Fig. 1-8. Mécanisme hypothétique de l'entrée du VIH dans la cellule.
 (Figure tirée d'Abbas et al., 2000).

contraire, des mutants présentant des délétions quasi complètes de la région cytoplasmique, sont incorporés de façon probablement non spécifique et, contrairement à la protéine sauvage, peuvent aussi être incorporés par d'autres rétrovirus (Hunter, 1994; Freed et al., 1995). Contrastant avec les limitations d'incorporation de la gp41, la spécificité d'hôte du VIH peut être élargie expérimentalement, par pseudotypage avec les glycoprotéines d'enveloppe de plusieurs virus tels que le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), le virus de la leucémie humaine T tropique (HTLV) et le virus de la leucémie murine (VLM) (Akkona et al., 1996; Lodge et al., 1997a). Deux fonctions bien établies de la région cytoplasmique de la gp41 sont le ciblage et l'endocytose de la glycoprotéine d'enveloppe

Ciblage de la glycoprotéine d'enveloppe

La glycoprotéine d'enveloppe présente un ciblage vers la surface basolatérale, dans les cellules épithéliales polarisées et vers un pôle distinct des lymphocytes infectés (Lodge et al., 1994; Deschambeault et al., 1999). Un motif à base de tyrosine YXXØ (où Ø est un acide aminé hydrophobe), responsable de cette polarisation de la glycoprotéine, qui entraîne aussi la sortie du virus aux mêmes surfaces membranaires, est localisé dans une région proximale à la membrane (Lodge et al. 1997b). Le ciblage basolatéral de la glycoprotéine d'enveloppe serait dû à l'interaction des motifs basés sur des tyrosine avec le complexe d'adaptines AP1 associé avec le trans-Golgi décrit en détail dans une autre section. Le bourgeonnement viral polarisé pourrait avoir des implications dans la pathogénèse virale. Un exemple significatif soulignant l'importance de la polarisation en pathogénèse virale est retrouvé chez le virus de Sendai. Un mutant de ce virus ayant perdu le ciblage apical se retrouve partiellement relâché du côté basolatéral et donne lieu à une infection systémique plutôt que respiratoire (Tashiro et al., 1992). Dans le cas spécifique du VIH, un bourgeonnement basolatéral favoriserait la transmission du virus vers les cellules lymphoïdes localisées sous les cellules de la muqueuse urogénitale (Tan et al., 1993). D'ailleurs, des résultats obtenus dans le modèle SIV montrent une diminution de la charge virale et une réduction importante de l'apparition de la maladie chez les macaques infectés

expérimentalement avec un virus dont la tyrosine dans la région cytoplasmique de la glycoprotéine avait été mutée. Une sélection pour le rétablissement du motif a été aussi observée suite à la substitution. Il reste toutefois à déterminer si ces résultats obtenus sont reliés à la fonction de ciblage ou à la fonction d'endocytose du signal (Fultz et al., 2001).

Endocytose de la glycoprotéine d'enveloppe

Le motif à base de tyrosine du domaine cytoplasmique de la gp41 a également été trouvé responsable de l'endocytose de la glycoprotéine d'enveloppe à la surface cellulaire (LaBranche et al., 1995; Sauter et al., 1996). À différence du ciblage basolatéral qui utilise le complexe d'adaptines AP1, le mécanisme d'endocytose serait accompli par interaction du motif YXXØ avec le complexe AP2 associé avec la membrane plasmique. L'importance pour le virus de conserver ce signal d'endocytose pourrait être de réduire la reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire en réduisant la quantité de protéines virales exposées à la surface cellulaire (Marsh et Pelchen-Matthews, 2000). En présence du précurseur Pr55gag, le taux d'internalisation d'Env est particulièrement lent. Une interaction entre le domaine p17 du précurseur Gag et Env, durant le processus d'assemblage viral, empêcherait l'interaction d'Env avec les adaptines permettant ainsi son incorporation au virion (Egan et al., 1996).

2.7 Importance biologique de la régulation négative de CD4

Le VIH a développé une capacité extraordinaire de réguler de façon négative l'expression de son récepteur, la molécule CD4, au niveau de la surface de la membrane cellulaire. Le fait que cette activité inclut la participation de trois protéines codées par le virus suggère qu'il s'agit d'une fonction plus fondamentale que la simple prévention d'une surinfection de la cellule. En plus de la protéine d'enveloppe, le virus utilise les protéines accessoires Nef et Vpu pour la dégradation de CD4. Cette dégradation s'accomplit via deux mécanismes différents: dans les

premières étapes du cycle viral, la protéine Nef réalise une rapide internalisation de CD4 à partir de la membrane plasmique, suivie de sa dégradation au lysosome (Mariani et Skowronski, 1993). Tel que mentionné dans la section précédente, dans la phase tardive du cycle viral le précurseur de l'enveloppe, la glycoprotéine gp160, et la protéine Vpu agissent de façon coordonnée et vont contribuer à la régulation négative de CD4. La rétention de CD4 dans le RE par la gp160 permet son ciblage par Vpu vers la machinerie de dégradation ubiquitine-protéasome (Margottin et al., 1998; Willey et al., 1992). Les conséquences biologiques de la régulation négative de CD4 dans la réplication et la pathogénese virale pourraient être résumées comme suit: a) La diminution de la quantité de CD4 exprimé à la surface cellulaire et incorporé dans la particule virale peut entraîner une augmentation de l'infectivité due à une efficace incorporation d'Env dans la particule virale (Lama et al., 1999). b) L'induction de la dégradation de CD4 par Vpu dans le RE non seulement empêche que des molécules du récepteur viral neo-synthétisées atteignent la surface cellulaire mais permet également la libération de la gp160 du RE en route vers le processus de clivage et maturation suivi d'une incorporation dans le virion (Cohen et al., 1996). c) L'expression de CD4 à la surface cellulaire a été associée à une inhibition de la relâche des particules virales. Néanmoins cet effet de CD4 a été expliqué par deux mécanismes différents. Un premier mécanisme serait la rétention des virions à la surface cellulaire due à une interaction entre le récepteur CD4 et la glycoprotéine d'enveloppe des virions naissants (Ross et al., 1999). La deuxième propose que CD4, en vertu de son affinité pour Vpu, peut s'insérer lui même dans les oligomères formés par Vpu provoquant une dissociation de leur structure ou une disruption de leur activité de canal ionique (Bour et al., 1999). La régulation négative de CD4 de la surface cellulaire par Env, Nef et Vpu augmenterait la relâche virale en contrecarrant l'effet de CD4 (Bour et al., 1999; Ross et al., 1999). d) Finalement, l'élimination du récepteur CD4 de la surface cellulaire permet d'éviter une surinfection de la cellule par le phénomène bien connu d'interférence homologue.

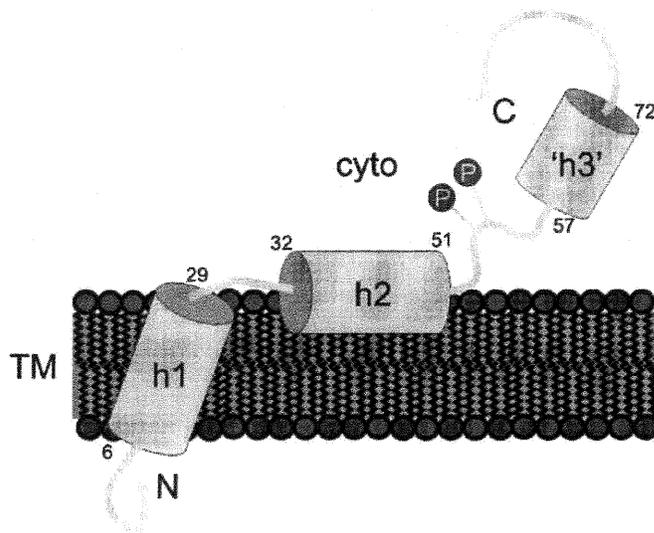


Fig. 1-9. Schéma de la protéine accessoire Vpu. Les hélices alpha (h) et les sites de phosphorylation (P) sont montrés. (Figure tirée de Henklein et al., 2000)

2.8 Assemblage et relâche virale

L'assemblage viral comprend une série d'étapes qui précèdent la relâche des nouveaux virions. Les deux principales composantes de la structure virale, la polyprotéine Gag et les glycoprotéines d'enveloppe arrivent à la membrane cellulaire par des voies différentes. Cependant, Gag est capable par elle-même de s'assembler en absence des protéines d'enveloppe (Pavlakakis, 1997). Le ciblage de la protéine Gag vers la membrane plasmique se fait, entre autres, en utilisant un groupe myristilé localisé à l'extrémité N-terminale du domaine de la matrice (Zhou, et al., 1994). L'incorporation de l'enveloppe dans les virions en formation se fait par interaction de la queue intracytoplasmique de la gp41 avec la région de la matrice au sein de Gag (Mammano et al., 1995). Le fait que les déterminants moléculaires gouvernant la sortie virale polarisée se retrouvent dans l'enveloppe, l'interaction de Gag avec Env est donc essentielle pour la polarisation de l'assemblage et de la relâche virale (Owens et al., 1991; Lodge et al., 1994). L'importance d'une interaction spécifique entre Env et Gag pour la polarisation de l'assemblage et la relâche a été examinée en utilisant des virus avec des mutations dans la matrice qui empêchent l'incorporation de l'enveloppe dans le virion. Tous les virus mutants testés ont montré une incapacité de sortir de façon polarisée au sein de cellules MDCK, démontrant une corrélation entre la capacité de la matrice à interagir avec Env et la relâche virale polarisée (Lodge et al., 1994). Bien que la voie de transport utilisée par Env soit bien connue, celle utilisée par Gag l'est beaucoup moins de même que le site où l'interaction Env-Gag a lieu. Il a été proposé que la polyprotéine Gag, une fois synthétisée, puisse être transportée vers la membrane plasmique grâce à des interactions avec des éléments du cytosquelette (Edbauer et Naso, 1984). D'autres groupes ont suggéré que Gag s'associe à la surface externe de l'appareil de Golgi et atteint la membrane plasmique via le transport vésiculaire (Jones et al., 1990). D'autres données récentes suggèrent que les microdomaines membranaires résistants aux détergents connus sous le nom de radeaux lipidiques (« lipid rafts ») pourraient fonctionner comme des points de convergence pour la protéine d'enveloppe et la protéine Gag (Pickl et al., 2001). L'initiation de la formation de la particule virale se fait par

une multimérisation de Gag (Pavlakakis, 1997); des molécules du précurseur Pr160Gag-Pol sont incorporées simultanément. L'ARN génomique est aussi encapsidé ainsi que l'amorce d'ARNt^{Lys3} (Aldovani et Young, 1990; De Rocquigny et al., 1992). Les protéines Vpr, Vif et, possiblement, Nef, sont également encapsidées (Paxton et al., 1993; Camaur et Trono, 1996; Pandori et al., 1996). L'intégration du précurseur Gag-Pol permet la libération et l'activation de l'enzyme protéase. Ce dernier événement est suivi du clivage des précurseurs Pr55Gag et Pr160Gag-Pol, pour que les virions relâchés deviennent matures et infectieux (Peng et al., 1989). En plus du rôle accompli par le domaine de la matrice dans le processus de formation des nouveaux virions, une implication des protéines accessoires Vif et Vpu dans les processus d'assemblage, relâche et maturation semble nécessaire. Des virions produits en absence de Vif ont présenté une altération dans leur morphologie et dans les quantités de Gag et Pol incorporées, suggérant une fonction essentielle lors de l'assemblage et/ou la maturation virale (Hoglund et al., 1994). Des virions défectifs pour Vif, avec des quantités normales d'ARN viral, ne sont pas capables d'accomplir la synthèse d'ADN proviral, conséquence d'une possible encapsidation anormale de la nucléoprotéine (Sova et Volsky, 1993). L'absence de Vpu résulte en une diminution importante de la relâche virale et en une accumulation de protéines virales associées à la cellule infectée. De plus, des observations en microscopie électronique et des analyses biochimiques ont indiqué qu'une grande proportion des virus mutants était attachée à la surface cellulaire et que les virus relâchés présentaient une variation significative de taille et de structure. Les deux observations démontrent une fonction de Vpu associée à l'assemblage, la relâche et la maturation virale (Strebel et al., 1989; Klimkait et al., 1990).

Enfin, des récentes observations ont associé la relâche virale avec un processus d'ubiquitination de la protéine Gag. Le domaine appelé L (late domain), essentiel pour l'étape de séparation virus-cellule et localisé chez le VIH dans p6, serait la région ciblée par cette ubiquitination. Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer l'importance de l'ubiquitination de Gag: premièrement, l'état ubiquitiné est requis pour accomplir une fonction optimale dans la maturation et

relâche virales. Deuxièmement, le domaine L de Gag possède la fonction de recruter l'ubiquitine au site d'assemblage viral où elle va agir sur des facteurs cellulaires qui contribuent à la maturation virale (Schubert et al. 2000). D'ailleurs, l'ubiquitination du domaine L de Gag dans le mécanisme de relâche virale n'est pas exclusif au VIH. Une ubiquitination de Gag associée à l'augmentation de la relâche virale a été rapportée pour le virus du sarcome de Rous, un oncovirus (Patnaik et al., 2000). Enfin, le domaine L de ce dernier virus et un peptide du virus Ebola associé à cet activité ont été capables d'induire une ubiquitination importante de pseudoparticules de VIH et une augmentation de la relâche de ces chimères (Strack et al., 2000).

3. CELLULES POLARISÉES

La plupart des cellules animales et végétales s'associent en structures multicellulaires pour former des tissus stables. Chez les animaux, la membrane plasmique des cellules est souvent organisée en deux zones distinctes, chacune remplissant une tâche particulière, pour que les diverses formes d'assemblage multicellulaires puissent exercer leur fonction. Ces cellules sont qualifiées de « polarisées ». La caractéristique la plus importante des cellules polarisées est alors la composition protéique et lipidique différente de zones distinctes de la membrane plasmique, et les différentes fonctions que ces zones membranaires peuvent exercer (Simons et Fuller, 1985). Voici quelques exemples représentatifs de ce phénomène de spécialisation membranaire.

3.1 Cellules épithéliales

À quelques exceptions près, toutes les frontières internes et externes de l'organisme sont bordées d'une couche polarisée de cellules appelées épithéliales (epi: sur; thélê: mamelon). Dans ce type cellulaire, la membrane plasmique est différenciée en deux domaines: une région apicale tournée vers la lumière de l'organe et qui donne accès à l'extérieur de l'organisme, et une région baso-latérale tournée vers le

réseau capillaire du milieu intérieur (Compans et Srinivas, 1991). Les cellules épithéliales ont un rôle important à accomplir dans la sécrétion (par exemple dans le poumon), l'absorption et l'excrétion (dans l'intestin), ou la transformation de divers composés (dans le foie ou le rein), fonctions qui impliquent aussi un contrôle important des voies de transport et de distribution intracellulaire des protéines (Lodish et al., 1995a). Dans cette section, pour illustrer la structure et le fonctionnement des cellules épithéliales, nous prendrons comme exemple la cellule épithéliale bordant la lumière de l'intestin grêle.

3.1.1 Structure des cellules épithéliales

Les cellules de l'épithélium qui borde la lumière de l'intestin grêle ont deux fonctions majeures: absorber les petites molécules de nutriments libérés dans la lumière à partir du bol alimentaire et les transporter à travers l'unique couche de cellules qui les sépare du sang (Lodish et al., 1995a). Les fonctions de ces cellules dépendent de l'expression polarisée d'enzymes, systèmes de transport et récepteurs d'hormones vers les différents domaines de la membrane plasmique. La polarité des membranes est maintenue grâce à une insertion coordonnée des protéines nouvellement synthétisées par les voies sécrétoires et la modulation (ou redistribution) par endocytose des protéines exprimées à la surface. Le cytosquelette est un déterminant important de l'architecture générale de la cellule et son organisation est particulièrement élaborée à la membrane apicale. Cette région comporte une multitude de prolongements digitiformes appelées microvillosités. La villosité tient sa rigidité du faisceau de filaments d'actine qui en occupe l'axe (figure 1-10) (Louvard et al., 1992; Lodish et al., 1995a).

Une fois les nutriments absorbés par la face luminale des cellules épithéliales de l'intestin, ils traversent la cellule, puis sont véhiculés au sang à travers la membrane basolatérale. Les transporteurs protéiques logés dans cette membrane sont donc distincts de ceux de la membrane apicale. La zone latérale de la membrane contient aussi des régions spécialisées dans l'adhérence intercellulaire, et la zone basale des protéines qui arriment la cellule à la lame basale (Lodish et al., 1995a).

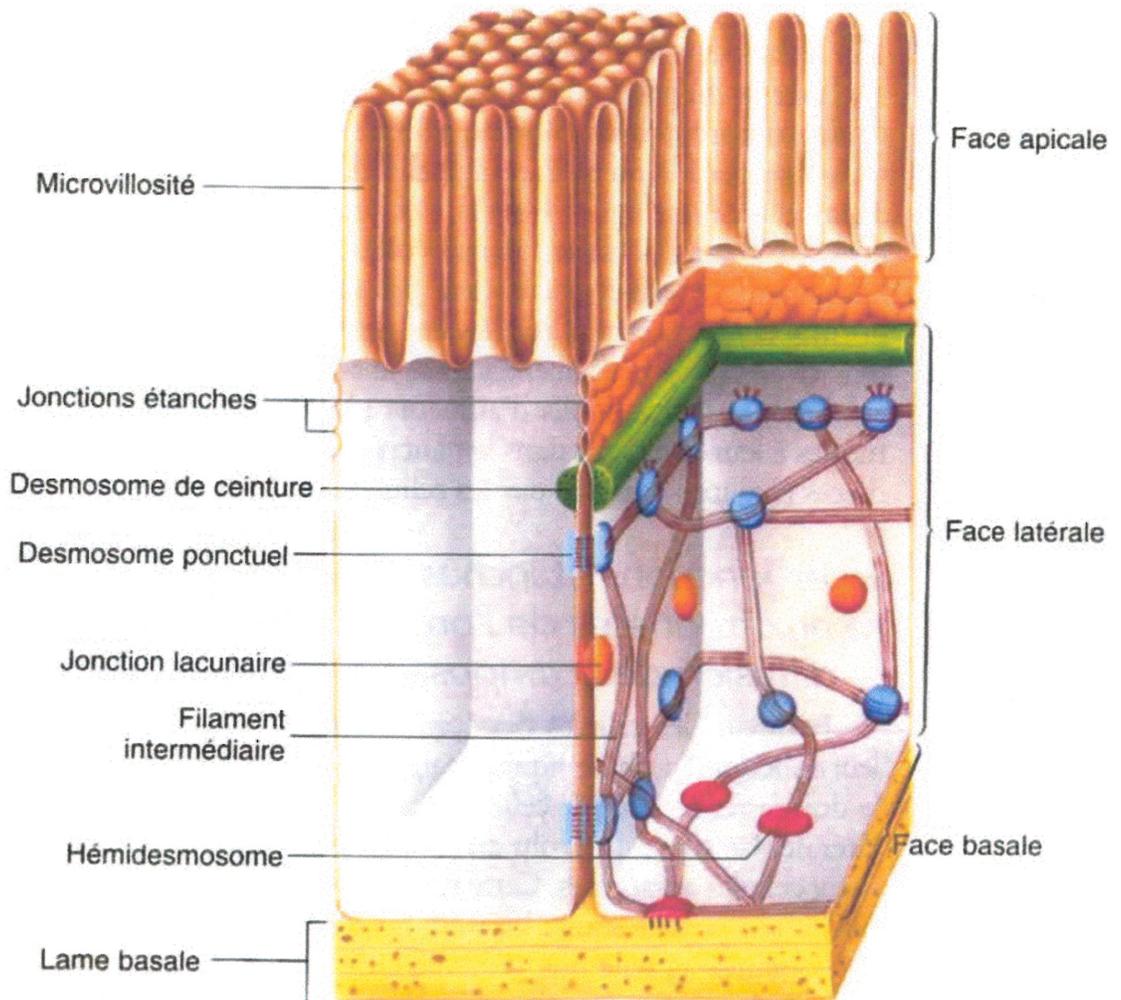


Fig. 1-10. Schéma des cellules épithéliales. (Figure tirée de Lodish et al., 1995a).

3.1.2 Les jonctions cellulaires

Une caractéristique commune à la structure des cellules épithéliales est la présence d'un complexe de jonction tripartite entre les cellules adjacentes. Les éléments composants ce complexe sont les jonctions étanches (zonulae occludentes), les jonctions intermédiaires (zonulae adherentes) et les desmosomes (maculae adherentes). Additionnellement, certaines cellules épithéliales contiennent aussi des jonctions de type "gap" ou jonctions intercellulaires et des hémidesmosomes. Les jonctions étanches se caractérisent par une fusion apparente entre les lamelles externes des membranes cellulaires adjacentes. L'espace intercellulaire disparaît pour donner l'impression d'une membrane continue qui sert de barrière perméable entre les domaines apical et basolatéral de la membrane plasmique et les espaces extracellulaires correspondants (Van Meer et al., 1986; Compans et Srinivas, 1991). Les jonctions intermédiaires sont situées au dessous des jonctions étanches et consistent en un espace intercellulaire occupé par un matériel homogène et apparemment amorphe. Cette région contient des molécules d'adhésion dépendantes du calcium et des filaments d'actine qui unissent les jonctions intermédiaires avec le réseau d'actine intracellulaire. La fonction principale des zonula adherens est la médiation de l'attachement cellule-cellule (Compans et Srinivas, 1991; Nathke et al., 1993). Les desmosomes sont retrouvés surtout au sein de tissus qui ont une propension à supporter des tensions mécaniques (épithélium de la peau, utérus, vessie, etc). Ils sont impliqués dans l'adhésion de domaines membranaires adjacents via des structures extracellulaires qui traversent les espaces entre membranes plasmiques parallèles (Compans et Srinivas, 1991). Les "gap" ou jonctions intercellulaires permettent l'échange entre cellules d'ions et petites molécules sans que ceux-ci accèdent à l'espace intercellulaire (Simons et Fuller, 1985). Finalement, les hémidesmosomes sont des sites d'ancrage de la membrane plasmique à la matrice extracellulaire (voir figure 1-10) (Simons et Fuller, 1985).

3.2 Cellules lymphocytaires

Les lymphocytes sont un autre exemple de cellules qui exhibent une forme de polarisation de leur surface membranaire (Del Pozo et al., 1995). La migration des leucocytes en réponse au gradient de concentration de chémokines contenues dans un support ou chimiotaxie s'effectue par redistribution des récepteurs de chémokines à un pôle de la cellule (Nieto et al., 1997). La formation de projections cytoplasmiques ou uropodes chez les lymphocytes activés par un antigène ou induits par des chémokines a aussi été bien illustrée (Wilkinson et Higgins, 1987; Del Pozo et al., 1995). D'autre part, une réorganisation du cytosquelette a été observée dans la région de contact entre les cellules NK et des cellules cibles sensibles. L'actine et la vinculine étant polarisées aux sites spécifiques de contact entre les deux types de cellules. Cette réorganisation du cytosquelette pourrait être une condition requise pour la polarisation de la machinerie sécrétoire cellulaire (Carpen et al., 1983).

Autres types de cellules polarisées

Les neurones

Les neurones sont les cellules à la base de tout système nerveux. Ils présentent l'organisation polarisée la plus impressionnante parmi les cellules du corps humain avec deux domaines membranaires distincts: le domaine axonal et le domaine somatodendritique. À la différence des cellules épithéliales, ces domaines ne sont pas séparés par des jonctions étanches (Rodriguez-Boulan et Powell, 1992). La plupart des neurones présentent quatre régions distinctes qui remplissent chacune une fonction particulière: le corps cellulaire, les dendrites, l'axone et les terminaisons axonales. Le corps cellulaire contient le noyau et la majeure partie des ribosomes, des lysosomes et du réticulum endoplasmique; c'est là que s'effectuent la synthèse de presque toutes les protéines et membranes du neurone (Lodish et al., 1995b). Les dendrites, comme le corps cellulaire, contiennent des ribosomes, réticulum endoplasmique rugueux et appareil de Golgi; certaines protéines y sont aussi synthétisées. La fonction des

dendrites consiste en la réception des signaux provenant d'axones d'autres cellules nerveuses (de Hoop et Dotti, 1993). Les axones, qui conduisent des signaux générés dans le corps cellulaire vers des cibles très distantes, sont, en règle générale, longs et dépourvus de branches. Les terminaisons axonales servent à transmettre des signaux d'une cellule nerveuse vers une dendrite ou vers le corps cellulaire d'un autre neurone. Les axones et leurs terminaisons, dépourvus de ribosomes, ne font pas de synthèse protéique. Les protéines et les membranes qui servent à renouveler les constituants de ces deux dernières régions sont produites dans le corps cellulaire et assemblées sur place en vésicules ou en particules multimériques. Celles-ci glissent le long de microtubules tout le long de l'axone, jusqu'à ses terminaisons (Lodish et al., 1995b, Rodriguez-Boulan et Powell, 1992).

Une caractéristique commune à toutes les cellules qui réalisent des fonctions vectorielles est la distribution asymétrique des molécules de la membrane plasmique et l'organisation polarisée des organelles cytoplasmiques et du cytosquelette (Rodriguez-Boulan et Nelson, 1989). Dans le cas des neurones, des protéines composantes du cytosquelette sont « polarisées ». Les protéines Tau et MAP-2 (microtubule-associated protein) sont spécifiques pour l'axone et les dendrites, respectivement (Sargent, 1991). Des essais d'immunofluorescence ont démontré que des isoformes de la spectrine et de l'ankyrine, protéines du cytosquelette du neurone aviaire, ont une distribution différente dans la cellule. L'alpha gamma spectrine et la beta ankyrine sont présentes dans tous les compartiment neuronaux, soit dans le corps cellulaire, les dendrites et l'axone, tandis que l'alpha beta spectrine et l'alpha ankirine sont localisées exclusivement dans le corps cellulaire et les dendrites, où elles sont activement isolées de l'alpha gamma spectrine et d'autres composants du transport axonal (Lazarides et Nelson, 1985).

3.4 Transport des protéines membranaires

Le transport des protéines vers les différents sites dans le cellule, en général et vers la membrane plasmique en particulier, implique leur passage à travers différents organelles cellulaires. Dans chacun de ces organelles la nouvelle protéine subit une série de "retouches" avant de devenir une protéine mature. Une variété de vésicules ciblées de façon spécifique vont accomplir le transport des protéines entre les différents compartiments.

Les protéines cytoplasmiques proviennent de la traduction des ARNm par les ribosomes libres non-associés au réticulum endoplasmique (RE) (Palade, 1975). Les protéines de membrane, comme les protéines sécrétées, sont traduites sur des ribosomes associés au RE (Blobel et Dobberstein 1975; Walter et al., 1984). Le premier organelle à franchir par les protéines destinées à la surface cellulaire est le réticulum endoplasmique rugueux (RER).

3.4.1 Translocation à travers le réticulum endoplasmique.

La majorité des protéines de membranes et des protéines sécrétées sont insérées dans le RE du à la présence d'un peptide signal qui cible le polypeptide en formation à travers la voie sécrétoire de la cellule (Einfeld et Hunter, 1991; Pfeffer, 1991). Ce peptide signal se présente souvent, mais pas exclusivement, comme une extension transitoire de la portion N-terminale de la protéine, extension qui est clivée par une signal peptidase une fois que sa fonction de ciblage est accomplie (Einfeld et Hunter, 1991; Johnson, 1997).

La machinerie cellulaire qui reconnaît le peptide signal et dirige le polypeptide vers le RE comprend au moins deux composantes: une protéine dite "de reconnaissance" (SRP, "signal recognition protein"), localisée dans le cytoplasme, et son récepteur localisé à la membrane du RE. Le SRP est un complexe de six polypeptides et un ARN de 300 nucléotides qui lie le peptide signal quand ce dernier est exposé sur le ribosome pendant la traduction. Cette liaison arrête temporairement

**ESPACE EXTRACYTOPLASMIQUE
(Lumière du RE ou milieu extracellulaire)**

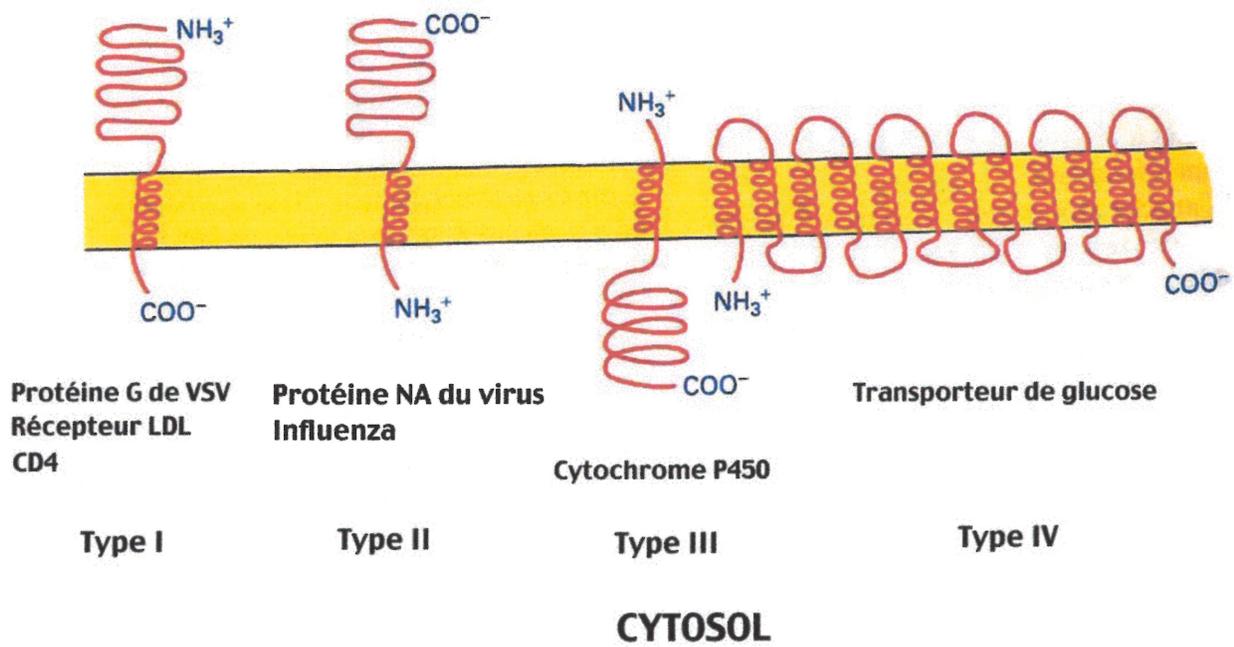


Fig. 1-11. Topologie des protéines membranaires. (Figure tirée de Lodish et al., 1995c).

l'élongation du polypeptide et cible celui-ci vers le RE. Le complexe polypeptide-SRP reconnaît par la suite le récepteur du SRP, associé au RE. La liaison du SRP par son récepteur entraîne la libération du peptide signal, reprise de la traduction et translocation du polypeptide à travers la membrane du RE (Walter et al., 1984; Siegel et Walter, 1988).

Une caractéristique très importante qui distingue les protéines de membrane de celles qui sont sécrétées est la présence d'un domaine transmembranaire composé d'acides aminés hydrophobes qui ancre la protéine dans la bicouche phospholipidique. Ce domaine n'est apparemment pas requis pour que les protéines puissent être transportées correctement car sa délétion entraîne la conversion de la protéine en une protéine sécrétée (Hunter, 1988).

Les protéines membranaires intégrales ne sont pas insérées dans la membrane au hasard mais possèdent des séquences dites topogènes qui orientent le sens de l'insertion. Ce processus survient lors du passage des protéines à travers le RE et la disposition atteinte est définitive, c'est à dire, qu'elle est la même qu'au niveau de la membrane cytoplasmique. Les séquences topogènes responsables de l'orientation des protéines intégrales sont le peptide signal décrit précédemment et la séquence d'arrêt de transfert destinée à l'ancrage. Il existe donc une variété de protéines membranaires dépendant de leur topologie et des séquences topogènes qui interviennent. Les protéines du type I traversent la bicouche lipidique une seule fois et ont leur extrémité N terminale orientée vers le milieu extracellulaire (ou vers le lumen du RE) et leur extrémité C terminale vers le cytoplasme. Ces protéines ont le peptide signal en position N-terminale et celui-ci est excisé après ancrage à la membrane. Une fois que l'élongation se poursuit, la translocation vers le RE est arrêtée par la séquence d'arrêt de transfert localisée vers l'extrémité C terminale du polypeptide. Cette séquence reste ancrée de façon définitive dans la membrane. Les protéines de type II traversent la membrane dans le sens inverse; le segment N terminal est situé du côté cytoplasmique et le segment C terminal, du côté extracytoplasmique. Le peptide signal est localisé près de l'extrémité N terminale. Une fois qu'il est inséré dans la membrane il y reste exerçant la fonction d'ancrage de

la protéine à la membrane de façon telle que seule la portion C-terminale est transloquée. Les protéines de type I qui possèdent une portion cytoplasmique (extrémité C-terminale) spécialement longue sont classifiées comme protéines de type III. Ces protéines, comme celles de type II, ont la séquence signal à l'intérieur de la chaîne polypeptidique mais leur extrémité C-terminale n'est pas transloquée vers le lumen du RE. À la différence de ces protéines, dites bitopiques, qui traversent la membrane une seule fois, existent des protéines qui le font plusieurs fois (et qui possèdent évidemment, plus d'un domaine transmembranaire) et qui sont appelées polytopiques. Ces protéines constituent à elles seules le groupe IV (voir figure 1-11) (Garoff, 1985; Einfeld et Hunter, 1991; High et Dobberstein, 1992).

3.4.2 Modifications post-traductionnelles des protéines de membrane

Une fois la synthèse protéique réalisée, les étapes subséquentes de maturation de la protéine se réalisent soit dans le RE ou dans d'autres compartiments cellulaires. Toutes les modifications qui s'effectuent dans le RE, catalysées par des enzymes résidentes du RE, sont importantes pour que la protéine puisse atteindre sa destination correcte dans la cellule.

Parmi les modifications qui contribuent à la maturation d'une protéine citons la formation de ponts disulfures importants pour la stabilisation de la structure tertiaire de la protéine (Freedman, 1989). Les protéines de la membrane plasmique sont aussi modifiées par l'attachement des acides gras, comme l'acide palmitique, par un thioester lié à des résidus de cystéine (Schultz, 1988). L'assemblage en protéines multimériques et des modifications protéolytiques sont aussi possibles au niveau du RE (Hurtley et Helenius, 1989; Ehlers et Riordan, 1991). Il y a des modifications qui s'initient au niveau du RE mais qui s'achèvent dans les vésicules du Golgi; c'est le cas principalement de l'addition et du remaniement des chaînes d'oligosaccharides (Kornfeld et Kornfeld, 1985).

Une importante modification post-traductionnelle au niveau du RE est l'ajout du groupe glycosylphosphatidylinositol (GPI). La liaison du glycolipide se fait à l'extrémité C terminale d'une protéine de type I après élimination d'un segment C terminal de 10-20 résidus hydrophobiques (Caras, 1991; Englund, 1993).

Durant son passage par le RE les protéines sont aussi soumises à des modifications qui leur donnent leur conformation finale. Des protéines dites chaperonnes possèdent la fonction de réguler le repliement des nouvelles protéines transloquées dans le lumen du RE. BiP, une protéine résidente du RE est une des protéines pouvant exercer une telle fonction (Hammond et Helenius, 1994; Lodish, 1995).

3.4.3 Transport vésiculaire du RER vers la membrane cytoplasmique

Au fur et à mesure que les protéines se déplacent à travers les différents compartiments de la voie sécrétoire cellulaire, elles sont collectées dans des vésicules dites de transport et par la suite libérées au sein du compartiment subséquent par fusion de la vésicule avec le compartiment ciblé. Les protéines responsables des fonctions de ciblage, reconnaissance et fusion des vésicules appartiennent aux complexes de protéines cytosoliques nommées COP (coat proteins). Ces complexes protéiques identifiés comme COPI et COPII recouvrent les vésicules de transport en donnant ainsi naissance à deux types différents de vésicules (Pelham, 1995; Kuehn et Schekman, 1997). Les vésicules COPI ont été trouvées associées au transport entre le RE et l'appareil de Golgi, et réciproquement, ainsi que dans le transport intra-Golgi. Finalement, un rôle dans la voie d'endocytose a été aussi proposé. Le fait que COPI soit impliquée dans différentes étapes du transport intracellulaire suggère que cette molécule soit capable de reconnaître différents motifs dans des compartiments différents (Cosson et Letourneur, 1997). Les vésicules recouvertes par COPII fonctionnent seulement dans le transport de protéines dès le RE vers l'appareil de Golgi (Kuehn et Schekman, 1997).

La fonction de ciblage et fusion entre les petites vésicules de transport et les différents organelles est accomplie par un ensemble de protéines, chacune ayant une tâche spécifique. On retrouve ainsi la "N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein" (NSF); la "soluble NSF attachment protein" (SNAP) et les SNAP récepteurs (SNAREs) (figure 1-14) (Nichols et al., 1997). Les SNAREs sont des protéines intégrales de membrane qui ont été suggéré comme étant responsables de la spécificité des processus de fusion. Il existe deux types de SNAREs: les vSNAREs associés aux vésicules et les tSNAREs (t = target) associés à la membrane cible. vSNARE est responsable d'acheminer la vésicule de transport vers la membrane correspondante qui possède son partenaire tSNARE. Bien qu'il y ait plusieurs modèles proposés, le mieux accepté propose l'existence d'un accostage initial entre la vésicule et la membrane ciblée. L'ensemble NSF/SNAP se lie au complexe des SNAREs entraînant un réarrangement des interactions protéine-protéine qui permet la fusion membranaire. Les complexes formés entre v et t SNAREs sont de type multivalents avec plus d'un membre intervenants de chaque compartiment; de plus, les liaisons sont très spécifiques, du type clé-serrure, de façon telle que seules les vésicules ciblées correctement peuvent s'accoster et fusionner avec les membranes cibles (Hay et Scheller, 1997). Bien que son rôle ne soit pas bien précisé, il a été suggéré que la protéine Rab peut fonctionner comme promoteur de l'assemblage du complexe v-t SNAREs (Novick et Zerial, 1997).

Le transport des protéines à partir du trans-Golgi jusque la membrane cellulaire s'effectue dans des vésicules qui ont besoin d'une « orientation » vers un endroit déterminé de la membrane. Cette information est contenue dans des signaux retrouvés dans le domaine cytoplasmique de la protéine transportée et qui comportent, dans la plupart des cas, une tyrosine ou une paire de leucines. Ces signaux sont décodés par des molécules spécifiques de reconnaissance qui interagissent avec une protéine qui tapisse la vésicule. La première étape dans cette forme de transport est la liaison des molécules à transporter au domaine lumenal ou extracellulaire d'un récepteur transmembranaire. Cette étape est suivie d'une concentration des récepteurs dans une région de la membrane par interaction avec un complexe de protéines appelées

adaptines (AP). Ces molécules déterminent quelles protéines seront spécifiquement recrutées dans la vésicule de transport en formation et lesquelles en seront exclues (figure 1-13) (Kirchhausen et al., 1997).

Le transport vésiculaire des protéines membranaires à partir du trans-Golgi implique deux types de complexes d'adaptines étroitement reliés: Le premier associé avec la membrane plasmique, dit AP2, et un autre associé avec le trans-Golgi, AP1. Les deux sont des hétérotétramères consistant en deux sous-unités lourdes d'environ 100 kDa (α et β pour la membrane plasmique, et γ et β' pour le trans-Golgi); une sous-unité moyenne d'environ 50kDa (μ 2 et μ 1, pour la membrane plasmique et le trans-Golgi, respectivement), et une petite sous-unité d'environ 20 kDa (σ 2 pour la membrane plasmique, σ 1 pour trans-Golgi) (Robinson, 1994; Kirchhausen et al., 1997). Les chaînes μ sont utilisées pour l'interaction avec la protéine à transporter (Ohno et al., 1995; Bonifacino et Dell'Angelica, 1999). Le complexe AP1 est impliqué dans le transport vers la membrane cellulaire et une forme de ce complexe, contenant la sous-unité μ 1B, a récemment été identifiée. Il semble être capable d'interagir avec des signaux basés sur des tyrosines et de diriger le transport de protéines vers le domaine basolatéral de la cellule (Fölsch et al., 1999; Ohno et al., 1999). Dans le cas du VIH, il reste toutefois à établir si μ 1B est responsable du ciblage basolatéral de la glycoprotéine. Pour sa part, le complexe AP2 est clairement identifié comme relié à l'endocytose. Il est bien établi que le complexe AP2, recrute la glycoprotéine d'enveloppe dans des puits tapissés de clathrine pour son internalisation (Boge et al., 1998; Marsh et Pelchen-Matthews, 2000).

Une molécule de clathrine a la forme d'un trépied dont chacun des pieds est fait d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère. La structure en trépied caractéristique de la clathrine facilite l'assemblage en forme de cage avec chaque côté en forme hexagonale ou pentagonale (Robinson, 1994). L'initiation et la coordination de l'assemblage de la clathrine autour des puits des membranes plasmiques et du trans-Golgi sont régulées par le complexe d'adaptines et il a été rapporté que les sous-

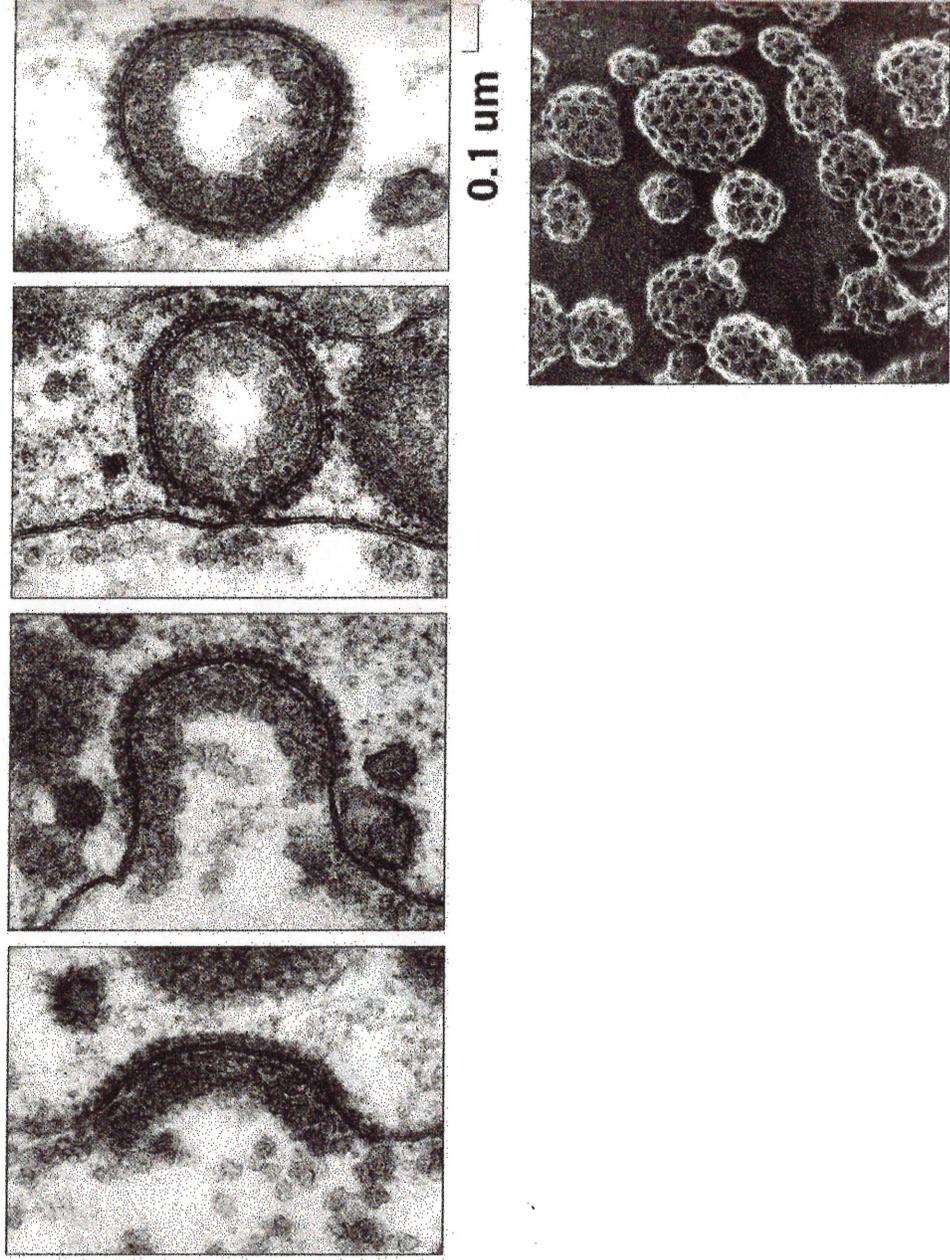


Fig. 1-12. Microphotographie d'une vésicule à clathrine. (Figure tirée d'Alberts et al., 1998).

unités β sont suffisantes pour interagir avec la clathrine et induire la formation de la coquille. Il y a une autre protéine à signaler: la dynamine, protéine qui a un rôle déterminant dans la formation de l'étranglement entre la membrane et la vésicule en libérant cette dernière (voir figures 1-12 et 1-13) (Robinson, 1994; McNiven, 1998).

Finalement, deux nouveaux membres de la famille des adaptines, AP3 et AP4, composé des sous-unités δ , β_3 , μ_3 et σ_3 , et ϵ , β_4 , μ_4 et σ_4 , ont été plus récemment identifiés (Dell'Angelica et al., 1997; Simpson et al., 1997; Dell'Angelica et al., 1999a). Le complexe AP3 est associé au trans-Golgi et aux endosomes et est capable d'interagir avec la clathrine. Des études faites en utilisant des cellules défectives pour le complexe AP3 ont suggéré qu'il est impliqué dans le transport vers les lysosomes (Dell'Angelica et al., 1998; Dell'Angelica et al., 1999b). Quand à AP4, il pourrait avoir aussi un rôle dans le ciblage vers les lysosomes et les endosomes mais les évidences expérimentales demeurent indirectes (Aguilar et al., 2001).

Le fait que les protéines membranaires doivent être acheminées vers des sites différents dans la cellule implique l'existence de toute une gamme de signaux contenus sur les différentes protéines et qui peuvent interagir avec les éléments du transport vésiculaire. Il existe donc des signaux qui dirigent des protéines vers le noyau, vers les mitochondries, vers l'appareil de Golgi, vers les lysosomes, enfin vers le RE. Plusieurs de ces signaux doivent être reconnus par des protéines différentes des adaptines que l'on peut considérer « classiques », permettant le ciblage au compartiment approprié dans la cellule (Voir Garoff, 1985).

3.5 Le transport des protéines membranaires épithéliales

La génération et le maintien de domaines membranaires distincts chez les cellules épithéliales implique l'existence de mécanismes de transport spécifiques pour chacun des domaines membranaires. Dans les sections qui suivent ces mécanismes seront passés en revue.

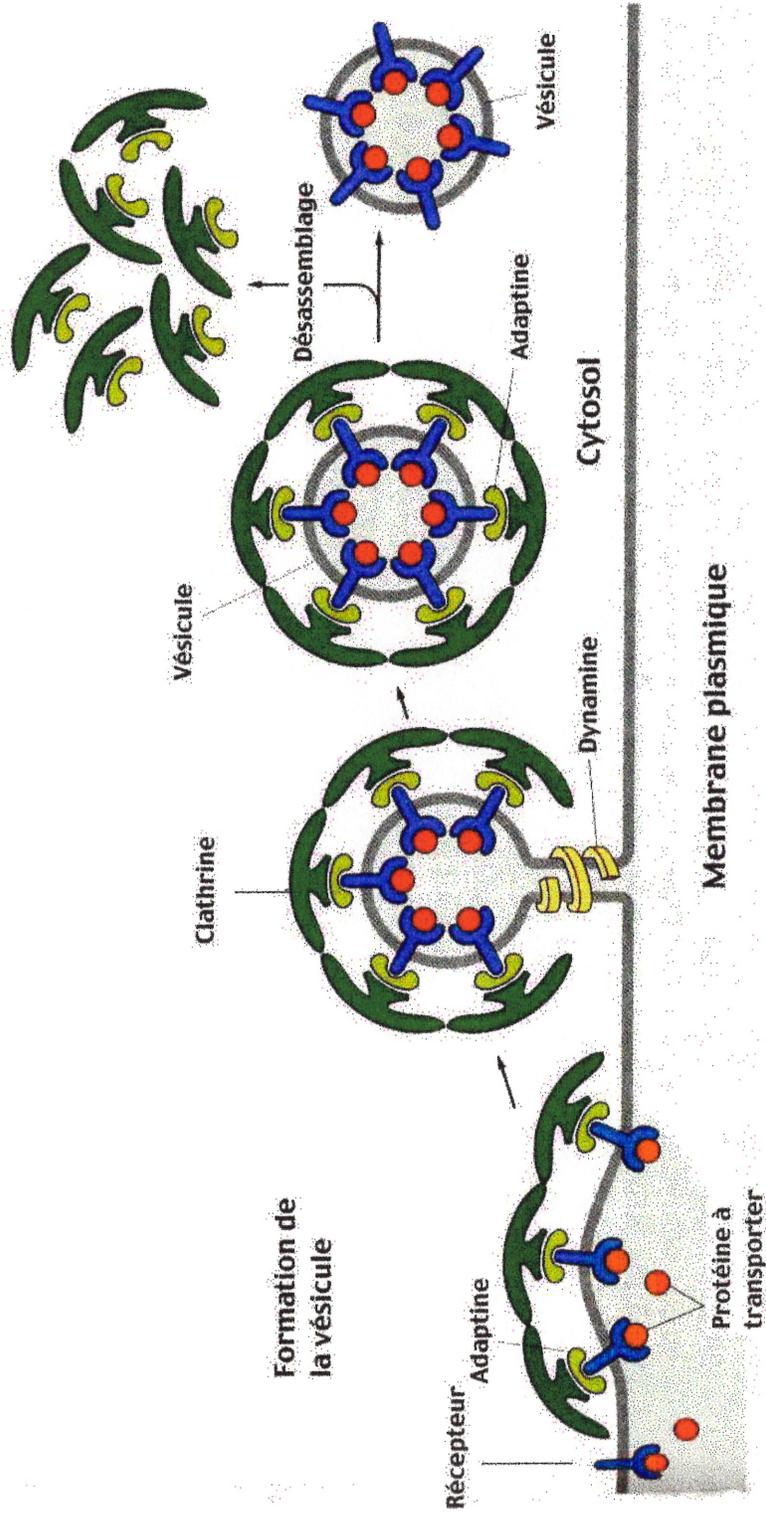


Fig. 1-13. Modèle proposé pour la formation d'une vésicule à clathrine.
 (Figure tirée d'Alberts et al., 1998)

3.5.1 Modèle de transport direct

Les protéines membranaires apicales et basolatérales sont synthétisées dans le RE, tel que déjà discuté, et sont transportées ensemble vers et à travers le complexe de Golgi. Le processus de triage vers les domaines auxquels elles sont destinées se fait au niveau du trans-Golgi et dans les endosomes. Ce triage comporte deux voies de transport direct: apical et basolatéral.

3.5.1.1 Domaine apical

La membrane apicale fait face au lumen de l'organe et est souvent couverte par d'abondantes microvillosités. Elle est la plus spécialisée car elle contient la majeure partie des protéines requises pour les fonctions spécifiques de l'organe tel que l'absorption ou la résorption des substances nutritives. Généralement, la membrane apicale est aussi enrichie en glycolipides et sphingomyéline (Matter et Mellman, 1994). On retrouve aussi une augmentation de la quantité de cholestérol par rapport à la contrepartie basolatérale (Simons et Fuller, 1985; Compans et Srinivas, 1991). Le domaine apical est spécialement riche en enzymes comme la Mg+2ATPase (Wisher et Evans, 1975); l'endopeptidase neutre (Danielson et al., 1980); 5'nucleotidase (Colas et Maroux, 1980); la maltase (Kerjaschki et al., 1984) et la leucine aminopeptidase (Desnuelle, 1979). Le ciblage des protéines apicales est étroitement relié à deux éléments: les ectodomains et l'ancrage glycosylphosphatidyl inositol.

Les signaux apicaux

Les ectodomains

Il est devenu de plus en plus clair que l'information pour le ciblage spécifiant le domaine de localisation peut être présent dans plus d'un site sur les protéines de membranes plasmiques épithéliales. Cependant, le domaine cytoplasmique des protéines contient de façon générale les signaux de ciblage basolatéraux tandis que l'ectodomaine a été surtout associé au transport polarisé apical. La protéine chimère constituée de la portion extracellulaire de la protéine apicale HA du virus de l'influenza et des régions transmembranaires et cytoplasmiques de la protéine basolatérale G du VSV est exprimée du côté apical dans deux

lignées de cellules épithéliales différentes (McQueen et al., 1986; Roth et al., 1987). Une autre construction dans laquelle l'ectodomaine de la glycoprotéine G a été liée aux régions transmembranaires et cytoplasmiques de HA a été transportée à la surface basolatérale dans les mêmes cellules (McQueen et al., 1997). Ces résultats indiquent que le signal de ciblage apical de HA est sur l'ectodomaine de la protéine. D'autre part, la délétion de presque tous les acides aminés de la région cytoplasmique du récepteur de l'immunoglobuline A a altéré le phénotype de ciblage: tandis que la protéine sauvage est transportée à la surface basolatérale et par la suite est acheminée vers la surface apicale, la protéine tronquée est transportée directement à la surface apicale (Mostov et al., 1987). Ces observations suggèrent que des signaux sur le domaine cytoplasmique peuvent masquer la reconnaissance des signaux localisés sur l'ectodomaine.

Le glycosylphosphatidylinositol (GPI)

Les protéines des membranes plasmiques épithéliales qui sont ancrées par ce mécanisme sont des protéines typiquement polarisées vers la surface apicale dans des cellules hépatiques, rénales et intestinales (Lisanti et Rodriguez-Boulan, 1990). D'autre part, des études effectuées sur des protéines endogènes de cellules MDCK, Caco-2, SK-CO-15 et LLC-PK1 ont trouvé un lien entre l'ancrage à la membrane par le GPI et une localisation apicale (Lisanti et al., 1990; Ali et Evans, 1990). Les chimères créées entre l'ectodomaine des glycoprotéines basolatérales Herpes gD1 et VSV G et le signal d'affinité à GPI de DAF (decay accelerating factor) et Thy-1 ont donné aussi des évidences de l'implication de GPI dans la polarisation apicale, car les protéines de fusion gD1-DAF et G-Thy ont été ciblé directement de l'appareil de Golgi vers la surface apicale dans des cellules MDCK transfectées (Lisanti et al., 1989). Finalement, le blocage de la synthèse de GPI par la mannosamine résulte en une sortie non polarisée des protéines normalement liées à GPI (Lisanti et al., 1991).

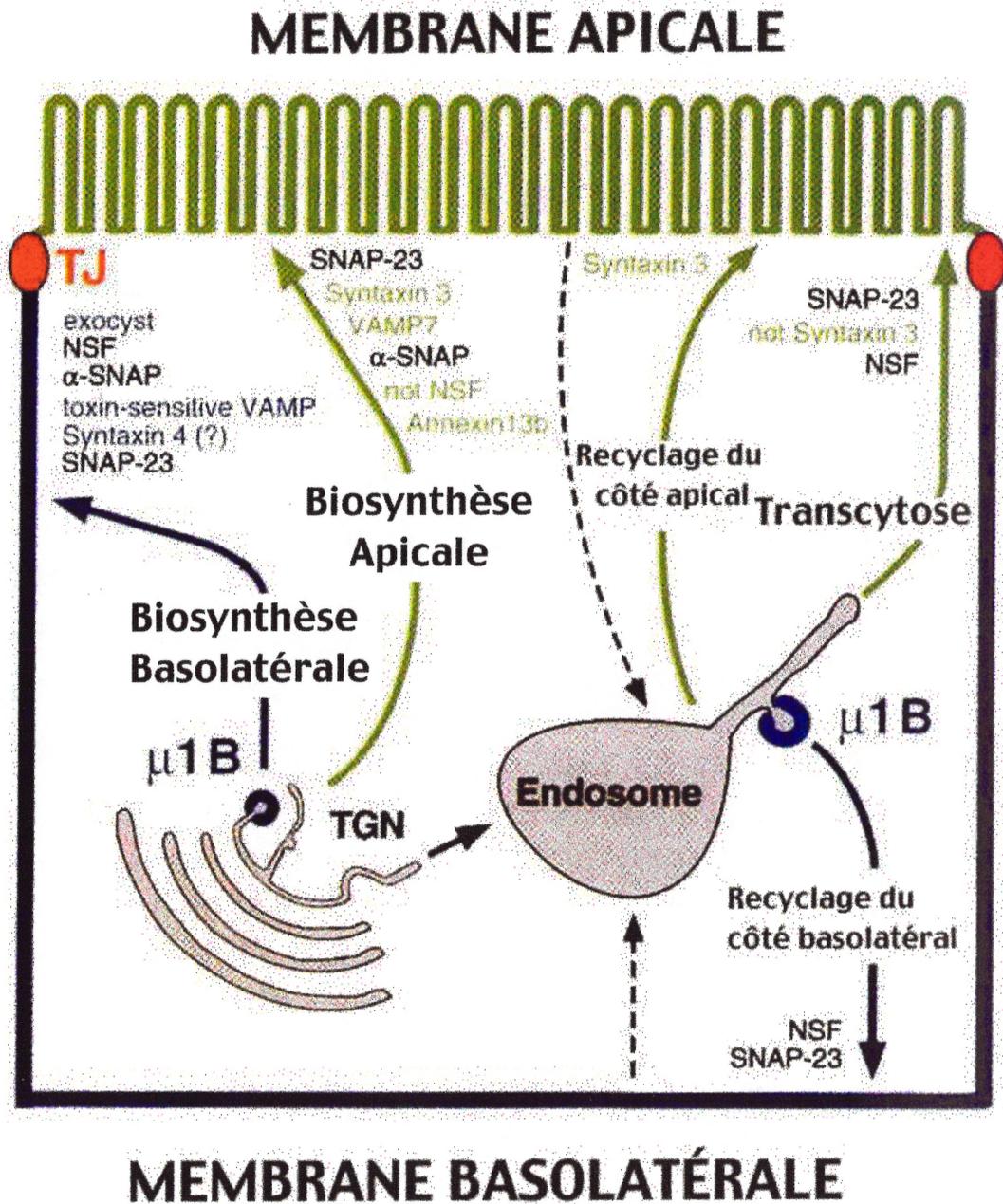


Fig. 1-14. Composants de la machinerie du transport membranaire impliqués dans le transport polarisé chez les cellules épithéliales. Composants du transport apical= vert; composants du transport basolatéral= bleu. (Figure tirée de Mostov et al., 1999).

3.5.1.2 Domaine basolatéral

L'autre domaine des cellules épithéliales correspond à la surface basolatérale, laquelle contient la plus grande partie des protéines de la membrane plasmique requises pour les processus fondamentaux de la cellule, communs aux cellules polarisées et non polarisées: par exemple Na⁺,K⁺-ATPase, récepteur de la transférine, récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL-R), etc. (Matter et Mellman, 1994). La proportion de glycolipides et cholestérol de la membrane basolatérale est basse comparée au domaine apical. Par contre, la quantité de phosphatidylcholine présente est particulièrement importante (Compans et Srinivas, 1991; Matter et Mellman, 1994).

Les signaux basolatéraux

Initialement, il était présumé que le transport apical des protéines qui venaient d'être synthétisées était dirigé par des signaux, alors que le ciblage basolatéral était un transport « par défaut » dénué de tous signaux spécifiques. L'identification de signaux dans le domaine cytoplasmique de protéines basolatérales et la redistribution de celles-ci vers le côté apical, suite à la délétion de tels signaux, a radicalement changé ce point de vue.

Deux classes de signaux basolatéraux ont été identifiés: le premier est relié aux vésicules de clathrine et le deuxième est indépendant de ce mécanisme de transport (Matter et Mellman, 1994). Les signaux qui sont reliés aux vésicules de clathrine sont trouvés dans le contexte YXXØ, dont X est n'importe quel acide aminé et Ø est un acide aminé hydrophobe de haut poids moléculaire (leucine, valine et phenylalanine étant les plus fréquents) (Ohno et al., 1995; Bonifacino et Dell'Angelica, 1999). Ce motif basé sur des tyrosines a été retrouvé chez des protéines d'origine cellulaire et virale (Hunziker et al., 1991; Berlioz-Torrent et al., 1999). En fait, la protéine où il a été premièrement identifié est dans la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV G) (McQueen et al., 1986). En plus de son rôle dans le ciblage basolatéral, le signal YXXØ est responsable de l'endocytose de la protéine (Hunziker et al., 1991; Boge et al., 1998). Les autres exemples classiques de protéines cellulaires avec des signaux qui sont reliés aux vésicules de clathrine,

sont la glycoprotéine lysosomale lamp-1 (Hunziker et al., 1991), la phosphatase acide (Prill et al., 1993), le récepteur du facteur de croissance neuronal (nerve growth factor receptor) (Le Bivic et al., 1991). D'autre part, des études ont identifié un signal d'endocytose, indépendant de tyrosine, qui colocalise avec un signal de polarisation basolatéral. Ce signal basé sur un motif di-leucine a été retrouvé entre autres dans le récepteur du fragment Fc des IgG de la souris et dans la protéine Nef du VIH tel que déjà mentionné (Matter et al., 1994; Greenberg et al., 1998).

Les signaux basolatéraux non reliés aux vésicules de clathrine ne comportent pas un signal d'endocytose et ne présentent pas non plus d'homologie entre eux, suggérant un aspect structural pour leur activité. On retrouve ainsi des séquences consensus du type RNXDXXS/TXXS comme dans le récepteur de la transférine (TR-R) (Dargement et al., 1993) et le récepteur des immunoglobulines polymériques (pIg-R) (Casanova et al., 1991) et des motifs basés sur des tyrosines comme dans le signal distal du récepteur des lipoprotéines de faible densité (LDL-R) dont la tyrosine est retrouvée dans le contexte NPXY (Matter et al., 1992).

Le LDL-R peut être classifié dans les deux groupes décrits précédemment. En fait, cette protéine contient dans son domaine cytoplasmique deux signaux de ciblage basolatéral à base de tyrosine: un signal localisé en position proximale à la membrane qui agit également comme signal d'endocytose et un signal distal qui n'est pas relié aux déterminants d'endocytose. Bien que les signaux de ciblage basolatéral et d'endocytose puissent dépendre de la même tyrosine critique, ce n'est pas le cas des résidus voisins. Des mutants de substitution d'acides aminés entourant la tyrosine ont présenté des effets différents face à l'endocytose et à la polarisation basolatérale chez plusieurs protéines virales et cellulaires. Ces données suggèrent que, bien que les signaux d'endocytose et de polarisation soient étroitement reliés, les caractéristiques structurales requises ne sont pas nécessairement identiques pour les deux événements (Matter et al., 1992; Matter et al., 1994).

Finale­ment, dans le cas des rétrovirus, il a été déter­miné que la glycoprotéine d'enveloppe du virus de l'immu­no­dé­fiance hu­maine type 1 (VIH-1) est trans­por­tée de façon spé­cifique vers la sur­face basolatérale de la mem­brane plas­mique dans des cellules épithé­liales polarisées et vers un pôle distinct des lymphocytes infectés (Owens et al., 1989; Lodge et al., 1997b; Deschambeault et al., 1999). Le signal res­pon­sa­ble de ce ciblage, qui entraîne aussi une polarisation de la sortie virale, est le motif YXXL localisé dans la région intracytoplas­mique proximale à la mem­brane sur la glycoprotéine d'enveloppe virale (Owens et al., 1991; Lodge et al., 1997b). Ce motif, en plus de son implication dans le ciblage basolatéral, est aussi res­pon­sa­ble de l'endocytose de la glycoprotéine (Egan et al., 1996; Boge et al., 1998). Enfin, un signal YXXL est aussi présent chez la glycoprotéine d'enveloppe du virus de la leucémie murine (VLM), le virus de la leucémie hu­maine T tropique (HTLV) et le virus de l'immu­no­dé­fiance simienne (VIS) (Lodge et al., 1997a; Berlioz-Torrent et al., 1999). Les possi­bles consé­quences de ce ciblage pour la pathologie virale ont été discutées précédemment.

3.5.2 Mécanismes de transport indirect

3.5.2.1 La transcytose

En plus des modèles de ciblage direct des protéines présentés précédemment, il existe un mode de transport décrit comme indirect puisque dans ce cas les protéines ne sont pas immé­dia­te­ment acheminées au compartiment cellulaire de destination finale. Les protéines qui utilisent ce moyen de transport séjournent d'abord du côté basolatéral de la mem­brane avant d'être transportées au côté apical (Hauri et Matter, 1991). Ce mécanisme de transcytose a été décrit en détail pour le ré­cep­teur de l'IgA polymérique. Après son ciblage initial vers le domaine basolatéral, déterminé par un signal cytoplas­mique, le ré­cep­teur est internalisé. Le signal impliqué dans cette endocytose est basé sur une tyrosine située dans la partie cytoplas­mique de la protéine proximale à la mem­brane (Mostov et al. 1992). Subséquemment, la phosphorylation d'une sérine située près du signal à base de tyrosine stimule la transcytose apicale du ré­cep­teur, apparemment par inactivation du dit signal (Apodaca et al., 1991).

Dans les hépatocytes, toutes les protéines de la membrane plasmique étudiées jusqu'à maintenant sont tout d'abord acheminées vers la surface basolatérale où elles sont « rescapées » parmi les protéines résidentes basolatérales et transportées au domaine apical par transcytose (Bartles et al., 1987). Finalement, dans des cellules Caco-2 et des cellules primaires de l'épithélium intestinal, les protéines apicales nouvellement synthétisées utilisent deux voies de transport: une voie directe à partir le trans-Golgi et une voie indirecte passant par la surface basolatérale (Matter et al., 1990; Hauri et Matter, 1991).

L'importance de chacune des voies utilisées (directe ou indirecte) dépend du type de cellule épithéliale et de la protéine transportée.

3.5.3 Transport par défaut

Finalement, il existe un dernier mécanisme de transport qui ne requiert pas des signaux déterminés, c'est le transport appelé par défaut. Un tel mécanisme hypothétique serait présent chez les protéines qui n'ont aucun signal de ciblage et qui sont conséquemment exclues des vésicules capables de cibler les protéines. Les protéines « non identifiées » sont ainsi incorporées dans une catégorie différente de vésicules et livrées vers la membrane plasmique (Compans et Srinivas, 1991).

D'autre part, existent des hypothèses qui proposent un mécanisme de transport par défaut ciblé vers un des domaines cellulaires. Le domaine qui a été plus souvent associé à cette modèle est le domaine basolatéral (Bartles et al., 1987; Le Bivic et al., 1990). Des travaux récents fait avec des protéines cellulaires et virales ont changés ce point de vue vers l'idée d'un contrôle du transport protéique par des signaux intracellulaires chez toutes les protéines (Rodriguez-Boulan et Powell, 1992).

3.6 Culture de cellules épithéliales *in vitro*

Les premières expériences pour étudier la biogénèse des protéines de sécrétion et de surface ont été faites dans des tissus possédant une organisation épithéliale, tels que le foie et le pancréas. Bien que le fait

d'utiliser des tissus complets comme système expérimental permette d'avoir une organisation épithéliale intacte, ce modèle a le désavantage d'une manipulation difficile et de la présence de plusieurs types de cellules dans un seul tissu. La majeure partie des difficultés techniques ont été surmontées avec l'utilisation de cultures de cellules épithéliales *in vitro* (voir figure 1-15) (Garoff, 1985; Simons et Fuller, 1985).

Quelques facteurs sont importants à considérer pour l'expression optimale du phénotype épithélial *in vitro*. *In vivo*, plusieurs substances nutritives sont assimilées par la cellule épithéliale à partir de la surface basolatérale, qui fait face à la circulation. Quand les cellules sont cultivées sur un support solide, au fur et à mesure que la monocouche devient plus étanche, dû à la formation des jonctions serrées, le domaine basolatéral n'est plus en contact avec le milieu de culture. Pour permettre aux cellules de croître correctement et d'atteindre une différenciation complète, celles-ci sont mises en culture sur de membranes semi-perméables, qui permettent aux éléments nutritifs d'être exposés aux protéines basolatérales responsables de leur transport intracellulaire sans négliger l'interaction des facteurs de croissance avec le domaine apical (figure 1-15) (Cereijido et al., 1978; Garoff, 1985; Simons et Fuller, 1985).

Les cellules épithéliales cultivées sur des membranes semi-perméables sont capables de générer des jonctions étanches qui permettent le développement d'une résistance entre les milieux baignant le domaine apical et basolatéral. Cette résistance est facilement mesurable en Ωcm^2 et est une indication de l'atteinte de la polarisation cellulaire. Un autre critère permettant de juger l'atteinte de la polarisation cellulaire est l'exclusion des protéines basolatérales du domaine apical et vice versa (Cereijido et al., 1978; Compans et Srinivas, 1991).

3.7 Cellules MDCK

La lignée cellulaire MDCK (Madin-Darby canine kidney) est la lignée de cellules épithéliales la mieux caractérisée jusqu'à maintenant (Rindler et al., 1979; Simons et Fuller, 1985; Simons, 1987). Ces cellules

CULTURE SUR FILTRE

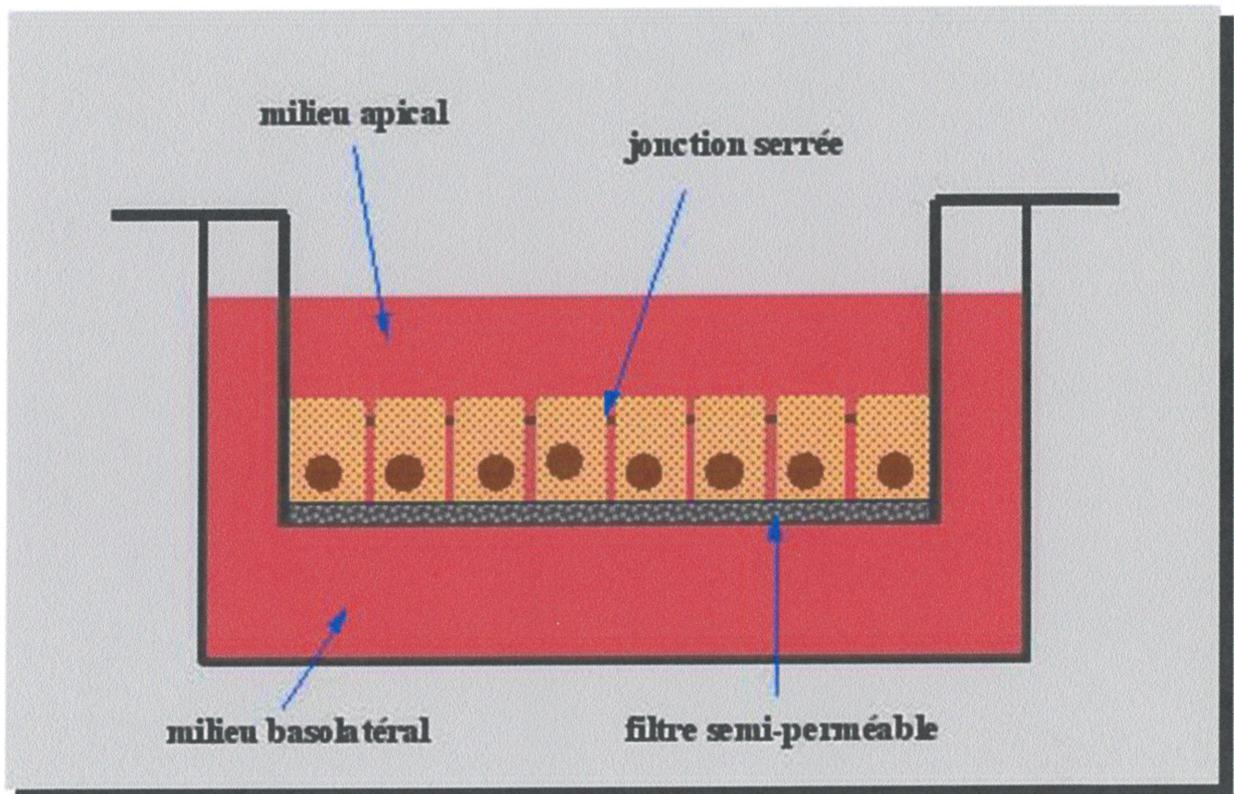


Fig. 1-15. Culture de cellules épithéliales *in vitro*.

retiennent la majorité des propriétés inhérentes à la cellule d'origine et tous les éléments caractéristiques d'une cellule épithéliale polarisée (Rindler et al., 1974; Rodriguez-Boulan et Powell, 1992).

3.8 Assemblage polarisé de virus enveloppés dans des cellules épithéliales

L'observation originale démontrant que les virus enveloppés bourgeonnaient à des domaines membranaires spécifiques des cellules épithéliales a fourni un modèle pour étudier la biosynthèse et le transport des protéines de membrane. En fait, la polarisation du bourgeonnement viral est un phénomène qui a été observé chez une variété de virus enveloppés et dans plusieurs types de cellules épithéliales ou non épithéliales (Rodriguez-Boulan et Powell, 1992; Stephens et Compans, 1988). Les virions contiennent une ou plusieurs glycoprotéines de surface, codées par le génome viral et ancrées dans la bicouche lipidique dérivée de la cellule. Plusieurs virus enveloppés sont assemblés en bourgeonnant à travers la membrane cytoplasmique tandis que d'autres le font en bourgeonnant à partir des membranes internes de la cellule (Compans et Srinivas, 1991).

La sortie polarisée d'un virus donné vers un domaine spécifique de la cellule est souvent conservée dans plusieurs types de cellules et de tissus. Par exemple, dans les cellules MDCK polarisées, le virus de l'influenza et les paramyxovirus bourgeonnent exclusivement vers la membrane apicale alors que le VSV est assemblé seulement du côté basolatéral (Rodriguez-Boulan et Sabatini, 1978). Ces mêmes observations ont été reproduites lorsque ces virus ont été utilisés pour infecter d'autres types de cellules épithéliales polarisées (Peng et al., 1990). Ces résultats démontrent qu'une variété de cellules épithéliales possèdent des mécanismes similaires pour le ciblage des protéines vers la membrane apicale ou basolatérale. D'autre part, des protéines normalement ciblées vers la membrane apicale sont ciblées vers l'axone lorsqu'exprimées dans des neurones polarisées alors que les protéines basolatérales sont plutôt dirigées vers le corps cellulaire et les dendrites; cette observation suggère une équivalence des surfaces axonale/apicale et

somatodendrite/basolatérale, respectivement (Dotti et Simons, 1990; de Hoop et Dotti, 1993).

L'assemblage viral polarisé dépend de la distribution et de l'accumulation de la glycoprotéine d'enveloppe virale à un domaine spécifique de la membrane plasmique (Rodriguez-Boulan et Pandergast, 1980; Owens et al., 1991; Lodge et al., 1997b). De plus, les glycoprotéines de plusieurs virus enveloppés sont synthétisées à des niveaux de 100 à 1000 fois plus élevés que les protéines endogènes de la membrane plasmique (Rodriguez-Boulan et Powell, 1992). Ceci facilite l'étude de leur transport à travers les différents compartiments intracellulaires. Des cellules épithéliales infectées par des virus sont devenues, en conséquence, le meilleur système pour l'investigation des mécanismes impliqués dans le ciblage des protéines de membrane.

Les modèles de protéines virales les plus « disséqués » jusqu'à maintenant sont les protéines d'enveloppe du virus de l'influenza, la glycoprotéine HA, et la glycoprotéine G du virus de la stomatite vésiculaire (Rindler et al., 1984). Des expériences de double infection montrent que la HA et la VSV G suivent une voie commune jusqu'au trans-Golgi, où elles sont triées vers des compartiments différents (Rindler et al., 1984). Des techniques de microscopie confocale montrent que ce processus est effectué par incorporation de chaque protéine au niveau du trans-Golgi dans des vésicules différentes qui seront dirigées vers le domaine apical (vésicules contenant HA) ou basolatéral (vésicules contenant la VSV G).

Le virus de l'influenza code pour deux glycoprotéines majeures: l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA), toutes les deux de localisation apicale dans les cellules infectées (Rodriguez-Boulan et Pandergast, 1980; Jones et al., 1985). Il a été suggéré que ces deux protéines sont responsables du ciblage de la sortie apicale du virus (Rodriguez-Boulan et Pandergast, 1980)

La protéine VSV G est une protéine typique de membrane de localisation basolatérale. Le transport de la glycoprotéine G vers la

membrane basolatérale est rendu possible grâce à la présence d'un signal de ciblage sur le domaine cytoplasmique de la protéine (Thomas et al, 1993), mais il est possible que le bourgeonnement du virus sur ce même côté de la cellule dépende d'un autre signal dans la protéine M (Bergmann et Fusco, 1988).

Enfin, en tant que rétrovirus le VIH et le virus de la leucémie murine (VLM) ont été étudiés dans le contexte du bourgeonnement dans les cellules épithéliales (Kilpatrick et al., 1987; Owens et al., 1991). Les aspects concernant l'assemblage et le bourgeonnement des rétrovirus ont été traités en détail dans une autre section. Bien que la protéine Gag est capable de s'assembler en pseudovirions sans la présence d'aucun autre facteur viral, la présence des glycoprotéines d'enveloppe est essentielle pour l'infectivité virale (Pavlikis, 1997). L'incorporation des glycoprotéines se fait durant le bourgeonnement viral au niveau de la membrane plasmique. Une interaction entre le domaine de la matrice de Gag et les glycoprotéines d'enveloppe permet cette incorporation (Mammano et al., 1995). Toute l'information concernant le site du bourgeonnement semble être contenue dans des signaux localisés sur le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine de surface, la gp41 (Owens et Compans, 1989; Owens et al., 1991; Lodge et al., 1997b). Des interactions de ces signaux avec des protéines cellulaires (adaptines) pourraient permettre le transport des glycoprotéines virales vers les sites ciblés de la membrane (Owens et al., 1991).

INTRODUCTION AU PROJET DE RECHERCHE

Il a donc été déterminé que le VIH présente une forte propension pour un bourgeonnement basolatéral au sein des cellules épithéliales et une restriction du bourgeonnement à un seul pôle des lymphocytes infectés (Owens et al., 1991; Lodge et al., 1997b; Deschambeault et al., 1999). Toute l'information pour la sortie polarisée semble être apportée par la glycoprotéine d'enveloppe dans un signal basé sur une tyrosine (Lodge et al. 1997). Ce signal est responsable aussi de l'endocytose de la glycoprotéine à partir de la membrane plasmique (Egan et al., 1996; Boge et al., 1998). Les protéines accessoires du VIH, Nef, Vif et Vpu, jouent des rôles importants dans les étapes d'assemblage, de morphogénèse et de maturation virale (Hoglund et al., 1994; Klimkait et al., 1990). Ceci soulève l'intéressante hypothèse d'une interaction fonctionnelle possible entre les fonctions de ciblage portées par la glycoprotéine d'enveloppe et les différentes fonctions exercées par les protéines accessoires (Chapitre 2).

Plusieurs événements reliés aux différentes étapes de la réplication virale sont contrôlés, au moins partiellement, par des mécanismes et protéines de l'hôte. En fait, le résultat d'une infection virale en général, et par le VIH en particulier, est déterminé par la nature des interactions entre les constituants du virus et de la cellule hôte. Par exemple, une infection peut demeurer non productive si un composant de la cellule nécessaire à la réplication virale est absent ou inadéquat pour un virus donné. D'autre part, dans le cas particulier du VIH, il a été déterminé que l'expression du phénotype de plusieurs facteurs viraux varie en fonction du type cellulaire et que certaines protéines accessoires, telle que Vif, pourraient compenser pour l'absence de facteurs cellulaires importants pour la réplication virale (Sakai et al., 1995; Gabuzda et al., 1992). L'existence au laboratoire de plusieurs clones de cellules lymphocytaires dérivés de la même lignée nous a amené à examiner la multiplication virale dans ce contexte (Chapitre 3).

Finalement, bien que les cellules MDCK aient été utilisées pendant plusieurs années, avec de bons résultats, pour étudier le ciblage des protéines du VIH et du bourgeonnement viral, le fait que ces cellules ne sont pas infectables par le VIH demeure une limitation. Les cellules MDCK sont un bon modèle pour l'étude du ciblage de protéines et de la sortie des virus *in vitro*. Le fait de retenir la majorité des propriétés inhérentes à la cellule d'origine a encouragé son utilisation dans la caractérisation de signaux de ciblage, mécanismes d'infection virale, localisation des récepteurs, etc. (Compans et Srinivas 1991; Rodriguez-Boulan et Sabatini, 1978; Rodriguez-Boulan et Powell, 1992). Dans le cas du VIH les différentes techniques de transfection de l'ADN proviral n'aboutissent malheureusement pas à des quantités importantes de virus. L'utilisation de cellules infectables pourrait permettre de contourner ce problème et d'analyser le processus d'entrée du virus à l'intérieur des cellules polarisées, l'interaction avec leurs récepteurs, le comportement de ceux-ci dans la biologie virale, etc. (Chapitre 4).

OBJECTIF GÉNÉRAL ET BUTS DU TRAVAIL DE RECHERCHE

Le premier objectif de ce projet était d'examiner l'hypothèse qu'il puisse exister des interactions, à tout le moins fonctionnelles, entre les signaux de maturation et ciblage du VIH et d'autres facteurs viraux. La seconde partie du projet a consisté à examiner l'importance de la nature des cellules-cibles dans l'infection productive au VIH, faisant ainsi ressortir l'importance potentielle de facteurs cellulaires dans l'assemblage viral. Un dernier aspect visait, en parallèle, à établir des approches et outils devant permettre la poursuite de ces études.

Les buts du travail de recherche seront donc les suivants:

1. Déterminer si le site de bourgeonnement viral, due au signal YXXØ (YXXL dans le cas du VIH qui nous occupe spécifiquement) localisé dans la glycoprotéine d'enveloppe, influence l'activité des protéines virales accessoires (Chapitre 2).

2. Examiner la multiplication du VIH au sein de clones de cellules-cibles afin de déterminer leur influence sur l'assemblage viral (Chapitre 3).

3. Établir et caractériser une lignée de cellules MDCK infectables par le VIH-1 (Chapitre 4).

CHAPITRE 2

ARTICLE I

Influence of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein YXXL Endocytosis/Polarization Signal on Viral Accessory Proteins Functions

**Guillermo Cervantes Acosta, Robert Lodge, Guy Lemay,
and Éric A. Cohen.**

Cet article a été soumis à la revue Journal of Human Virology.
(Accepté pour publication le 24 août 2001).

AVANT-PROPOS

Des études de mutagenèse dirigée, préalablement effectuées sur chacune des tyrosines du domaine intracytoplasmique de la glycoprotéine gp41 du VIH, ont permis d'identifier un signal de ciblage au niveau de la tyrosine proximale à la membrane. Ce signal est essentiel pour la localisation basolatérale de l'enveloppe et pour la sortie virale polarisée dans des cellules épithéliales. En plus d'accomplir une fonction d'endocytose de la glycoprotéine, ce motif est également important pour le ciblage viral vers un pôle distinct des lymphocytes infectés. Le VIH, un lentivirus, diffère des autres rétrovirus entre autres par la présence de protéines dites accessoires qui régulent l'assemblage, la morphogénèse, la relâche et la maturation virale.

L'objectif visé dans le présent chapitre était de déterminer si les fonctions des protéines accessoires affectent ou peuvent être influencées par la présence ou l'absence du signal de polarisation. Les résultats obtenus ont révélé que le mutant affectant le signal de ciblage augmente l'infectivité du VIH en présence de la protéine accessoire Vpu, démontrant une interaction fonctionnelle de Vpu avec le signal de ciblage de gp41. Ces travaux ont fait l'objet de la publication « Influence of Human Immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein YXXL endocytosis/polarization signal on viral accessory protein function », acceptée pour publication dans la revue *Journal of Human Virology*. Quoique j'ai préparé les différentes constructions plasmidiques et effectué la majorité des expériences, il est à noter que le Dr. Robert Lodge a effectué les travaux illustrés à la fig. 1.

**Influence of Human Immunodeficiency Virus Type 1
Envelope Glycoprotein YXXL Endocytosis/Polarization
Signal on Viral Accessory Proteins Functions**

**Guillermo Cervantes-Acosta, M.Sc., Robert Lodge,
Ph.D., Guy Lemay, Ph.D. and Éric A. Cohen, Ph.D.***

*Département de Microbiologie et Immunologie, Université de
Montréal, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7*

Running title: HIV envelope glycoprotein YXXL signal

Grants: This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MRC) to G.L. and E.A.C. and a Fonds pour les Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) group grant (to É.A.C. and G.L). É.A.C. is the recipient of the Canada research chair in Human Retrovirology, G.L. is the recipient of a Chercheur-boursier award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). R. L. was the recipient of a NHRDP studentship and G. C.-A. was the recipient of a studentship from the Ministère de l'Éducation du Québec.

*To whom correspondence should be addressed at: Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7. Tel: (514)-343-5967; Fax: (514)-343-5995; Email: eric.cohen@umontreal.ca

INTRODUCTION

Assembly and release of infectious virions are the last steps in every productive viral multiplication cycle. In the case of lentiviruses, such as human immunodeficiency virus (HIV-1), these events occur at the plasma membrane where the virions are released by budding.^{1,2} Viral budding is accompanied by incorporation into virions of the viral envelope glycoprotein inserted in the plasma membrane via the host-cell protein transport machinery.

Contrary to the situation observed in most enveloped viruses, the presence of the viral envelope glycoprotein is not required for budding of retroviruses, including lentiviruses such as HIV. In absence of the glycoprotein, viral assembly and budding still take place with acquisition of a lipid envelope derived from the host cell plasma membrane. As a result of the absence of viral glycoprotein, normally responsible for recognition of the receptor at the cell surface, the resulting virions will be noninfectious. In HIV, assembly of the viral capsid takes place underneath the cell surface and final steps occur during and even after budding from the cell; this last process being referred to as "maturation".^{3,4}

In contrast to other retroviruses, viral assembly of lentiviruses, is also modulated by the action of "accessory" proteins encoded by the viral genome.^{5,6,7,8} The "Nef" accessory protein is responsible for promoting rapid endocytosis of the CD4 receptor from the cell surface;^{9,10} as a result, the presence of Nef increases the infectivity and/or release of virions.^{11,12} The effect of Nef is likely to be important in viral multiplication and pathogenesis since Nef-deleted human and simian immunodeficiency viruses are severely attenuated exhibiting an important delay in development of the disease.^{13,14,15} The "Vif" accessory protein appears to play an important role in morphogenesis of the viral capsid. Virions produced in vif's absence have a striking decrease in their specific infectivity^{16,17} and present an altered morphology;¹⁸ however, this effect of Vif is strictly cell-type

specific.¹⁶ Finally, the Vpu accessory protein exerts very complex pleiotropic effects on viral assembly and release. The first effect of Vpu is its ability to promote viral release. This also tends to decrease viral-induced cytopathic effects.^{19,20} The Vpu protein contributes also to the cell surface CD4 down modulation by mediating viral-induced degradation of the receptor in the endoplasmic reticulum;^{21,22,23} as a result, not only is the amount of CD4 reduced at the cell surface, but its presence is also reduced in released virions. The two phenomena imply an efficient incorporation of the envelope glycoprotein into the virus and entail an increase in viral infectivity.¹¹

Viral assembly and budding does not occur at random from the cell surface and additional molecular determinants are required for this targeted egress through specific membrane domains. The molecular events leading to the transport of the "Gag" precursor polypeptide are still not completely understood. Targeting of viral assembly and budding to specific membrane regions is generally thought to be mediated by the insertion of the glycoprotein at these specific surface domains, although recent evidence indicate that Gag can also influence Env targeting.²⁴ In one of the best studied model, it was shown that the HIV-1 glycoprotein is specifically transported to the basolateral membrane surface of polarized epithelial cells.^{25,26} This, in turn, caused viral budding to be primarily restricted at this cell surface.^{26,27} The targeting motif responsible for specific basolateral delivery of the glycoprotein was identified as an YXXL motif located in the intracytoplasmic membrane-proximal portion of the viral envelope glycoprotein.²⁶ This same motif was also shown to affect viral maturation in a cell type more reminiscent of natural HIV cellular targets; viral budding at the surface of infected T lymphocytes *in vitro* is largely restricted to one pole of the cell and this targeting is abolished by amino acid substitution of the crucial tyrosine in YXXL.²⁸ Although it is clear that molecular determinants in the Env transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain can influence the transport of Gag precursor to specific membrane domain, recent evidence indicate that determinants in Gag can also influence Env targeting.²⁴

Targeting YXXL motifs are well-known among cellular and viral proteins and they exert their effect by interacting with cellular proteins known as adaptor complexes^{29,30,31}. Accordingly, HIV and SIV YXXL motifs were shown to interact with such complexes, a further evidence that lentiviruses assembly can be modulated by both viral and cellular factors.^{30,32} The YXXL motif also promotes endocytosis of retroviral glycoproteins in addition to its role as a basolateral targeting signal.^{32,33,34,35} It has been proposed that reduction of viral glycoprotein levels at the cell surface by endocytosis could partially protect infected cells from the immune response.³⁶ It is also easy to envision that basolateral release from epithelial cells could favor viral transmission from the mucosal surface to the underlying blood flow.^{37,38} Functional importance of the YXXL motif in viral replication is also supported by evidence showing that altering the motif decreases *in vitro* cell-to-cell viral transmission in both HIV-1 and human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1).^{28,39} Importantly, recent evidence using the SIV model indicate that animals infected with mutant virus in the tyrosine-based motif failed to develop clinical signs of disease, thus supporting the importance of this signal in retroviral pathogenesis.⁴⁰

This study was undertaken in order to determine whether the function of Vif, Vpu and Nef accessory proteins, which indeed play a key role in viral assembly, could be differentially affected by the targeting/endocytosis motif of envelope glycoprotein. We report here, that the viral release enhancing effect of the Vpu protein increases infectivity of virions concomitantly with an increased incorporation of the viral envelope glycoprotein in a mutant where the tyrosine-based signal was mutated. This indicates that the functions of Vpu protein can be modulated by targeting of the associated viral glycoprotein and further supports a functional role of targeting signals in HIV biology.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructs

Isogenic proviral constructs were prepared in order to combine the tyrosine to serine substitution, abolishing the YXXL targeting signal (Y712S), with mutations affecting the expression of Vif, Vpu or Nef accessory proteins. HXBH10 Vpu+ HIV proviral construct was described previously.⁴¹ Vpu mutants HXBH10-VpuSS52/56, altered in CD4 degradation, and HXBH10-VpuF8I9, altered in its ability to stimulate viral release, were described elsewhere.^{42,43,44} The HXBc2Y712S (Vpu-) proviral construct which contains the Y712S substitution, derived from the HXBc2 (Vpu-) infectious molecular clone,^{45,46} has been described previously.²⁶ The Sall-BamHI fragment (nucleotide 5331 to 8017; +1 corresponding to the transcription initiation site) from HXBc2Y712S harboring the mutation resulting in the Y712S substitution in the envelope, and encompassing a KpnI site (nucleotide position 5934), was subcloned into the pBR322 vector. The new KpnI site of pBR322 was used to introduce the Sall-KpnI fragment which contains the *vpu* gene from HXBH10 or the *vpu* mutants from HXBH10-VpuSS52/56 and HXBH10-VpuF8I9. The Sall-BamHI fragment was then introduced into different proviral constructs to generate the isogenic proviruses containing the mutation Y712S as follows: *nef+/-*: pNL4.3-based pNLV102 and pNLV102ΔXho were described previously;⁴⁷ *vpu+*: The HXBc2 proviral construct has been described previously;⁴⁶ VpuSS52/56 and VpuF8I9: HXBH10 was described previously.⁴¹ In order to obtain the isogenic *Vif+/-* proviruses with the Y712S substitution, the Sall-BamHI fragment (nucleotide 5331 to 8017) from HXBc2Y712S was subcloned into the proviral constructs HXB2 and HXB2*vif*stop, the latter containing a frameshift in *vif*^{16,46} The genotype and final structure of the various proviral constructs used in this study is summarized in Fig. 2. Finally, plasmid SVCMV-VSV-G used for Vesicular Stomatitis Virus G glycoprotein expression has been described previously.²⁶

Cell lines

Human 293T, HeLa-CD4-LTR- β -gal, HeLa-CD4+, HeLa CD4- and the canine kidney polarized epithelial MDCK cell lines were all maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 8% fetal calf serum and antibiotics (penicillin and streptomycin) at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. The human CD4+ T-cell lines Jurkat and H9 were maintained in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum and 1% antibiotics. All cell lines were routinely tested to ensure the absence of Mycoplasma contamination, using a PCR detection method as recommended by the manufacturer (Stratagene).

Transfection experiments

Human CD4+ T-cell lines Jurkat and H9 were transfected with the different proviral DNA constructs (12 μ g of proviral DNA per 10⁷ cells) using a DEAE-dextran technique essentially as described previously.⁴⁸ The number of surviving cells was determined every 2 or 3 days using trypan blue exclusion as a criteria for viability. The cells were then centrifuged, resuspended in fresh medium, and diluted to a concentration of 500,000 cells/ml for further growth. The human HeLa-CD4+, HeLaCD4- and 293T cells were transfected with the different proviral constructs (12 μ g of proviral DNA per 10⁶ cells) using a calcium phosphate co-precipitation procedure.⁴⁹ Virus-containing supernatants were collected 48 h post tranfection and frozen in aliquots at -80°C.

Infection of 293 cells

Vpu+ or Vpu- infectious pseudotyped HIV virions containing either wild-type or mutant Env and the G glycoprotein of VSV were produced in 293T cells as previously described.²⁶ Briefly, 1.2 x 10⁶ cells were transfected with 10 μ g of either proviral construct with 10 μ g of SVCMV-VSV-G using the calcium phosphate co-precipitation procedure. Viruses were recovered 48 h after transfection and their reverse transcriptase activity was determined. Identical quantities of pseudotyped viruses were added for 8 h onto 10⁶ 293 cells grown in 60 mm diameter Petri dishes. Cells were then washed and maintained in

DMEM supplemented with serum and antibiotics. Virus-containing supernatants were collected 48 h post infection and frozen in aliquots at -80°C.

Determination of polarized viral budding

Polarized budding of viruses from MDCK cells was assayed as described previously.⁵⁰ Briefly, 10^6 cells were seeded per 24.5 mm diameter culture chamber and grown for 2-3 days on semipermeable 1 μ m pore diameter filter membranes (Falcon No. 3102) in DMEM. Polarization of the cell monolayer was verified by monitoring the electrical resistance between upper and lower chambers (Millicell-ERS resistance system, Millipore). Proviral DNA constructs were introduced by lipofection, medium was removed 24 h later, and cells were maintained in DMEM supplemented with serum and antibiotics. Media bathing the apical and the basolateral sides of the membrane filter were separately collected. Virus was concentrated by ultracentrifugation and quantitated using a sensitive p24 ELISA assay (Coulter Diagnostic).

Viral infectivity assay

Specific infectivity of viruses was measured using the MAGI assay.⁵¹ Briefly, reverse transcriptase activity was first determined to estimate total amounts of viruses.⁵² Viral inoculum corresponding to between 50,000 and 300,000 cpm was then applied onto HeLa-CD4-LTR- β -gal. The number of positive (blue) cells following staining for β -galactosidase activity was determined 48 h later.

Accessory proteins phenotype assay

To determine Nef phenotype in the presence of the Y712S envelope substitution, similar amount of isogenic Vpu+, Vif+ virus that combine the Y712S mutation in the targeting signal with the presence or absence of a frameshift mutation truncating the Nef protein were recovered from Jurkat cells and applied to the HeLa-CD4-LTR- β -gal indicator cell line. Staining for β -galactosidase expression was performed 48 h later.

For the Vif phenotype, four isogenic proviral constructs that combine the Y712S mutation in the targeting signal with the presence or absence of mutations affecting Vif expression were transfected into H9 cells. Supernatants were harvested 5 days post transfection and viral release was measured by reverse transcriptase activity.

Finally, conservation of the Vpu phenotype in four isogenic proviral constructs that combine the Y712S mutation in the targeting signal with the presence or absence of a mutation affecting Vpu expression was determined by transfection into MT4 cells. Supernatants were harvested 48 h post transfection and viral release was measured by reverse transcriptase activity.

Immunoprecipitation

Radiolabeled virions were prepared by transfection of human 293T cells with proviral DNA constructs harboring the SV40 replication origin, using the standard calcium phosphate co-precipitation procedure. Cells were labeled 3 days post transfection with 100 μ Ci/ml of Trans³⁵S-Label (ICN Biomedical, Costa Mesa, CA) for 8 h. Supernatants were collected, centrifuged at 3,000 r.p.m. for 10 min and filtered onto a 0.45 μ m-pore-diameter filter to remove cellular debris. Viruses were pelleted by ultracentrifugation at 45,000 r.p.m. for 1.5 h (Beckman Ti 50.4 rotor) through a 20% sucrose cushion and resuspended in RIPA lysis buffer [10 mM Tris-HCl (pH7.4), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1 % SDS, 0.25% sodium deoxycholate, 0.2% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]. Viral envelope glycoproteins and major capsid protein (p24) were immunoprecipitated using the HIV-positive human serum 162;⁵³ antigen-antibody complexes were isolated by addition of protein-A sepharose beads (Pharmacia) and centrifugation. Immunoprecipitated proteins were finally analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and radiolabeled proteins revealed by autoradiography. Quantitation of viral envelope glycoproteins and p24 capsid protein bands was performed on a Molecular Dynamics PhosphorImager.

RESULTS

Effect of viral accessory proteins on basolateral targeting

Considering the role of accessory proteins in viral assembly and maturation, it was of importance to determine first if these proteins could somehow affect the function of the envelope glycoprotein targeting signal. Isogenic proviral constructs, wild-type or deficient in either one of the three viral accessory proteins gene (*nef*, *vif* or *vpu*), were thus introduced by lipofection into a confluent monolayer of polarized MDCK epithelial cells. This approach has been extensively used in our laboratory to determine if viral release is polarized.⁵⁰ Quantitation of viral particles released at either cell surface, apical or basolateral, was then easily achieved using a p24 ELISA assay. As established before, viral release is almost exclusively basolateral. There was no significant differences in basolateral targeting of the virus when isogenic Nef+/-, Vif+/- or Vpu+/- viruses were compared (Fig 1). It can thus be concluded that the three accessory proteins involved in viral assembly and/or release of fully infectious virus do not exert an influence on the basolateral targeting phenomenon of viral budding observed in epithelial MDCK cells, yet, we cannot rule out that Vpu, Vif and Nef may not be functional in these cells. However, there is still the possibility that the targeting phenomenon, or the targeting signal itself, could somehow influence the action of the accessory proteins.

Influence of the targeting signal on accessory proteins function. To determine if there is a functional interaction between the envelope targeting signal and accessory proteins, isogenic proviral DNA constructs were designed such as to combine the Y712S mutation in the targeting signal with the presence or absence of each viral accessory protein (Fig. 2, see materials and methods). The effect of altering the YXXL signal on the function of accessory proteins was first tested in classical systems normally used for the study of each given protein.

i) The Nef protein: All four proviral constructs WT *env nef*+/- (*vpu*+, *vif*+) and Y712S *env nef*+/- (*vpu*+, *vif*+) were introduced by transfection into Jurkat CD4+ T cells and the viral production was

evaluated through the measurement of reverse transcriptase activity in the supernatant. The viruses collected 3 days after transfection were tested for their infectivity in the MAGI assay. There was an approximately 6-fold increase in infectivity for Nef+ viruses in both wild type and Y712S-Env viruses (Fig. 3A). This increase in infectivity resulting from Nef's presence is consistent with reports from the literature^{54,55} and Nef's activity is thus apparently unaffected by the polarization/endocytosis signal.

ii) The Vif protein: Vif has been found to be required for HIV replication in the CD4+ T-cell line H9.¹⁶ All four proviral constructs WT *env vif+/- (vpu-, nef-)* and Y712S *env vif+/- (vpu-, nef-)* were therefore introduced into these Vif-dependent H9 cells and viral multiplication was determined by measurement of reverse transcriptase activity in the supernatant. As expected, virus release was reduced almost 40-fold in the absence of Vif. This phenotype was retained in the Y712S mutant (Fig. 3B).

iii) The Vpu protein: The effect of Vpu on viral release was finally examined by transfecting each four proviral constructs WT *env vpu+/- (vif+, nef-)* and Y712S *env vpu+/- (vif+, nef-)* into MT4 CD4+ T cells where this effect was found to be most evident (personal communication). Supernatants were harvested 3 days post transfection and the decrease in viral release in *vpu-* constructs compared to *vpu+* was easily shown in both wild-type and Y712S-*env* constructs. Differences between Vpu+ and Vpu- were about 5-fold, with either envelope glycoprotein consistent with values reported in the literature (Fig. 3C).^{20,56}

Effect of polarisation on virus infectivity

The effect of Nef on viral infectivity was thus unaffected by the polarization signal. The large decrease in viral production observed with Vif-negative viruses prevented us to directly examine their infectivity; however in Vif-positive viruses the polarization signal does not appear to influence viral infectivity (data not shown). Although there was no apparent effect of the polarization signal on Vpu-mediated enhancement of viral release, the pleiotropic effects of this accessory protein led us to further examine infectivity of Vpu+/- viruses in the presence or absence

of the YXXL signal. This could be of importance, considering that in previous studies we showed that the polarization signal did not affect infectivity of cell-free virions but these experiments were performed only in the context of Vpu-negative viruses. Vpu represents one of the mechanisms developed by HIV-1 to increase viral propagation. It has indeed been suggested that Vpu in conjunction with Nef is able to increase viral infectivity through reduction of the level of CD4 expressed on the surface of the infected cell.¹¹ On the other hand, it would be important to determine whether the site of viral budding, as a result of the presence of the YXXL signal of the viral envelope glycoprotein, influences the activity of the Vpu protein. For this purpose, we exploited Jurkat cells previously shown to support a YXXL-dependent phenomenon of polarized viral budding.²⁸ Viruses released by these transfected cells were then characterized for their infectivity using the MAGI assay. In this approach, we observed a constant 2-fold increase in infectivity for the Y712S mutant in the presence of Vpu (Fig.4). Consistent with previous results,^{26,28} the polarization signal has no influence on viral infectivity in a Vpu- context (Fig.4). These experiments were also carried out on two different cell lines with similar results: an approximately 3-fold increase in the infectivity of the mutant virus Y712S in the presence of Vpu was observed in 293T and MT4 cell lines (data not shown). An additional experiment was undertaken to determine whether the observed infectivity increase could be reproduced with viruses harvested from infected rather than transfected cells. For this purpose, pseudotyped viruses having incorporated a VSV-G glycoprotein were generated in transfected 293T cells and used to infect 293 cells. Viruses released from infected cells were then tested for their infectivity using the MAGI assay. In this experiment, infectivity of viruses harboring the Y712S mutant was found to be more than 2-fold higher than that of wild-type virus in presence of Vpu. As observed for the transfection experiment, the infectivity of mutant viruses was found to be identical to that of wild-type viruses in absence of Vpu (data not shown).

Characterization of Vpu action on Y712S

In an effort to understand the nature of the differential effect of Vpu on infectivity of the Y712S mutant, three different approaches were used.

i) Importance of CD4 on the Vpu effect: To determine if the ability of Vpu to preferentially augment the infectivity of the Y712S mutant is due to the presence of CD4, we compared the effect on identical cell lines differing only by the presence of CD4. Virus stocks were prepared by transfection of *vpu+* proviral DNA in either CD4 negative or positive HeLa cells. Infectivity of viruses recovered 3 days later was then determined using the MAGI assay. We found a more than 2-fold increase in infectivity for Y712S viruses, released from either CD4+ or CD4- cells, as compared to their wild-type counterpart (Fig. 5). In contrast, Vpu negative controls exhibited similar infectious potential in the context of the YXXL (WT) or mutant SXXL (Y712S) signals in both HeLa and HeLa-CD4 cells (data not shown). The effect of Vpu observed on the Y712S mutant virus infectivity is thus independent of CD4 presence.

ii) Analysis of Vpu mutants: We further tried to "dissect" the effect of Vpu by taking advantage of well-characterized mutants differing in either their ability to downmodulate CD4 or to increase viral release. A mutant representative of each of the two phenotypes was thus combined with the Y712S mutation. The different proviruses were transiently transfected in 293T cells and their infectivity was measured using the MAGI assay. The mutant form of Vpu altered in its ability to promote viral release (VpuF8I9) was unable to increase viral infectivity of the Y712S envelope mutant (Fig 6) and indeed was essentially similar to a *vpu-* proviral construct in this assay, although the Vpu-induced CD4 degradation is normal with this mutant.⁴⁴ In contrast, the VpuSS52/56 mutant which exhibit a profound alteration of CD4 degradation, and only a slight reduction in Vpu-induced enhancement of viral release⁴³ could still stimulate infectivity of Y712S mutant (Fig 6).

iii) Immunoprecipitation of viral envelope glycoprotein: To determine whether differences in virion incorporation of viral envelope

glycoprotein could account for the Vpu effect on Y712S mutant, radiolabeled viral particles prepared by transient expression in 293T cells were subjected to immunoprecipitation. Comparisons of relative envelope to capsid amounts, calculated by densitometric quantification of gp120 envelope and p24 capsid protein bands, revealed that there is roughly a 2-fold increase in incorporation of the Y712S compared to the wild-type glycoprotein in presence of Vpu while relative incorporation of the two glycoproteins is similar in Vpu's absence (Fig. 7). Interestingly, a direct correlation between the relative Env/CA amount, and the apparent infectivity of the viral preparations recovered from the same cells was observed. Analysis of intracellular Env steady states levels in the same experiment did not reveal significant differences indicating that Vpu mutants did not affect expression level or stability of Env glycoproteins (data not shown)..

DISCUSSION

A functional interaction between the Vpu accessory protein and the tyrosine-based polarisation/endocytosis signal (YXXL) located in the intracytoplasmic tail of the HIV-1 gp41 was shown in the present study. This interaction is revealed by an increase in the infectivity of virus particles produced by viral infection or by transfection of proviral DNA combining a mutation of the viral glycoprotein targeting signal (Y712S) with wild-type Vpu. This was demonstrated in various cultured cells including CD4+ and CD4- cell lines. The observed increase of infectivity indicates that the action of viral accessory proteins could be modulated by targeting signals in envelope glycoprotein. Analysis of virions protein composition suggests that the level of incorporation of the glycoprotein into virus particles could be associated with the increase of infectivity observed with the Y712S mutant in the presence of wild-type Vpu. Data already exist suggesting that a YXXL motif is involved in the incorporation of envelope glycoproteins of Bovine Leukemia Virus, another retrovirus.⁵⁷ Moreover, it has been shown that substitution of a highly conserved tyrosine residue in the transmembrane cytoplasmic domain of the SIV Env protein results in higher levels of Env

glycoprotein expression at the surface of chronically infected cells and greater incorporation of Env into SIV virions.^{34,58} Likewise, we have previously shown that mutation in the YXXL polarization/endocytosis signal increased HIV-1 Env cell surface expression in Jurkat cells.²⁸ The issue that is still unresolved in this study is how Vpu might increase Env virion incorporation in such context. One possibility is that Vpu, through its viral release enhancement activity, somehow enhances or targets assembly of viral structural components at specific plasma membrane microdomains where the process of viral assembly and release is optimized. Interestingly, recent evidence indicate that detergent-insoluble lipid rafts of the plasma membrane may function as a natural meeting point for Env glycoproteins and Gag complexes and at such play an important role in the HIV-1 assembly and release process.^{59,60,61} Vpu, by facilitating the assembly of Gag and Env components to lipid rafts may influence the amount of Env incorporated into virions.

In contrast to Vpu, the other two accessory proteins tested, Nef and Vif did not display any functional interaction with the envelope polarization signal under the experimental conditions of this study. The molecular determinants of the Vpu viral protein which behave synergistically with the polarization mutant, so as to influence viral infectivity, are those which modulate viral release and which are located in the transmembrane domain of Vpu. This has been clearly shown by the fact that the well-characterized Vpu mutant, whose ability to promote viral release had been altered, was incapable of increasing viral infectivity of the envelope mutant Y712S. The mutant with an altered capacity for degrading CD4, on the other hand, retained the capacity to stimulate the Y712S mutant infectivity. This last result also correlates with observations made on HeLa CD4+ and HeLa CD4- cells indicating that the differential effect of Vpu does not depend on the presence of CD4. When infectivity tests are performed in the absence of viral protein Vpu, no influence of the polarization signal on viral infectivity is detected. This is consistent with earlier results involving the use of proviral constructs defective for viral proteins Nef and Vpu.^{26,28}

The exact role of targeting signal in viral life cycle and pathogenesis remains to be clearly established. Recently, it was shown that a tyrosine-based motif, located proximally to the membrane, promoted cell-to-cell transmission of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1),³⁹ For our part we have shown that this motif, in the case of HIV-1, displays the same function in viral transmission, mediated via cell-to-cell contacts.²⁸ Finally, it has been shown that the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) has the ability to positively regulate HIV-2, HIV-1 and Simian Immunodeficiency virus (SIV) viral release, demonstrating that HIV-2 envelope glycoprotein can functionally complement Vpu with respect to virus release.^{62,63} It will be of importance to take into account these putative functional interactions between envelope glycoproteins and accessory proteins for future research aimed at investigating the effect of accessory proteins, and of the Vpu protein in particular, on HIV pathogenesis. Our observations also stress the importance of comparing viruses that express the same accessory proteins when looking at phenotypes conferred by various alterations or mutations in the viral envelope glycoproteins. This is especially significant in the context of recent data suggesting that the dual endocytosis/polarization tyrosine-based motif of simian immunodeficiency virus is required to maintain the full pathogenic potential of virus in inoculated macaques.⁴⁰

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Universidad del Norte (Colombia) for continuous financial support of G. C.-A. during his doctoral studies. We also thank Carole Danis, Johanne Mercier and Nicole Rougeau for expert technical support.

REFERENCES

1. Einfeld D. Maturation and assembly of retroviral glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;214:133-176.
2. Nermut MV, Hockley DJ. Comparative morphology and structural classification of retrovirus. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;214:3-24.
3. Haseltine W. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J* 1991;5:2349-2360.
4. Pavlakis GN. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. In: De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *AIDS: Biology, diagnosis, treatment and prevention*, fourth edition. Lippincott-Raven Publishers, 1997:45-74.
5. Subbramanian R, Cohen ÉA. Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *J Virol* 1994;68:6831-6835.
6. Trono D. HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. *Cell* 1995;82:189-192.
7. Mansky LM. Accessory replication proteins and the accuracy of reverse transcription: implication for retroviral genetic diversity. *Trends Genet* 1997;13:134-136
8. Emerman M, Malim MH. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* 1998;280:1880-1884.
9. Garcia JV, Miller AD. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* 1991;350:508-511.
10. Mariani R, Skowronski J. CD4 downregulation by nef alleles isolated from HIV-1-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5549-5553.

11. Lama J, Mangasarian A, Trono D. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr Biol* 1999;9:622-631.
12. Ross TM, Oran AE, Cullen BR. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol* 1999;9:613-621.
13. Kestler III HW, Ringler DJ, Mori K, et al. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 1991;65:651-662.
14. Dyer WB, Ogg GS, Demoitie MA, et al. Strong human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte activity in Sydney Blood Bank Cohort patients infected with nef-defective HIV type 1. *J Virol* 1999;73:436-443.
15. Learmont JC, Geczy AF, Mills J, et al. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med* 1999;340:1715-22.
16. Gabuzda DH, Lawrence K, Langhoff E, et al. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J Virol* 1992;66:6489-6495.
17. Fan L, Peden K. Cell-free transmission of vif-mutants of HIV-1. *Virology* 1992;190:19-29.
18. Hoglund S, Ohagen A, Lawrence K, et al. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* 1994;201:349-355.
19. Terwilliger EF, Cohen ÉA, Lu Y, et al. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:5163-5167.

20. Klimkait T, Strebel K, Hoggan MD, et al. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 1990;64:621-629.
21. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, et al. Human immunodeficiency virus type 1 vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol* 1992;66:226-234.
22. Willey RL, Maldarelli F, Martin MA, et al. Human immunodeficiency virus type 1 vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* 1992;66:7193-7200.
23. Vincent MJ, Raja NU, Jabbar MA. Human immunodeficiency virus type 1 vpu protein induces degradation of chimeric envelope glycoproteins bearing the cytoplasmic and anchor domains of CD4: role of the cytoplasmic domain in vpu-induced degradation in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 1993;67:5538-5549.
24. Hermida-Matsumoto L, Resh MD. Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging. *J Virol* 2000; 74:8670-8679.
25. Owens RJ, Compans RW. Expression of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein is restricted to basolateral surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol* 1989;63:978-982.
26. Lodge R, Lalonde J-P, Lemay G, et al. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO J* 1997;16:695-705.
27. Owens RJ, Dubay JW, Hunter E, et al. Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3987-3991.

28. Deschambeault J, Lalonde J-P, Cervantes-Acosta G, et al. Polarized human immunodeficiency virus budding in lymphocytes involves a tyrosine-based signal and favors cell-to-cell viral transmission. *J Virol* 1999;73:5010-5017.
29. Ohno HJ, Stewart J, Fournier MC, et al. Interaction of tyrosine-based sorting signal with clathrin-associated proteins. *Science* 1995;269:1872-1875.
30. Berlioz-Torrent C, Shacklett BL, Erdtmann L, et al. Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J Virol* 1999;73:1350-1361.
31. Bonifacino JS, Dell'Angelica EC. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol* 1999;145:923-926.
32. Boge M, Wyss S, Bonifacino JS, et al. A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor. *J Biol Chem* 1998;273:15773-15778.
33. Egan MA, Carruth LM, Rowell JF, et al. Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein. *J Virol* 1996;70:6547-6557.
34. LaBranche CC, Sauter MM, Haggarty BS, et al. A single amino acid change in the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane molecule increases envelope glycoprotein expression on infected cells. *J Virol* 1995;69:5217-5227.

35. Sauter MM, Pelchen-Matthews A, Bron R, et al. An internalization signal in the simian immunodeficiency virus transmembrane protein cytoplasmic domain modulates expression of envelope glycoproteins on the cell surface. *J Cell Biol* 1996;132:795-811.
36. Marsh M, Pelchen-Matthews A. Endocytosis in viral replication. *Traffic* 2000;1:525-532.
37. Tan X, Pearce-Pratt R, Phillips DM. Productive infection of a cervical epithelial cell line with human immunodeficiency virus: implications for sexual transmission. *J Virol* 1993;67:6447-6452.
38. Phillips DM, Zacharopoulos VR, Tan X, et al. Mechanisms of sexual transmission of HIV: does HIV infect intact epithelia?. *Trends Microbiol* 1994;2:454-458.
39. Delamarre L, Pique C, Rosenberg AR, et al. The Y-S-L-I tyrosine-based motif in the cytoplasmic domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope is essential for cell-to-cell transmission. *J Virol* 1999;73:9659-9663.
40. Fultz PN, Vance PJ, Endres MJ, et al. In vivo attenuation of simian immunodeficiency virus by disruption of a tyrosine-dependent sorting signal in the envelope glycoprotein cytoplasmic tail. *J Virol* 2001;75:278-291.
41. Yao X-J, Göttlinger H, Haseltine WA, et al. Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J Virol* 1992;66:5119-5126.
42. Friberg J, Ladha A, Göttlinger H, et al. Functional analysis of the phosphorylation sites on the human immunodeficiency virus type 1 vpu protein. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1995;8:10-22.
43. Tiganos E, Yao X-J, Friberg J, et al. Putative ∞ -helical structures in the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein and CD4 are

- involved in binding and degradation of the CD4 molecule. *J Virol* 1997;71:4452-4460.
44. Tiganos E, Friberg J, Alain B, et al. Structural and functional analysis of the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus type 1 vpu protein. *Virology* 1998;251:96-107.
45. Fisher AG, Collalti E, Ratner L, et al. A molecular clone of HTLV-III with biological activity. *Nature* 1985;316:262-265.
46. Ratner L, Fisher A, Jagodzinski LL, et al. Complete nucleotide sequence of functional clones of the AIDS virus. *AIDS Res Hum Retrovir* 1987;3:57-69.
47. Ahmad N, Venkatesan S. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* 1988;241:1481-1485.
48. Yao X-J, Subbramanian RA, Rougeau N, et al. Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 VPR: role of predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J Virol* 1995;69:7032-7044.
49. Yao X-J, Friberg J, Checroune F, et al. Degradation of CD4 induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: a predicted alpha-helix structure in the proximal cytoplasmic region of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *Virology* 1995;209:615-623.
50. Lodge R, Göttinger H, Gabuzda D, et al. The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J Virol* 1994;68:4857-4861.
51. Kimpton J, Ederman M. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated β -galactosidase gene. *J Virol* 1991;66:2232-2239.

52. Lee MH, Sano K, Morales FE, et al.. Sensitive reverse transcriptase assay to detect and quantitate human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1987;25:1717-1721.
53. Lavallée C, Yao XJ, Ladha A, et al. Requirement of the Pr55gag precursor for incorporation of the Vpr product into human immunodeficiency virus type 1 viral particles. *J Virol* 1994;68:1926-1934.
54. Miller MD, Warmerdam MT, Gaston I, et al. The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages. *J Exp Med* 1994;179:101-113.
55. Aiken C. Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *J Virol* 1997;71:5871-5877.
56. Strebel K, Klimkait T, Martin MA. A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16 kilodalton product. *Science* 1988;241:1221-1223.
57. Inabe K, Nishizawa M, Tajima S, et al. The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions. *J Virol* 1999;73:1293-1301.
58. LaBranche CC, Sauter MM, Haggarty BS, et al. Biological, molecular, and structural analysis of a cytopathic variant from a molecularly cloned simian immunodeficiency virus. *J Virol* 1994;68:5509-5522.
59. Rouso L, Mixon MB, Chen BK, et al. Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:13523-13525.

60. Pickl WF, Pimentel-Munoz FX, Seed B. Lipid rafts and pseudotyping. *J Virol* 2001; 75:7175-7183.
61. Lindwasser OW, Resh M. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J Virol* 2001; 75:7913-7924.
62. Bour S, Schubert U, Peden K, et al. The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor?. *J Virol* 1996;70:820-829.
63. Bour S, Strebel K. The human immunodeficiency virus (HIV) type 2 envelope protein is a functional complement to HIV type 1 Vpu that enhances particle release of heterologous retroviruses. *J Virol* 1996;70:8285-8300.

Fig. 1. Effect of viral accessory proteins on basolateral targeting. Isogenic proviral constructs with wild type envelope gene and harboring or lacking each accessory proteins gene (*nef*, *vpu*, *vif*) were introduced by lipofection into MDCK cells grown onto semi-permeable filters. Apical and basolateral supernatants were harvested 48 h post transfection and virus was quantitated by p24 ELISA as described in Material and Methods.

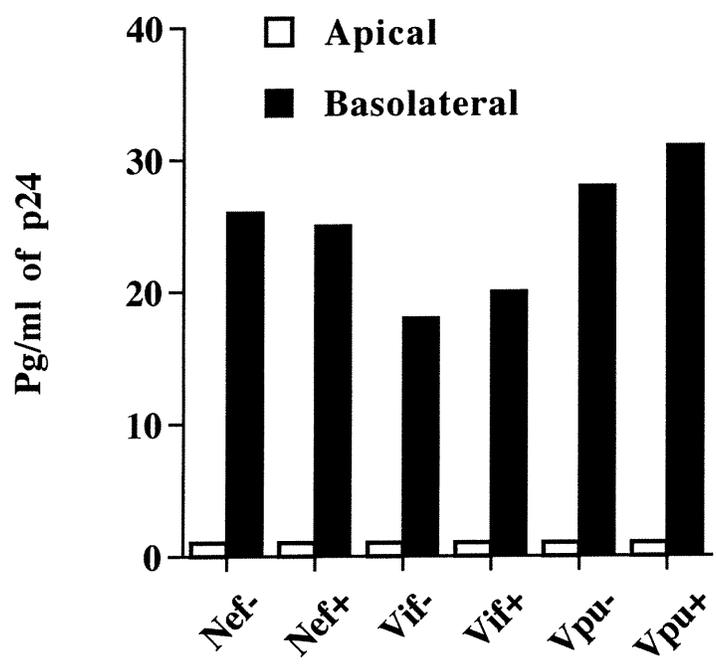
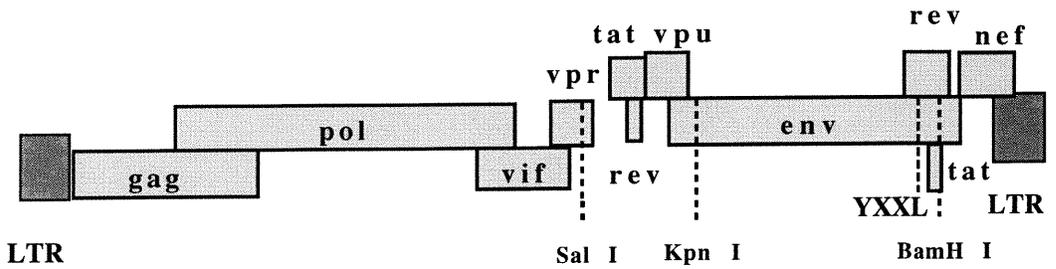
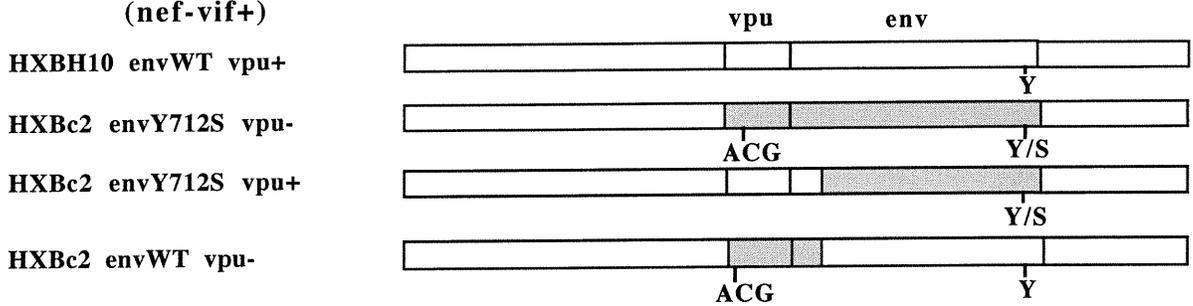


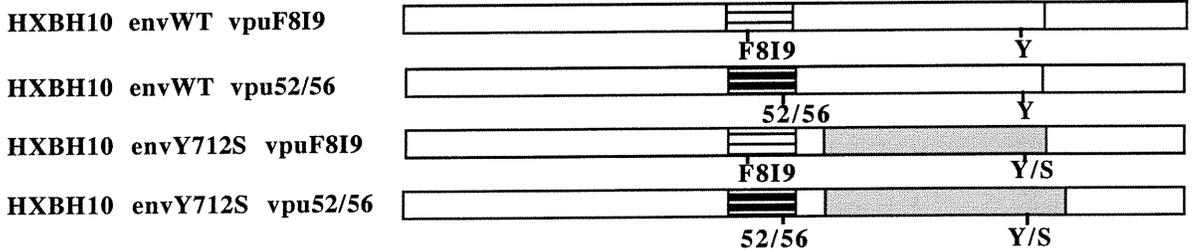
Fig. 2. Schematic representation of isogenic proviral constructs. The KpnI-BamHI fragment harbors the coding region corresponding to the wild type (Y) or the Y712S (Y/S) envelope mutant. Wild type or mutant forms of accessory proteins are shown. *vpu*-negative constructs harbor a mutation of the ATG initiation codon to ACG. Mutations altering the Vpu release-enhancing function (F8I9) or CD4-degradation function (SS52/56) are indicated. *nef*-negative constructs harbor a frameshift mutation (Δ Xho) while *vif*-negative constructs have mutations introducing two premature termination codons (TAG TAA). See materials and methods for a complete description of sub-cloning strategies.



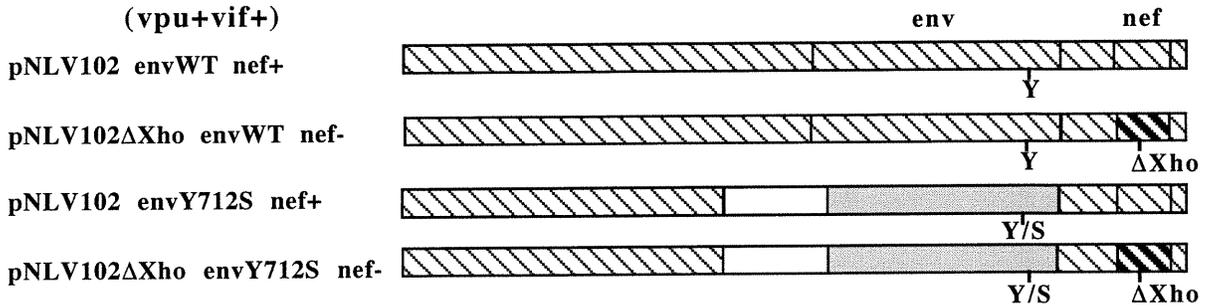
(nef-vif+)



(nef-vif+)



(vpu+vif+)



(vpu-nef-)

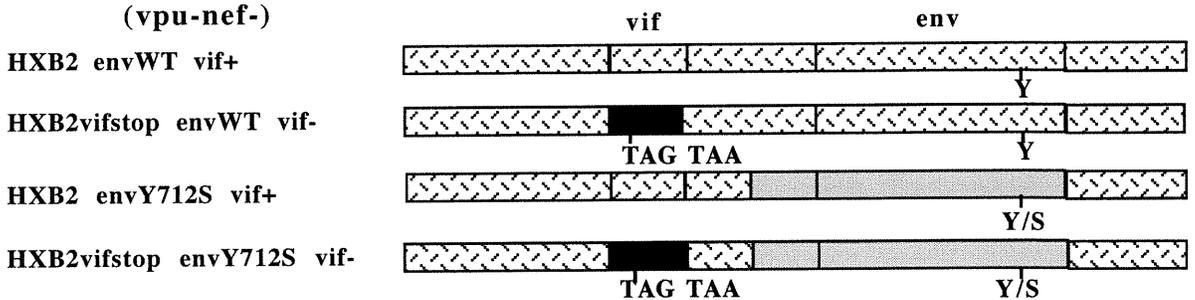
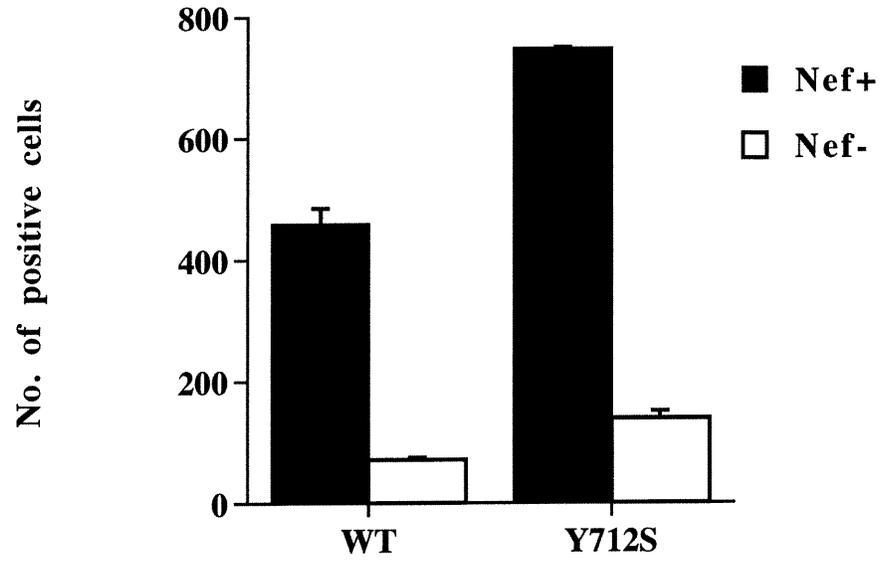
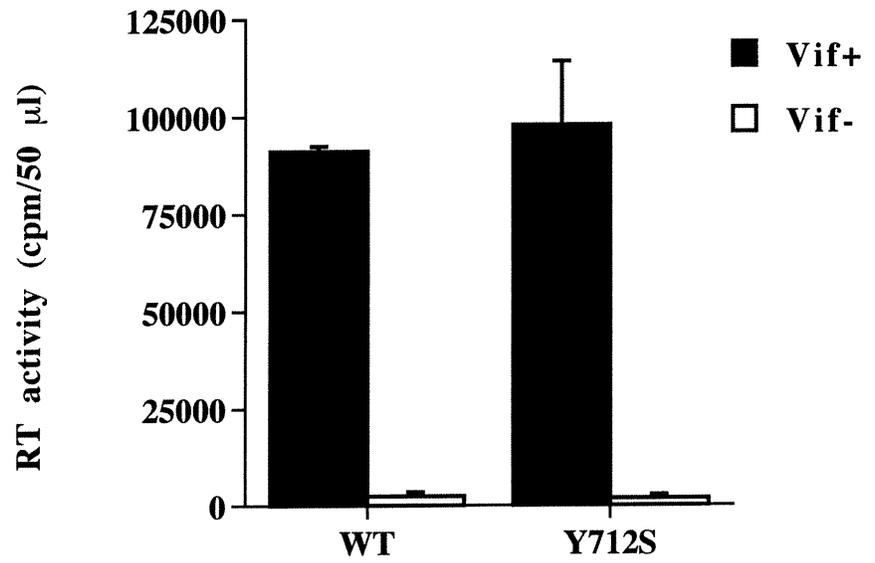


Fig. 3. Expression of accessory proteins phenotype in the presence or absence of the HIV Y712S envelope glycoprotein. **(A)** Four proviral constructs WT *env* (*nef*+/-) and Y712S *env* (*nef*+/-) were introduced into Jurkat cells. Three days post transfection similar amounts of viruses, as estimated from reverse transcriptase values, were applied onto HeLa-CD4-LTR- β -gal indicator cell line (MAGI cells). The number of positive (blue) cells was determined 48 h later. **(B)** Proviral constructs WT *env* (*vif*+/-) and Y712S *env* (*vif*+/-) were introduced into H9 cells. Supernatants were harvested 5 days post transfection and viral release was measured by reverse transcriptase activity. **(C)** Proviral constructs WT *env* (*vpu*+/-) and Y712S *env* (*vpu*+/-) were introduced into MT4 cells. Supernatants were harvested 3 days post transfection and viral release was measured by reverse transcriptase activity. The results are presented as the average of three samples in one experiment and are representative of three distinct experiments, error bars represent standard error.

A.



B.



C.

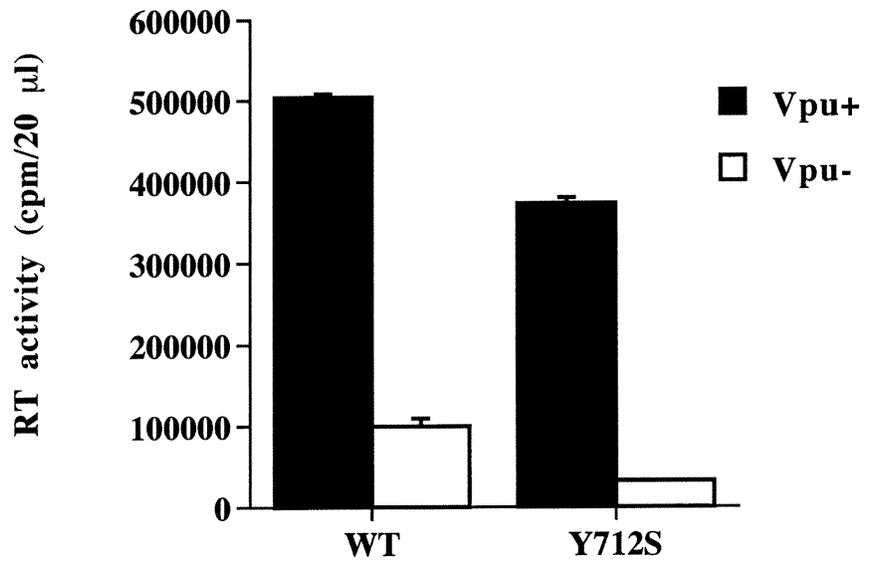


Fig. 4. Effect of Vpu on virus infectivity. Proviral plasmid constructs were introduced into Jurkat cells. Viruses were recovered three days post transfection. Similar amounts of viruses, as estimated from reverse transcriptase values, were applied onto HeLa-CD4-LTR- β -gal indicator cell lines. The number of positive, infected cells, was determined 48 h later by staining for β -galactosidase activity. The results are presented as the average of two samples and are representative of three distinct experiments.

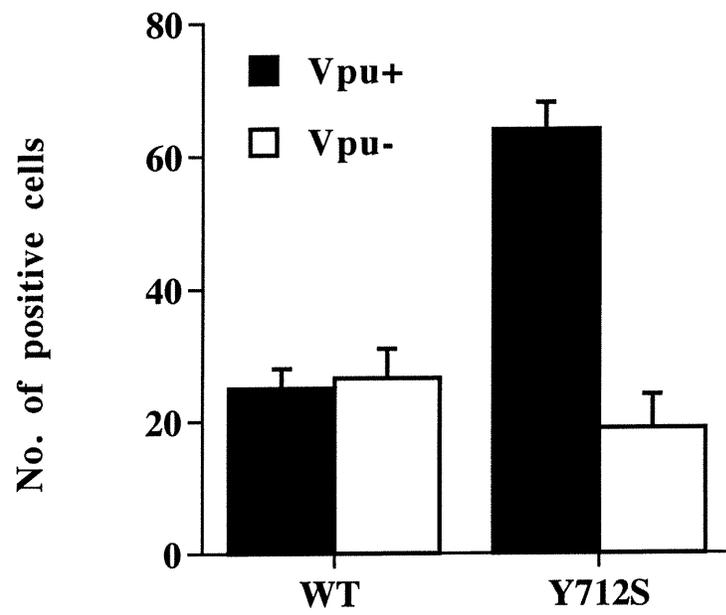


Fig. 5. Comparison of Vpu infectivity effect in the presence or absence of CD4. HeLa cells expressing or lacking CD4 were transfected with *vpu+* proviral DNA and viruses were recovered 3 days later. Amounts of virus corresponding to 100,000 cpm of reverse transcriptase activity were applied onto HeLa-CD4-LTR- β -gal indicator cells before measuring their infectivity by the MAGI assay. Results are expressed as the number of blue colonies observed 48 h later. Values are presented as the average of two samples and are representative of two distinct experiments.

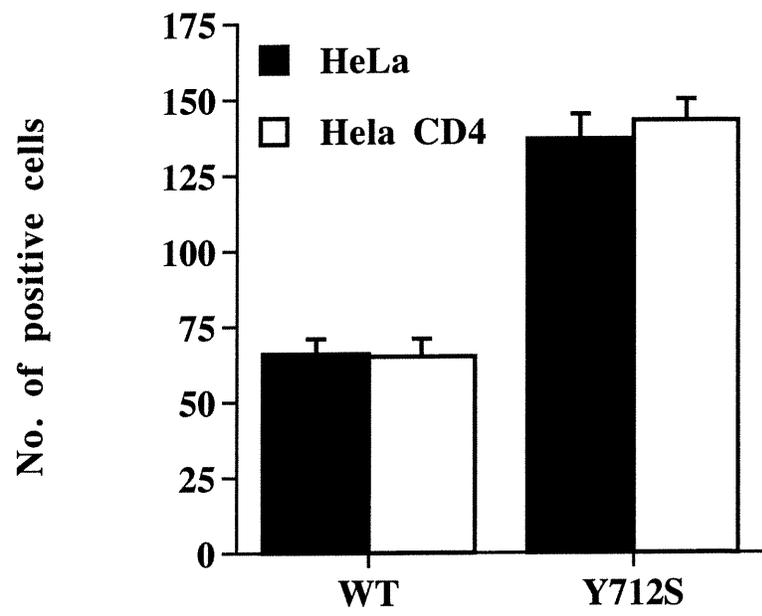


Fig. 6. Effect of Vpu mutations on stimulation of viral infectivity. Proviral constructs harboring wild type or mutant forms of the Vpu protein in the presence of a wild type or Y712S envelope mutant were transfected into 293T cells. Vpu mutant F8I9 has lost the release enhancing function while SS52/56 has lost the CD4 degradation function of Vpu. Virus-containing supernatants were collected 48 h post transfection and their infectivity was measured as in Fig. 5. The results are presented as the average of three samples in one experiment and are representative of three distinct experiments.

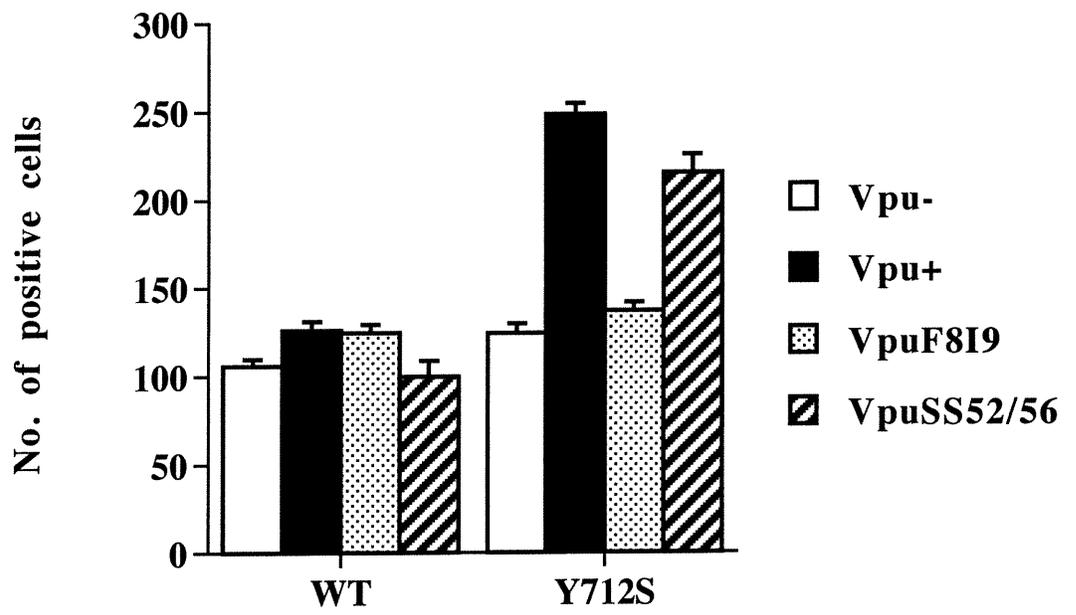
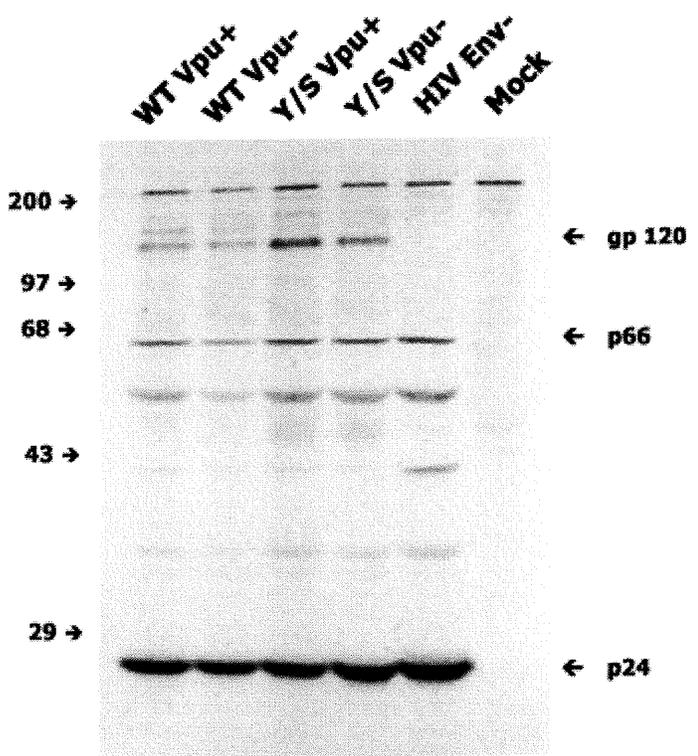


Fig. 7. Incorporation of envelope glycoprotein to the virions. 293T cells were transfected with the indicated isogenic proviral constructs. Cells were subjected to metabolic labeling 48 h post transfection as described in Material and Methods. Viral pellets were recovered by ultracentrifugation of cell supernatants and resuspended in RIPA lysis buffer. Viral proteins were immunoprecipitated using an anti-HIV antiserum and resolved on a 10% SDS-PAGE gel. Labeled proteins were then revealed by autoradiography. Positions of molecular weight standard are indicated at the left while positions of p24 capsid, p66 reverse transcriptase and gp120 envelope proteins are indicated at the right of the autoradiogram.



CHAPITRE 3

ARTICLE II

Human Jurkat lymphocytes clones differ in their capacity to support productive human immunodeficiency virus type 1 multiplication

Guillermo Cervantes-Acosta, Éric A. Cohen and Guy Lemay

Cet article a été publié dans la revue Journal of Virological Methods

AVANT-PROPOS

Les interactions virus-cellule hôte sont essentielles pour le développement d'une infection virale et, en plus des éléments codés par son propre génome, le virus a besoin de facteurs cellulaires pour accomplir les différents processus liés à l'infection. Enfin, l'expression du phénotype associé à plusieurs protéines du VIH peut donc dépendre du type cellulaire où les virus sont produits. Contrairement au premier chapitre où l'influence de facteurs viraux sur l'infectivité virale était examinée, le présent chapitre porte davantage sur l'influence de la cellule sur cette infectivité.

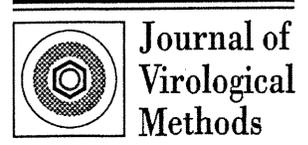
Des expériences effectuées au laboratoire sur des virus récupérés de la lignée cellulaire Jurkat avaient donné des résultats qui pourraient être reliés au clone cellulaire utilisé pour la production virale, suggérant l'influence de facteurs cellulaires. Dans le but de mieux caractériser ce phénomène, une étude comparative a été faite en utilisant plusieurs clones de cellules Jurkat.

Les résultats obtenus ont permis de révéler que les différents clones utilisés varient de manière importante dans leur réponse à l'infection virale et leur capacité à être infectés. Les trois clones étudiés diffèrent non seulement dans les effets exercés par le virus, mais aussi au niveau de l'infectivité spécifique des virus qu'ils relâchent. Finalement, ces observations suggèrent aussi que des études comparatives entre clones différents dérivés de la même lignée cellulaire pourraient donner des informations importantes concernant les facteurs cellulaires qui influencent la cytopathogénèse et l'infectivité virale. Ces observations ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Journal of Virological Methods*, j'ai effectué l'ensemble des travaux décrits dans cet article.



ELSEVIER

Journal of Virological Methods 92 (2001) 207–213



www.elsevier.com/locate/jviromet

Short communication

Human Jurkat lymphocytes clones differ in their capacity to support productive human immunodeficiency virus type 1 multiplication

Guillermo Cervantes-Acosta^a, Éric A. Cohen^a, Guy Lemay^{a,*}

^a *Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7*

Received 11 July 2000; received in revised form 14 November 2000; accepted 15 November 2000

Abstract

CD4-positive human lymphocytic cell lines are essential tools for the study of human immunodeficiency virus (HIV) replication. Jurkat cells are among cells more frequently used for this purpose. In the current study, various cell clones or cells stocks derived from this cell line were shown to vary substantially in their response to viral infection and in their ability to support productive virus multiplication. The formation of syncytia, the effect of Vpu on viral export, and especially the specific infectivity of the viruses released, can vary significantly among independent cell stocks. This suggests that the choice of an adequate cell clone or cell line could be critical while evaluating specific properties of the virus and further stresses the limitations of tissue culture models. However, these observations also raise the possibility of exploiting these differences among cells to study specific aspects of host-cell interactions contributing to viral multiplication. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: HIV; Jurkat cells; Human lymphocytes; Vpu protein; Viral infectivity; MAGI assay

Studies of human immunodeficiency virus (HIV-1) require the use of permissive cells for replication and quantitation of the virus. Considering the tropism of the virus for lymphocytes, and requirements for both the CD4 and CXCR4 receptors for T-tropic viruses (Dalglish et al.,

1984; Yi et al., 1999), various human lymphocytes in culture have been used (Popovic et al., 1984a,b).

Among the most common lymphocytic cell lines used in these studies is the Jurkat CD4+ human T cell line. These cells are susceptible to infection by HIV T-tropic viruses and allow viral replication (Wendler et al., 1987). Jurkat cells are propagated easily and their infection by HIV can lead to viral persistence (See for example:

* Corresponding author: Tel: +1-514-3432422; Fax: +1-514-3435701.

E-mail address: guy.lemay@umontreal.ca (G. Lemay).

Deschambeault et al., 1999) associated with a down-modulation of CD4 expression at the cell surface (Geleziunas et al., 1994). The facility with which these cells can be transfected with cloned proviral DNA has made this cell line one of the most popular for molecular studies of HIV replication (See for example: Gama Sosa et al., 1989; Caputo et al., 1990; Stauber et al., 1999; Verhaselt et al., 1999).

Although Jurkat cells have been used for many years in the laboratory (Lodge et al., 1997; Deschambeault et al., 1999), recent experimental observations raised concerns about reproducibility of new results. This led to the brief study reported now. It was observed that viral replication and its effect on infected cells can differ widely among distinct Jurkat cells stocks. In addition to practical consequences for the choice of cells for specific purposes, these comparisons could reveal important correlations between viral replication per se and cytopathic effects during *in vitro* HIV infection of cell cultures.

Three different Jurkat cell stocks were studied: the well-described E6-1 clone (Perez et al., 1991), and two cell stocks that were independently passaged in the laboratory for an extended period of time, here referred to as Jurkat 1 (JK1) and Jurkat 2 (JK2). All these cells were grown in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum and 1% antibiotics.

Cells were transfected with either HXBH10-vpu⁺ (LTR-gag⁺, pol⁺, vif⁺, vpr⁻, tat⁺, rev⁺, vpu⁺, env⁺, nef-LTR) or HXBH10-vpu⁻ (LTR-gag⁺, pol⁺, vif⁺, vpr⁻, tat⁺, rev⁺, vpu⁻, env⁺, nef-LTR) proviral DNA using the DEAE-dextran procedure, as described previously (Yao et al., 1995). These isogenic infectious molecular clones differ only in their ability to express Vpu (Yao et al., 1992). Control cells were mock-transfected. The effect of Vpu was retained as one criterion for analysis since it is a major determinant of viral production; furthermore, its effect was shown to be cell line dependent (Sakai et al., 1995). Following transfection, viable cells were counted every 3 days using the trypan blue exclusion method and diluted to reach 500,000 cells per ml. Virus-containing supernatants were collected and frozen in aliquots at -80°C .

The three cell stocks differ in the cytopathic effects observed in these experiments. Both JK1 and JK2 showed decreased cell numbers at 3 to 6 days post-transfection; in E6-1 cells, cell growth was slowed down without an actual decrease in total viable cell numbers (Fig. 1). This was correlated with visual inspection showing that the E6-1 cell clone has a reduced propensity to form syncytia following transfection. Both the number and size of syncytia produced were reduced compared to syncytia observed with the other two cell stocks (Fig. 1). Clearly, stocks JK1 and JK2 were more sensitive to HIV cytopathic effects than E6-1 and, consequently, are better suited for studies dealing with viral cytopathic effects. Marked differences between the three cell stocks could not be attributed to possible differences in transfection efficiencies which will be expected to alter the rapidity with which cell death occurs rather than its extent. This was ruled out further by looking at direct viral infection; the differences in cytopathic effects was similar to those observed upon transfection of cloned proviral DNA (data not shown). There was no significant differences between Vpu⁻ and Vpu⁺ viruses in these experiments looking at cytopathic effects in transfected cells. Both viruses produced similar cytopathic effects, as visualized by cell death and decreased cell numbers around day 6 post-transfection in JK1 and JK2 cells.

Total virus production in transfected cells was then measured by reverse transcription (RT) activity assay on cell supernatants (Lee et al., 1987). All three cell stocks supported the multiplication of Vpu⁺ viruses as shown by virus release that peaked at approximately 6 days post-transfection (Fig. 2). Viral production was not significantly different from one cell stock to the other despite the reduced cytopathogenicity observed in clone E6-1. In all cell stocks, the peak of viral replication was followed by a gradual decrease at later times, characteristic of the establishment of chronically-infected cell lines (Fig. 2).

Although equivalent viral production was observed in Vpu⁺ viruses, the effect of Vpu on viral release was different in the three cell stocks. This effect was barely detectable in stock JK2, but in clone E6-1 a 3.1-fold increase in viral produc-

tion due to Vpu was observed; cell stock JK1 showed an intermediate phenotype (Fig. 2). Clearly, the E6-1 clone will be the clone of choice in studies assessing the effect of Vpu. These data underscore the importance of choosing adequate cells while performing specific types of experiments.

The infectivity of viruses released from the different Jurkat cells was then examined using the MAGI (Multinuclear Activation of Galactosidase

Indicator Cells) infectivity assay developed by Kimpton and Emerman (1992). This assay has become the standard procedure for HIV titration and determination of viral infectivity. Briefly, an HeLa cell line (MAGI cells) was obtained by stable transfection with both a human CD4 cDNA and a truncated HIV LTR driving expression of the beta-galactosidase gene. As a result, upon addition of a beta-galactosidase substrate, cells turn blue when the LTR is trans-activated by

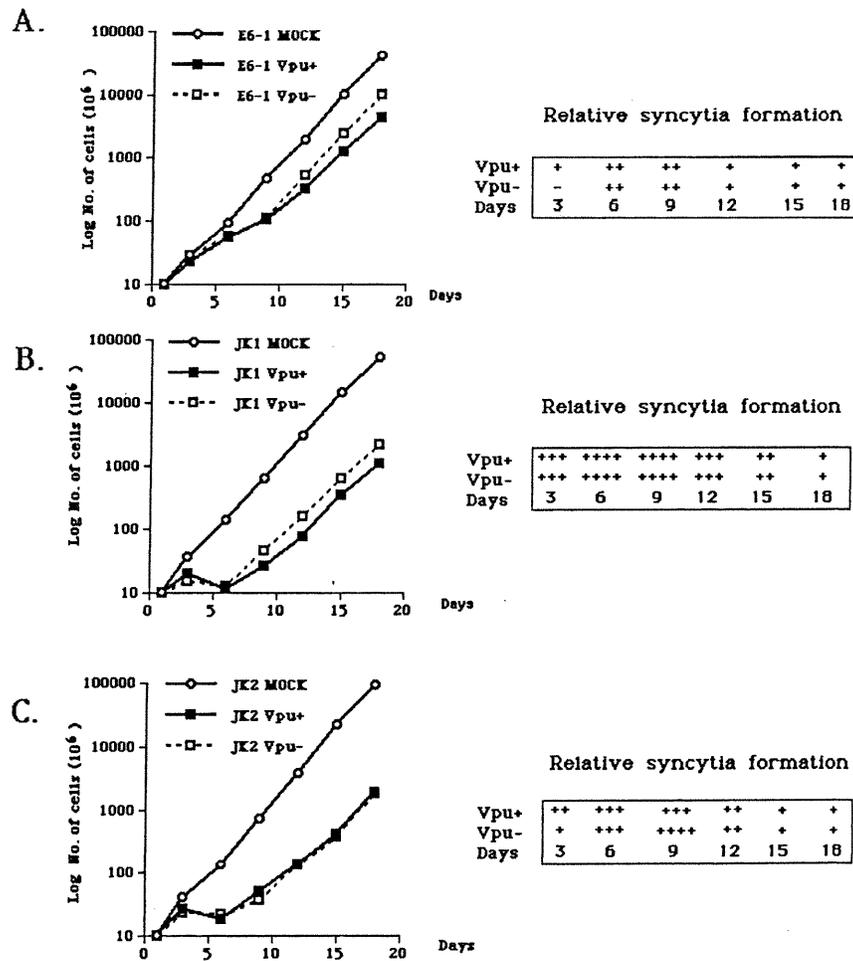


Fig. 1. Kinetic of cell growth in infected Jurkat cells. Cells from the three stocks under study were transfected with either a Vpu-positive proviral construct (HXBH10Vpu+), a Vpu-negative provirus (HXBH10Vpu-), or mock-transfected. Viable cell counts were obtained each 3 days and used to illustrate cell growth over time. Results are presented as the average of two samples and shown on a logarithmic scale. Relative extent of syncytia formation, number and size, was determined by visual inspection under the microscope and is presented in the table next to each graph. Panel A: E6-1 cell clone; panel B: JK1 cell stock; panel C: JK2 cell stock.

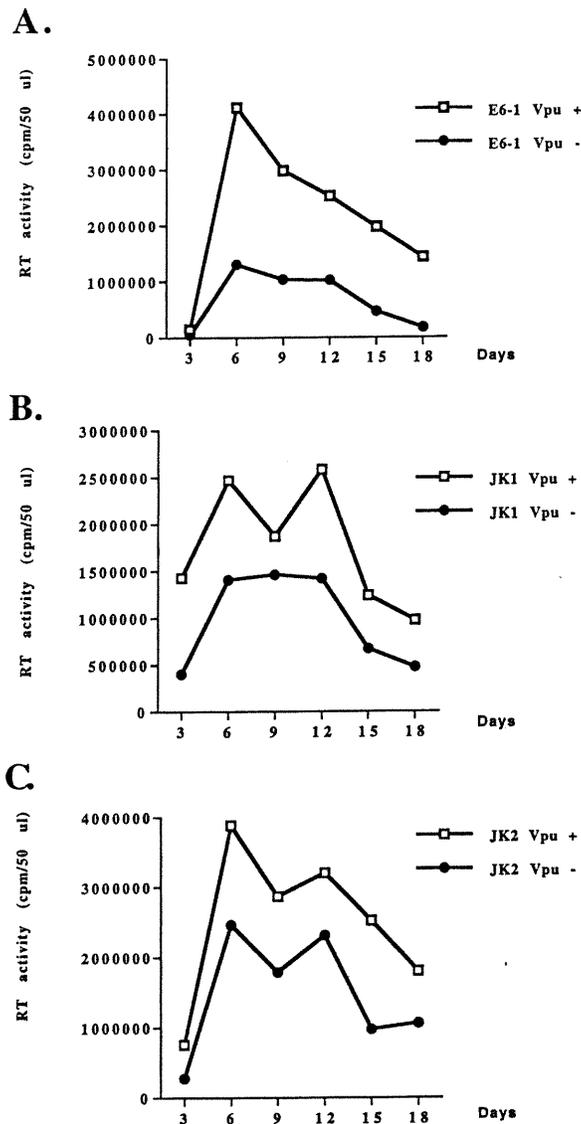


Fig. 2. Kinetic of virus production in Jurkat cells. The same three transfected cell stocks as in Fig. 1 were used to evaluate total virus production by harvesting medium each three days and performing standard reverse transcriptase assay on 50 μ l of culture supernatants. The results are presented as the average of three samples. Panel A: E6-1 cell clone; panel B: JK1 cell stock; panel C: JK2 cell stock.

the Tat protein following HIV infection via CD4. Viruses were recovered from the three Jurkat cell stocks 3 days post-transfection and quantitated by their reverse transcriptase activity. Similar amounts of virus were then applied to the MAGI

cells. The number of positive cells was determined 48 h later. Using this assay, a considerable difference in apparent infectivity was observed between viruses recovered from the three different cell stocks. In fact, the measured infectivity of virus from the JK2 cell stock was close to the background value even though this cell line supported viral propagation. The most infectious viruses were obtained from the JK1 cell stock followed by those from the E6-1 clone (Fig. 3A). In a typical experiment, infecting MAGI cells with the equivalent of 300 000 cpm of reverse transcriptase activity, viruses from JK1 cells were seven-fold more infectious than those released from clone E6-1 (Fig. 3A).

Although virus particles obtained from the JK2 cells were essentially non-infectious on MAGI cells, they were able to propagate in Jurkat cells (Fig. 2) and can also infect the human lymphocytic MT4 cell line (data not shown). Their apparent lack of infectivity in MAGI cells could thus be due to a limitation of the MAGI assay. An infectivity assay based on IG5 cells was used to clarify this point. These IG5 cells are derived from a T-lymphocyte cell line stably transfected with the luciferase gene driven by the HIV-1 long terminal repeat (HIV-LTR) (Aguilar-Cordoba et al., 1994). Similar amounts of viruses from the different Jurkat cell stocks were used to infect IG5 indicator cells. Cells were lysed 48 h after infection and luciferase activity was measured with a Lumat LB9507 luminometer (EG & G Berthold). A difference in infectivity was observed again between viruses released from JK1 and E6-1 cells, although this difference was less striking than when using MAGI cells. However, the lack of infectivity of the virus suspension derived from JK2 cells was not observed on IG5 cells: the infectivity of viruses produced from JK2 cells was comparable to that of viruses released from the E6-1 clone (Fig. 3B). These divergent results might be explained by the fact that Jurkat-derived IG5 indicator cells naturally express the CD4 molecule, which is the principal HIV-1 receptor, while the MAGI cell line was obtained after stable integration of the cloned CD4 gene; however, this point will need to be investigated further before any clear conclusion can be drawn.

An analysis was undertaken next to determine whether the differences observed between the different Jurkat cell stocks could be attributed to differences in the level of CD4 cell surface expression (Watkins et al., 1997). Cells were incubated with monoclonal anti-CD4 antibody, OKT4 (derived from ascitic fluid of Balb/c mice that were injected with the OKT4 hybridoma, Ameri-

can Type Culture Collection, cat # ATCC CRL-8002, Rockville, MD. 20852), followed by fluorescein-conjugated anti-mouse antiserum (Becton Dickinson, cat # 349031). Analysis was carried out with a FACStar cytofluorometer (Becton Dickinson) and revealed that both JK1 and JK2 cells have similar levels of CD4 expressed at their surface, a level that is only slightly lower than the level observed on control MT4 cells (Fig. 4). In contrast, the level of CD4 at the surface of E6-1 cells is reduced at least ten-fold (Fig. 4), even though these cells are still clearly CD4-positive compared to negative control cells. This reduced CD4 expression level in E6-1 could explain reduced syncytia formation and cytopathogenicity of HIV in these cells. It also stresses the fact that cells exhibiting reduced level of CD4 can still support efficient HIV replication.

Considering the involvement of the CXCR4 cell-surface molecule in the formation of syncytia and infection of T-tropic viruses (Feng et al., 1996; Yi et al., 1999), the expression of CXCR4 in these cell clones was also examined by FACS analysis. Cells were incubated with anti-CXCR4 monoclonal antibody (clone 4G10, Dimitrov et al., 1999) followed by fluorescein-conjugated anti-mouse antiserum (Becton Dickinson, cat # 349031). Analysis was carried out with a FACStar cytofluorometer. Results indicated that the level of expression of CXCR4 at the cell surface of the three cell stocks does not vary significantly and is comparable, or even slightly higher, than in control MT4 lymphocytes (Fig. 4).

It can thus be concluded from this study that Jurkat cells stocks can vary significantly in their ability to support various events occurring during HIV multiplication. This suggests that caution should be exerted when examining specific viral properties using this cell line. It still needs to be established if other lymphocytic cell lines also present such variability, but it is likely to be the case. Also, the exact mechanism to explain the apparent lack of infectivity in the MAGI assay of viruses released from the JK2 stock is still unclear. Nevertheless, this study stresses the limitations of the MAGI assay when used as the sole measure of viral infectivity. Finally, comparative studies between cell clones derived from the same

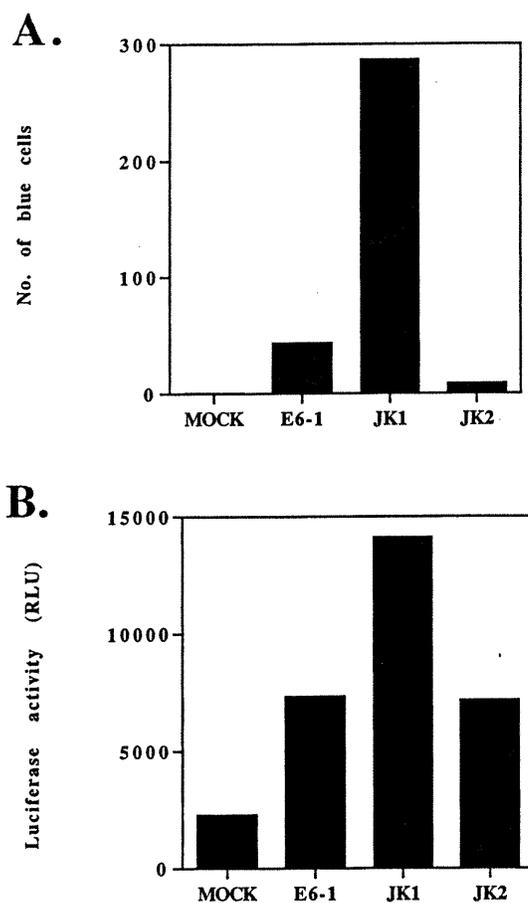


Fig. 3. Infectivity of viruses recovered from infected Jurkat cells. Viruses were recovered from the Jurkat cell stocks 3 days post-transfection. Similar amounts of Vpu+ viruses, as estimated from reverse transcriptase values, were applied onto HeLa-CD4-LTR- β -gal or 1G5 indicator cell lines at various dilutions. Panel A: Calculations were done from petri dishes where positive (blue) cells could be observed and easily counted under the microscope. Values are reported from one representative of four independent experiments. Panel B: 1G5 cells were lysed 48 hours post-infection and luciferase activity was evaluated. RLU, relative light units.

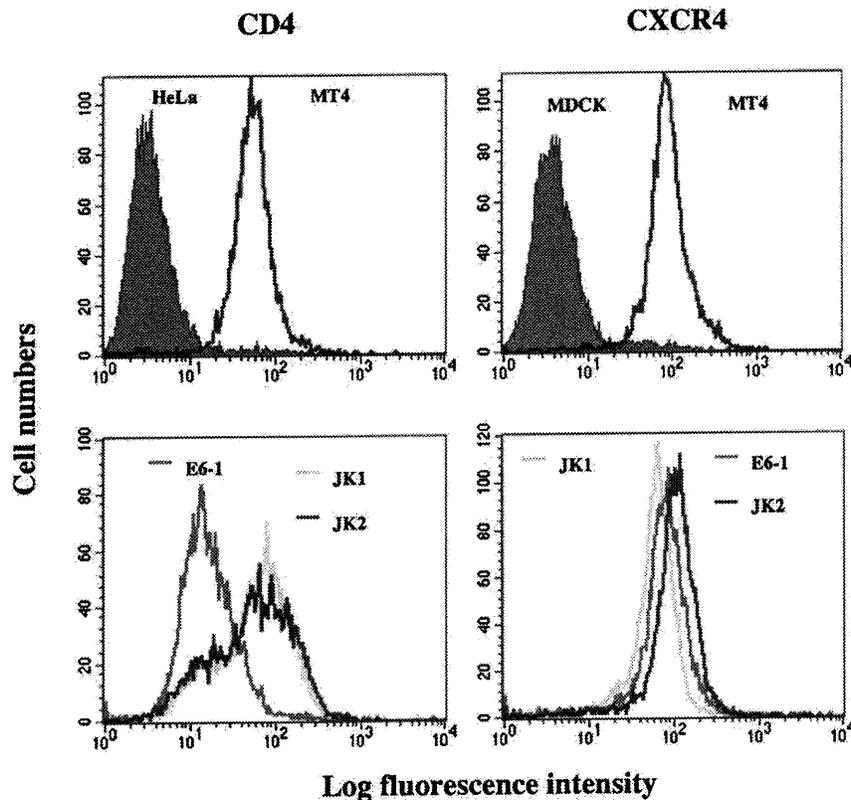


Fig. 4. Analysis of cell surface-expressed CD4 and CXCR4 in Jurkat cells E6-1, JK1 and JK2. Cells were processed for CD4 and CXCR4 detection using a monoclonal anti-CD4 antibody or a monoclonal anti-CXCR4 antibody followed by a second FITC-conjugated anti-mouse antibody. Negative control cell lines (CD4-negative HeLa cells and CXCR4-negative MDCK cells) were similarly processed. Results of fluorescence intensity are expressed on a logarithmic scale, as indicated.

cell lines could provide useful information concerning the cellular factors that influence viral infectivity, cytopathogenicity, and the effect of accessory genes such as Vpu.

Acknowledgements

We thank Christopher C. Broder (Department of Microbiology and Immunology, F. Edward Hebert School of Medicine, Bethesda, MD 20814-4799), for his generous gift of the 4G10 anti CXCR4-antibody. We thank Carole Danis, Johanne Mercier and Nicole Rougeau for expert technical support conducting to smooth operation of the laboratory

and Serge Sénéchal for technical support in FACS analysis. We also thank Andrew Mouland for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada (MRC) and a Fonds pour les Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) group grant (to É.A.C. and G.L.). É.A.C. is the recipient of a MRC Scientist award, G.L. is the recipient of a Chercheur-boursier award from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and G. C.-A. was the recipient of a studentship from the Ministère de l'Éducation du Québec. Finally, we thank Universidad del Norte (Colombia) for continuous financial support of G. C.-A. during his doctoral studies.

References

- Aguilar-Cordoba, E., Chinen, J., Donehower, L., Lewis, D.E., Belmont, J.W., 1994. A sensitive reporter cell line for HIV-1 tat activity, HIV-1 inhibitors, and T cell activation effects. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 295–301.
- Caputo, A., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., 1990. Constitutive expression of HIV-1 Tat protein in human Jurkat cells using a BK virus vector. *J. AIDS* 3, 372–379.
- Dalgleish, A.G., Beverley, P.C.L., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F., Weiss, R.A., 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312, 763–767.
- Deschambeault, J., Lalonde, J.-P., Cervantes-Acosta, G., Lodge, R., Cohen, É.A., Lemay, G., 1999. Polarized human immunodeficiency virus budding in lymphocytes involves a tyrosine-based signal and favors cell-to-cell viral transmission. *J. Virol.* 73, 5010–5017.
- Dimitrov, D.S., Norwood, D., Stantchey, T.S., Feng, Y., Xiao, X., Broder, C.C., 1999. A mechanism of resistance to HIV-1 entry: inefficient interactions of CXCR4 with CD4 and gp120 in macrophages. *Virology* 259, 1–6.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., Berger, E.A., 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G-protein-coupled receptor. *Science* 272, 872–877.
- Gama Sosa, M.A., DeGasperi, R., Fazely, F., Ruprecht, R.M., 1989. Human cell lines stably expressing HIV env and tat gene products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 305–311.
- Geleziunas, R., Bour, S., Wainberg, M.A., 1994. Cell surface down-modulation of CD4 after infection by HIV-1. *FASEB J.* 8, 593–600.
- Kimpton, J., Emerman, M., 1992. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated β -galactosidase gene. *J. Virol.* 66, 2232–2239.
- Lee, M.H., Sano, K., Morales, F.E., Imagawa, D.T., 1987. Sensitive reverse transcriptase assay to detect and quantitate human immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.* 25, 1717–1721.
- Lodge, R., Lalonde, J.-P., Lemay, G., Cohen, É.A., 1997. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO J.* 16, 695–705.
- Perez, V.L., Rowe, T., Justement, J.S., Butera, S.T., June, C.H., Folk, T.M., 1991. An HIV-1-infected T cell clone defective in IL-2 production and Ca²⁺ mobilization after CD3 stimulation. *J. Immunol.* 147, 3145–3148.
- Popovic, M., Read-Connole, E., Gallo, R.C., 1984a. T4 positive human neoplastic cell lines susceptible to and permissive for HTLV-III. *Lancet* 2 (8417-8418), 1472–1473.
- Popovic, M., Sarngadharan, M.G., Read, E., Gallo, R.C., 1984b. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 224, 497–500.
- Sakai, H., Tokunaga, K., Kawamura, M., Adachi, A., 1995. Function of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in various cell types. *J. Gen. Virol.* 76, 2717–2722.
- Stauber, R.H., Rulong, S., Palm, G., Tarasova, N.I., 1999. Direct visualization of HIV-1 entry: mechanisms and role of cell surface receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 695–702.
- Verhasselt, B., Naessens, E., Verhofstede, C., De Smedt, M., Schollen, S., Kerre, T., Vanhecke, D., Plum, J., 1999. Human immunodeficiency virus nef gene expression affects generation and function of human T cells, but not dendritic cells. *Blood* 94, 2809–2818.
- Watkins, B.A., Crowley, R., Davis, A.E., Louie, A.T., Reitz Jr, M.S., 1997. Syncytium formation induced by human immunodeficiency virus type 1 isolates correlates with affinity for CD4. *J. Gen. Virol.* 78, 2513–2522.
- Wendler, I., Jentsch, K.D., Schneider, J., Hunsmann, G., 1987. Efficient replication of HTLV-III and STLV-III_{mac} in human Jurkat cells. *Med. Microbiol. Immunol.* 176, 273–280.
- Yao, X.-J., Göttlinger, H., Haseltine, W.A., Cohen, É.A., 1992. Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J. Virol.* 66, 5119–5126.
- Yao, X.J., Subramanian, R.A., Rougeau, N., Boisvert, F., Bergeron, D., Cohen, É.A., 1995. Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 VPR: role of predicted N-terminal alpha-helical structure of Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J. Virol.* 69, 7032–7044.
- Yi, Y., Isaacs, S.N., Williams, D.A., Frank, I., Schols, D., De Clercq, E., Kolson, D.L., Collman, R.G., 1999. Role of CXCR4 in cell-cell fusion and infection of monocyte-derived macrophages by primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains: two distinct mechanisms of HIV-1 dual tropism. *J. Virol.* 73, 7117–7125.

CHAPITRE 4

**Établissement d'une lignée de cellules MDCK infectables
par le VIH-1.**

AVANT-PROPOS

La lignée cellulaire MDCK est devenue un bon modèle pour analyser le transport et la relâche polarisée de protéines de membrane, ainsi que les mécanismes d'assemblage et de sortie virale. Dans notre laboratoire, nous avons utilisé ces cellules pour étudier le ciblage des protéines du VIH et de la relâche virale. Le fait que ces cellules ne soient pas infectables par le virus représente une restriction lorsque des quantités importantes de virus deviennent nécessaires pour certaines analyses. Le but des travaux décrits dans ce chapitre consistait à établir une lignée de cellules MDCK infectables par le VIH-1. Les essais d'infection ont démontrés que les cellules MDCK supportent une infection productive après la transfection et expression stable du récepteur et du co-récepteur viral, les molécules CD4 et CXCR-4. L'analyse de l'infectivité des virions relâchés à partir des deux domaines cellulaires a révélé une diminution spécifique de l'infectivité des virions récupérés du domaine basolatéral. Les observations réalisées suggèrent un effet dû à la localisation préférentielle du récepteur CD4 au domaine basolatéral. Ce chapitre, tout comme le précédent, porte sur des facteurs cellulaires régulant l'infectivité et pourrait illustrer comment l'incorporation spécifique de protéines cellulaires s'accumulant à certains domaines cellulaires peut moduler l'assemblage, la relâche et/ou l'infectivité virale. Les résultats qui font l'objet de ce chapitre pourraient être complété avec d'autres expériences mentionnées dans la discussion afin de faire l'objet d'une publication.

INTRODUCTION

Bien qu'il soit retrouvé principalement au sein de certains tissus cibles, le VIH est capable d'infecter plusieurs types cellulaires. En général les cellules lymphocytaires CD4+ sont considérées comme les cellules cibles les plus importantes du virus et dans lesquelles la réplication atteint les titres les plus élevés. Outre les lymphocytes T, dans le système hématopoïétique, les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques, entre autres, peuvent être infectées par le VIH (Levy, 1993).

En ce qui concerne les cellules épithéliales, il existe de nombreuses données sur la transmission du VIH à travers des muqueuses intactes et sur l'infection expérimentale (orale ou vaginale) chez le chimpanzé (Araneta et al., 1995; Joag et al., 1997; Miller et Hu, 1999). La présence du VIH a aussi été détectée par différentes méthodes dans des cellules de la muqueuse intestinale (Gill et al. 1992; Heise et al., 1991). D'autre part, l'infection de cellules et tissus dérivés de plusieurs organes comme le thymus, le foie, les reins et les poumons a été décrite (Levy, 1993). Des expériences réalisées *in vitro* avec la lignée cellulaire ME180, dérivée de l'utérus humain, ont démontré que ces cellules peuvent être infectées par le VIH par contact cellule-cellule en utilisant des lymphocytes infectés. Elles seraient, par contre, résistantes à l'infection par du virus libre (Tan et al., 1993). L'utilisation de ces différentes cellules présente aussi des inconvénients reliés, entre autres, à l'obtention d'une polarisation optimale.

La lignée cellulaire MDCK est le modèle de cellules épithéliales le mieux caractérisé (Gaush et al., 1966; Rindler et al., 1979; Simons et Fuller, 1985). Elles sont dérivées d'une tumeur rénale canine et conservent les caractéristiques principales de l'épithélium d'origine (Gaush et al., 1966). Les données de la littérature comportent beaucoup d'information concernant la distribution dans la cellule des protéines de membrane, le ciblage de la sortie de plusieurs virus et le mode d'entrée

de ceux-ci au sein de ces cellules (Rodriguez-Boulan et Sabatini, 1978; Simons, 1987; Matter et Mellman, 1994).

Dans notre laboratoire, les cellules MDCK ont été utilisées depuis plusieurs années avec de très bons résultats pour étudier, entre autres, la distribution des glycoprotéines d'enveloppe de VIH dans la membrane, la polarisation de la sortie virale et l'incorporation des glycoprotéines dans le virion (Lodge et al., 1994; Lodge et al. 1997b). Dans une expérience typique, les cellules sont ensemencées sur un filtre semi-perméable permettant aux cellules de se multiplier jusqu'à former un pseudo-épithélium avec une résistance mesurable en Ωcm^2 . Les cellules arrivent à développer une polarisation de leurs structures et de la distribution des protéines de membrane. Le filtre semi-perméable permet d'avoir accès aux milieux baignant les domaines apical et basolatéral des cellules.

Étant d'origine canine, les cellules MDCK ne sont pas infectables par le VIH-1. Le virus est plutôt produit en utilisant un système d'expression transitoire suite à la transfection de l'ADN proviral dans les cellules. Ceci devient un facteur limitant important lorsque des quantités plus importantes de virus doivent être récupérées.

Le but de ce travail est donc l'établissement d'une lignée de cellules MDCK infectables par le VIH-1 et sa caractérisation préliminaire.

MATERIEL ET MÉTHODES

Plasmides

Le plasmide L-T4-SH contient l'ADNc du récepteur viral, la molécule CD4, sous le contrôle du LTR du MuLV, et le gène codant pour la résistance à l'hygromycine sous le contrôle du promoteur du virus SV40. Ce plasmide a été obtenu du laboratoire du Dr. Michael Emerman (Program in Molecular Medicine, Fred Hutchinson Cancer Research Center, 1124 Columbia Street, Seattle, Washington 98104). Afin d'obtenir un vecteur exprimant le co-récepteur CXCR-4 et le gène

neo comme marqueur de sélection, le fragment HindIII-XhoI de 1.1 Kb du plasmide pcDNA-Fusin (CXCR-4) fut sous-cloné dans le plasmide pcDNA-Neo préalablement digéré avec HindIII-XhoI.

Les clones moléculaires HXBH10-*vpu*+ et HXBH10-*vpu*- qui diffèrent seulement dans leur capacité d'exprimer Vpu ont déjà été décrits (Yao et al., 1992). Les constructions provirales HXBc2 (*vpu*-) et HXBc2Y712S (*vpu*-), contenant la substitution Y712S et dérivée de HXBc2 (*vpu*-), ont été décrites (Fisher et al., 1985; Lodge et al., 1997b). La construction provirale HXBc2Y712S *vpu*+ a été obtenue comme suit: le fragment Sall-BamHI (nucléotide 5331 à 8017; +1 correspondant au site d'initiation de la transcription) obtenu de HXBc2Y712S (*vpu*-), comportant la mutation du ciblage Y712S dans l'enveloppe et le site KpnI, a été sous-cloné dans le vecteur pBR322. Le nouveau site KpnI de pBR322 a été utilisé pour introduire le fragment Sall-KpnI, qui contient le gène *vpu*, à partir de HXBH10-*vpu*+. Le fragment Sall-BamHI fut alors introduit dans la construction provirale HXBc2.

Le provirus pNL4-3 a déjà été décrit (Olivetta et al., 2000). Afin d'obtenir le provirus pNL4-3 qui n'exprime pas la protéine Vpr, le fragment BstZ-Sall récupéré du plasmide BRU 2908 (*vpr* ATG-) et contenant la mutation ATG par ACT dans le gène *vpr* a été cloné dans le provirus pNL4-3.

Cellules

Les lignées cellulaires humaines 293T, HeLa-CD4-LTR- β -gal et la lignée cellulaire épithéliale canine MDCK ont été maintenues dans le milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), complémenté avec 8% de sérum de veau foetal et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine) à 37° C sous une atmosphère de 5% de CO₂.

Production transitoire de virus infectieux

La lignée cellulaire 293T fut transfectée avec les différentes constructions provirales (24 μ g d'ADN proviral pour 5 x 10⁶ cellules) en utilisant la technique de co-précipitation au phosphate de calcium (Yao et

al., 1995). Les surnageants contenant le virus ont été récupérés 48 h post-transfection, aliquotés et conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

Établissement de la lignée MDCK infectable

La lignée cellulaire MDCK fut co-transfectée avec les vecteurs d'expression de CD4 et CXCR-4 (12 µg de chaque plasmide pour 10⁶ cellules) en utilisant la même technique de co-précipitation. Les cellules ont été lavées avec du PBS 24 h post-transfection et maintenues dans du DMEM complété avec sérum et antibiotiques. 48 h post-transfection le milieu a été changé par le milieu de sélection contenant 500 µg/ml de G418 et 250 µg/ml d'hygromycine. Le milieu de sélection a été renouvelé à tous les deux ou trois jours et la mortalité cellulaire a été observée. Les colonies obtenues après 2 semaines ont été récupérées séparément, en utilisant des rondelles en papier Whatman imbibées de trypsine. Les cellules ont été multipliées dans des plateaux de 24 puits, contenant du milieu de sélection, amplifiées et congelées.

Infection de cellules MDCK doublement transfectées

Des préparations virales récupérées de cellules 293T ont été utilisées pour infecter les différents clones de cellules MDCK, doublement transfectées. Les cellules ont été trypsinées, lavées avec du milieu DMEM et remises en suspension dans du milieu contenant des quantités identiques de virus, tel que déterminé par l'activité transcriptase inverse (Lee et al., 1987). Après un contact de 8h à 37°C, les cellules ont été lavées trois fois et remises dans du nouveau milieu. Des échantillons ont été prélevés à tous les trois jours et la quantité de virus relâché a été quantifiée en mesurant l'activité transcriptase inverse ou la présence de la protéine de la capsid p24. Des contrôles positifs et négatifs, ainsi que des contrôles de lavage pour détecter des virus résiduels, ont été testés de la même façon.

Détermination de la relâche virale polarisée.

Le bourgeonnement polarisé des virus a été déterminé en utilisant des techniques déjà décrites, avec quelques modifications (Lodge et al., 1994). Brièvement, 10⁶ cellules en suspension ont étéensemencées sur des filtres semi-perméables (24.5 mm de diamètre) de porosité 1 µm de

diamètre (Falcon No. 3102) avec des quantités déterminées de virus, récupérés de cellules 293T transfectées. Après 8 heures d'incubation, les cellules ont été lavées par addition de PBS de chaque côté de la membrane et maintenues dans du DMEM complété avec sérum et antibiotiques. L'étanchéité de la monocouche fut vérifiée en mesurant la résistance électrique entre les chambres supérieure et inférieure (Millicel-ERS resistance system, Millipore). Les surnageants baignant les domaines apical et basolatéral ont été collectés séparément et la production virale a été quantifiée en mesurant l'activité transcriptase inverse.

Test d'infectivité virale

L'infectivité spécifique des virions récupérés des cotés apical et basolatéral fut mesurée en utilisant l'essai MAGI développé par Kimpton et Emerman (1992). Pour ce faire, l'activité transcriptase inverse a d'abord été mesurée sur des surnageants récupérés des deux côtés de la monocouche cellulaire. Différentes dilutions des surnageants ont été utilisées pour infecter les cellules indicatrices HeLa-CD4-LTR- β -gal. Le nombre de cellules positives (bleues) fut déterminé 48 h post infection par incubation en présence du substrat de la β -galactosidase. Les valeurs d'infectivité relative ont été calculées en divisant le nombre de cellules bleues par l'activité transcriptase inverse inoculée dans chaque puits.

RÉSULTATS

Génération de clones cellulaires MDCK exprimant de façon permanente les molécules CD4 et CXCR-4.

Étant donné que les souches provirales majoritairement utilisées dans le laboratoire sont T-tropiques, le co-récepteur choisi pour être co-exprimé avec CD4 dans les cellules MDCK a été le récepteur de chémokines CXCR-4. Les vecteurs d'expression des deux molécules ont été introduits par transfection simultanée. Le vecteur de CD4 code aussi pour la résistance à l'hygromycine, tandis que celui de CXCR-4 porte la

résistance à la néomycine. Après plusieurs jours d'incubation dans du milieu de sélection contenant Néomycine (G418) et hygromycine, 7 colonies ont été isolées et congelées pour être mieux caractérisées par la suite.

Capacité des différents clones de cellules MDCK à être infectés par le VIH.

Plutôt que de mesurer l'expression des molécules CD4 et CXCR-4 dans les clones isolés, il était plus intéressant de déterminer directement la capacité de ces clones à être infectés par le VIH. Pour ce faire, des virus produits dans des cellules 293T transfectées avec le pro-virus HXBH10 (*vpu+*), ont été utilisés pour infecter chacun des 7 clones isolés. Un virus *Vpu+* a été utilisé afin de s'assurer d'une bonne production virale. Des sept clones testés, 3 ont présenté une production virale clairement supérieure au contrôle négatif tel que mesuré par transcriptase inverse (Fig. 4-1 A). Un de ces 3 clones (clone No.7) a même présenté des effets cytopathiques et une propension à former des syncytias comparable au contrôle positif, soit les cellules HeLa CD4+ (Fig. 4-1). Ces résultats montrent que ce clone est infectable par le VIH et que le virus est capable de se répliquer dans les cellules MDCK, une fois que celles-ci sont transfectées de façon permanente avec le récepteur et co-récepteur viral appropriés.

Détermination de la sortie virale polarisée

Le système de culture sur membranes semi-perméables a été utilisé afin de déterminer si les cellules MDCK infectables étaient capables de former un pseudo-épithélium de cellules polarisées permettant le ciblage du VIH. Deux stocks de virus présentant des phénotypes différents de ciblage ont été préparés dans des cellules 293T par transfection de constructions pro-virales *vpu+*: le premier avec un enveloppe sauvage, et dont le bourgeonnement devrait se faire du côté basolatéral dans des cellules épithéliales polarisées, le deuxième contenant une substitution de la tyrosine par une sérine (Y712S) dans le signal de ciblage basolatéral YXXØ, ce qui permet aux virus de sortir des deux domaines (apical et basolatéral) de la cellule. Les différents stocks viraux ont été utilisés pour infecter des cellules du clone No. 7 ensemencées sur membrane

semi-perméable, tel que décrit dans matériel et méthodes. À partir de trois jours après l'infection, la résistance mesurée sur la monocouche s'est maintenue aux environs de 900 Ω .cm², correspondant ainsi aux données de la littérature (Lodge et al. 1994). Les virus relâchés à partir des domaines apical et basolatéral de la monocouche ont été quantifiés en mesurant l'activité transcriptase inverse dans les surnageants. La quantité de virus détectée dans le milieu récupéré du côté basolatéral des cellules infectées avec le virus sauvage représente environ 80% de la quantité totale de virus détectée. Par contre, l'activité transcriptase inverse a été similaire dans les milieux apical et basolatéral des cellules infectées avec le virus mutant (Fig. 4-2). Ces résultats montrent que les cellules MDCK infectables par le VIH, non seulement conservent leur capacité à établir une monocouche polarisée, mais que le virus produit est assemblé et relâché préférentiellement au domaine basolatéral via le signal YXXØ comme chez les cellules transfectées.

Analyse de l'infectivité des virus relâchés par les cellules MDCK infectables.

L'infectivité des virus produits par les cellules MDCK infectées a ensuite été examinée. Des virus Vpu+, contenant le signal de polarisation intact et produits par transfection dans des cellules 293T, ont été utilisés pour infecter des cellules MDCK sur membrane semi-perméable. Les virus collectés séparément des milieux apical et basolatéral ont été soumis à un essai MAGI pour mesurer leur infectivité tel que décrit dans matériel et méthodes. Dans cette expérience, une diminution de plus de six fois de l'infectivité des virions récupérés du domaine basolatéral par rapport à ceux récupérés du domaine apical a été observée (Fig. 4-3). Afin d'examiner si cette réduction pourrait être due à la concentration de CD4 à la surface basolatérale des cellules, l'infectivité des virions qui expriment Vpu et Nef a été testée puisque ces deux protéines sont capables d'augmenter l'infectivité virale par réduction de la quantité de CD4 exprimée à la surface des cellules infectées. Une infectivité similaire des virus apicaux et basolatéraux avec le virus Vpu+ Nef+ a été retrouvée, tandis que dans les cellules infectées avec le virus Vpu- Nef -, une diminution de plus de 5 fois de l'infectivité des virions sortant du côté basolatéral est toujours observée (Fig. 4-4).

Fig. 4-1. Capacité des différents clones de cellules MDCK à être infectés par le VIH. Des préparations virales (Nef-Vpu+) récupérées de cellules 293T ont été utilisées pour infecter les différents clones de cellules MDCK, doublement transfectées. Le surnageant a été prélevé trois jours post-transfection et la quantité de virus relâché a été quantifiée en mesurant l'activité transcriptase inverse (A). Dans une expérience similaire, des échantillons ont été prélevés à tous les trois jours et la quantité de virus relâché a été quantifiée en mesurant la protéine p24 (B).

Fig. 4-2. Détermination de la relâche virale polarisée. 10^6 cellules MDCK doublement transfectées ont étéensemencées sur des filtres semi-perméables et infectées avec des préparations virales (Nef-Vpu+) récupérées de cellules 293T transfectées. L'étanchéité de la monocouche fut vérifiée en mesurant la résistance électrique entre les chambres supérieure et inférieure. Les surnageants baignant les domaines apical et basolatéral ont été collectés séparément et la production virale a été quantifiée en mesurant l'activité transcriptase inverse (RT). Les valeurs présentés sont le résultat d'une expérience représentative de trois expériences différentes. WT: virus présentant la glycoprotéine d'enveloppe de type sauvage; Y712S: mutant du signal de ciblage de la glycoprotéine d'enveloppe.

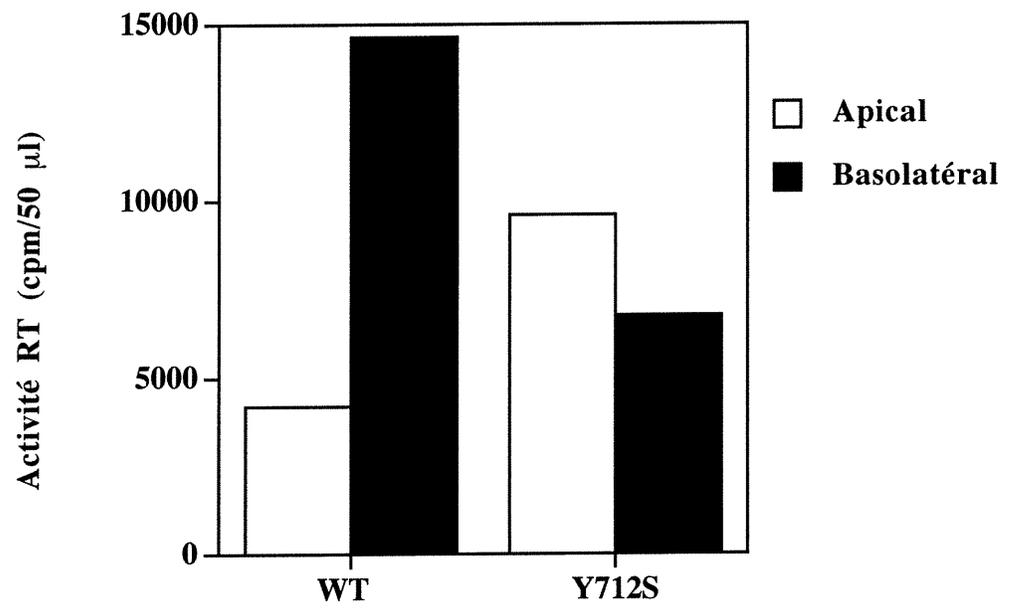


Fig. 4-3. Potentiels infectieux des virus relâchés par les cellules MDCK infectables. Différentes dilutions des surnageants récupérés des deux côtés de la monocouche de cellules MDCK infectées par le virus Nef- Vpu+ portant l'enveloppe de type sauvage et dont l'activité transcriptase inverse a été mesurée, ont été utilisées pour infecter les cellules indicatrices HeLa-CD4-LTR- β -gal. Le nombre de cellules positives fut déterminé 48 h post-infection par incubation en présence du substrat de la β -galactosidase. Les valeurs d'infectivité relative ont été calculées en divisant le nombre de cellules bleues par l'activité transcriptase inverse inoculée dans chaque puits. Les résultats sont présentés comme la moyenne de deux échantillons dans une expérience représentative de quatre expériences différentes.

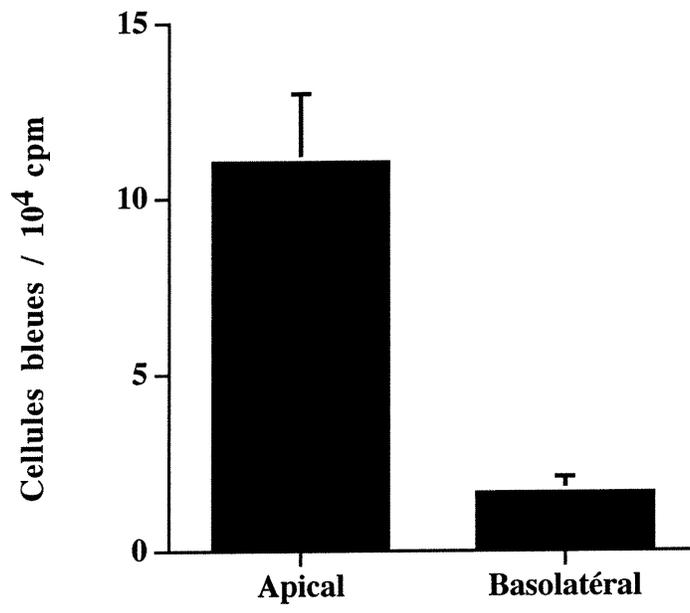
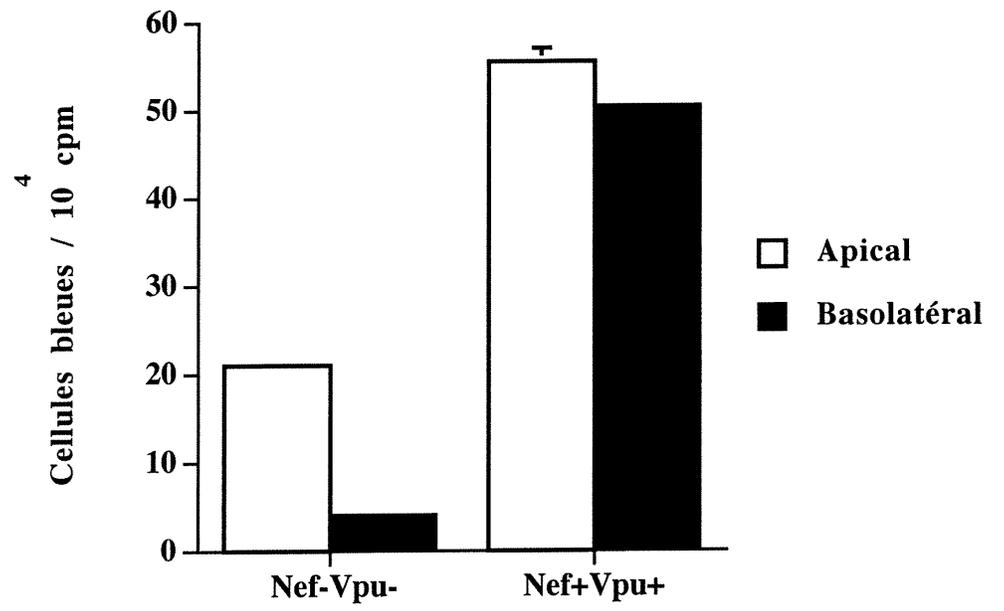


Fig. 4-4. Effet de Nef et Vpu sur l'infectivité des virus relâchés par les cellules MDCK infectables. L'infectivité de virus isogéniques défectifs ou non pour les protéines accessoires Nef et Vpu a été mesurée tel que décrit à la figure 4-3. Les résultats sont présentés comme la moyenne de deux échantillons dans une expérience représentative de trois expériences différentes.



DISCUSSION

Les cellules MDCK ont été utilisées pendant des années comme modèle pour l'étude de la polarisation du transport des glycoprotéines du VIH et l'observation du bourgeonnement viral polarisé (Lodge et al. 1994; Lodge et al., 1997b). L'impossibilité d'infecter ces cellules d'origine non-humaine représente un facteur limitant important pour leur utilisation dans des expériences qui requièrent des quantités importantes de virus.

Une lignée de cellules MDCK infectables par le VIH a donc été établie par co-transfection des récepteur et co-récepteur du virus. La protéine CD4 est reconnue comme le principal récepteur pour le VIH. Cependant, la présence d'un co-récepteur sur la cellule cible est également essentielle au processus d'infection. Des expériences effectuées sur des cellules de souris avaient déjà démontré que l'expression du récepteur principal, la molécule CD4, n'était pas suffisante et qu'une autre molécule normalement exprimée dans les lymphocytes T pourrait être requise (Maddon et al., 1986). Plusieurs études ont identifié les récepteurs de β -chémokines comme les principaux co-récepteurs pour les isolats viraux T-tropiques (CXCR-4) et macrophage-tropiques (CCR-5). Étant donné que les virus utilisés dans le laboratoire sont des souches T-tropiques, le co-récepteur choisi a été la molécule CXCR-4. Les expériences d'infection des cellules MDCK ont montré que la transfection permanente de ces cellules avec le récepteur et le co-récepteur viral est suffisante pour avoir une infection productive. Ceci contraste avec le situation chez la souris où de nombreux facteurs préviennent l'établissement d'une infection productive même si le virus peut pénétrer ces cellules lorsqu'elles expriment CD4 et CXCR-4.

L'incorporation des protéines de l'hôte dans la particule virale est un phénomène qui reflète possiblement une interaction entre protéines virales et protéines de l'hôte (Arthur et al., 1992; Ott et al., 1996; Cantin et al., 1997). Étant donné la distribution asymétrique des protéines chez les cellules polarisées, ces interactions pourraient déterminer l'incorporation des protéines cellulaires d'une façon spécifique, c'est-à-

dire que la composition des virions en protéines de l'hôte peut dépendre du site de bourgeonnement viral. Le fait d'avoir une lignée de cellules épithéliales polarisées infectables par le VIH pourrait permettre, dans le futur de récupérer des quantités considérables de virus à partir des milieux baignant les deux domaines membranaires pour déterminer leur composition en protéines cellulaires, par exemple.

Dans les expériences d'infection réalisées, des quantités importantes de virions ont été récupérées des surnageants. Pourtant, quand la quantité de virus produite est particulièrement grande, une relâche considérable est observée du côté apical pour le virus sauvage. Ce comportement pourrait être dû à une saturation dans les mécanismes de transport, qui occasionnerait une sortie virale « par défaut ». Ce phénomène avait déjà été décrit dans la littérature dans d'autres types de cellules épithéliales infectées par le VIH contenant l'enveloppe sauvage (Tan et al., 1993).

La quantité de virus relâchés des cellules MDCK infectables nous a permis d'examiner l'infectivité des virus sortant des deux domaines cellulaires en utilisant l'essai MAGI. Cet essai est devenu le test biologique standard pour déterminer l'infectivité du VIH. Les essais ont démontré une diminution de l'infectivité des virions ciblés vers le domaine basolatéral. Cette diminution n'est plus observée lors de l'infection par des virus Vpu+ Nef+, suggérant un effet dû à la localisation préférentielle et concentration du récepteur CD4 sur le domaine basolatéral ou, alternativement, une incorporation plus efficace au virion à cette surface membranaire. Il a été rapporté que le CD4 réduit l'infectivité du VIH en bloquant l'incorporation d'Env dans les virions au niveau de la surface cellulaire. Cet effet est inhibé grâce à la modulation négative de CD4 par l'action combinée de Nef et Vpu (Lama et al., 1999). D'autre part, la polarisation basolatérale de la molécule CD4 avait été rapportée dans des cellules épithéliales de colon; nos résultats suggèrent qu'il en est de même lorsque la molécule est exprimée dans les cellules MDCK. Ceci est bien en accord avec l'idée que les cellules MDCK reproduisent les phénotypes de ciblage observés in vivo (Rabenandrasana et al., 1990).

Bien que les résultats obtenus méritent des analyses plus approfondies, ces premières observations suggèrent qu'il existe une modulation négative de l'infectivité par CD4 qui est spécifique pour les virions assemblés au domaine basolatéral de la membrane plasmique. Afin de confirmer cette observation, des virions qui expriment ou non les protéines accessoires Vpu et Nef pourraient être récupérés de cellules MDCK infectées et testés pour l'incorporation de CD4 en utilisant des techniques de Western blot. La quantité relative incorporée par chaque virus serait déterminée en calculant le ratio entre les quantités de CD4 et celles de la protéine de la capsid, p24, mesurées par densitométrie. Enfin, il resterait à déterminer si le ciblage de CD4 est basolatéral dans différents types de cellules épithéliales ou si les signaux qui pourraient être présents dans CD4 sont interprétés d'une façon différente dans chaque cellule en particulier.

L'incorporation différentielle de CD4 selon le domaine membranaire d'assemblage du virus, et les conséquences sur l'infectivité qui en découlent, serait ainsi un premier exemple illustrant l'influence du site d'assemblage sur l'incorporation des protéines cellulaires au virion. Il s'agit aussi d'un exemple additionnel de l'importance potentielle de l'incorporation de protéines cellulaires dans la modulation de l'infectivité virale. La lignée de cellules MDCK infectables pourrait permettre d'analyser l'importance d'autres protéines dans ce contexte.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Une interaction fonctionnelle entre la protéine accessoire Vpu et le signal de polarisation/endocytose, YXXL, situé dans la queue intracytoplasmique de la gp41 a été démontrée au cours du présent travail. Cette interaction est indiquée par une augmentation de l'infectivité des virus qui combinent le mutant du signal de polarisation (Y7121S) avec la présence de Vpu. L'augmentation de l'infectivité est associée à une incorporation plus importante des glycoprotéines d'enveloppe dans la particule virale. Ces résultats sont consistants avec les observations démontrant que la substitution d'un résidu de tyrosine très conservé dans la région cytoplasmique de la protéine transmembranaire du VIS entraîne une augmentation des glycoprotéines d'enveloppe au niveau de la surface des cellules infectées et de l'incorporation au virion (LaBranche et al., 1994; LaBranche et al., 1995). Par contre, le motif YXXL est requis pour l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe du virus de la leucémie bovine (Inabe et al., 1999), l'effet de ce signal pourrait donc être très complexe.

La conservation du signal de polarisation/endocytose par le virus serait importante puisque le signal serait lié à la réduction de la reconnaissance par le système immunitaire et il serait également impliqué dans la pathogénèse virale du bourgeonnement viral polarisé. Il a été proposé qu'un tel bourgeonnement favoriserait la transmission virale vers les cellules lymphoïdes localisées sous la muqueuse urogénitale (Tan et al., 1993). D'autre part, il a été démontré que le motif de ciblage favorise la transmission cellule-cellule *in vitro* chez le VIH et le HTLV-1 (Deschambeault et al., 1999; Delamarre et al., 1999). Plus récemment, il a été démontré que la mutation de la tyrosine dans la région cytoplasmique de la glycoprotéine d'enveloppe du VIS réduit considérablement l'apparition de la maladie chez les macaques infectés expérimentalement. Des mutations ou élimination de la tyrosine hautement conservée faisant partie du motif YXXØ (acides aminés YRPV dans les positions 721 à 724) dans l'enveloppe du SIVmac239

n'ont pas empêché la multiplication du virus dans des cellules CEMx174 et dans des PBMC de macaques mais la réplication *in vivo* a été affectée. L'absence de maladie a été associée avec un très bas niveau de la charge virale et le maintien du nombre des cellules CD4 et des plaquettes. Des analyses de séquences ont révélé une réversion du mutant Y721I vers la tyrosine originelle chez un animal qui avait développé la maladie et qui avait des symptômes similaires à ceux développés par les macaques inoculés avec le virus contrôle. De plus, le seul animal qui avait développé la maladie après inoculation avec un virus contenant une délétion de la tyrosine du signal de polarisation/endocytose présentait des mutations additionnelles dans la glycoprotéine transmembranaire d'enveloppe, mutations qui ont été interprétées comme étant compensatoires. Ces observations confirment que le motif YXXØ est un déterminant crucial de la réplication virale *in vivo* et qui joue donc un rôle important dans la pathogénèse rétrovirale (Fultz et al., 2001).

En ce qui concerne Vpu, les essais réalisés montrent que les déterminants de la protéine qui pourraient avoir un synergisme avec le mutant de polarisation pour influencer l'infectivité virale sont ceux qui modulent la relâche virale et qui sont situés au niveau transmembranaire de la protéine et non ceux impliqués dans la dégradation de CD4. Cette dernière observation est également consistante avec les résultats obtenus par comparaison entre les cellules HeLa CD4+ et HeLa CD4-, permettant de conclure que l'effet différentiel de Vpu est indépendant de la présence de CD4. Les résultats suggèrent donc que la queue intracytoplasmique de la gp41 est la cible des interactions fonctionnelles avec la protéine virale Vpu. Les autres protéines testées, Nef et Vif, n'ont pas démontré d'interaction fonctionnelle avec le signal de polarisation dans les conditions testées. Des données récentes démontrent toutefois que la queue intracytoplasmique de la gp41 peut être la cible d'un mutant naturel de la protéine Nef du VIH-1. L'expression *in vitro* de cet allèle de Nef est capable d'inhiber complètement la réplication d'un clone du VIH (NL4-3). Des expériences de co-transfection du vecteur d'expression du mutant de Nef avec plusieurs ADN pro-viraux contenant différentes délétions au niveau de la glycoprotéine d'enveloppe ont été réalisées dans des cellules 293 CD4+. La mesure de la production virale

a indiqué que la région intracytoplasmique de la gp41 était requise pour l'inhibition virale induite par le mutant naturel de Nef, proposant en conséquence cette région de la protéine gp41 comme une importante cible virale (Olivetta et al., 2000). Ceci s'ajoute aux interactions spécifiques bien documentées existant entre la même région de gp41 et les protéines cellulaires appartenants au complexe d'adaptines (Boge et al., 1998; Berlioz-Torrent et al., 1999; Wyss et al., 2001). Ces observations montrent qu'en plus des interactions déjà rapportées avec la matrice virale, la région intracytoplasmique de gp41 peut avoir des interactions, à tout le moins fonctionnelles, avec d'autres protéines virales comme les protéines accessoires Nef et Vpu. Une complémentation entre la protéine d'enveloppe et Vpu a aussi été démontrée chez les VIH-2: l'enveloppe de VIH-2 est en effet capable de réguler de façon positive la relâche virale du VIH-2, VIH-1, et du virus de l'immunodéficience simienne (VIS) (Bour et al., 1996; Bour et Strebel, 1996). Ces observations démontrent que la glycoprotéine d'enveloppe exerce des fonctions autres que celles normalement attribuées à cette protéine. Quand on fait les essais d'infectivité en absence de la protéine virale Vpu, on ne voit aucune influence du signal de polarisation sur l'infectivité virale. Ces résultats sont consistants avec ceux obtenus précédemment en utilisant des constructions pro-virales défectives pour les protéines virales Nef et Vpu (Lodge et al., 1997; Deschambeault, et al., 1999).

Les résultats présentés dans cette première partie du travail sont potentiellement importants pour des recherches futures visant à déterminer l'implication des protéines accessoires en général, et de la protéine Vpu en particulier, dans la pathologie du VIH-1. Ces résultats sont aussi pertinents dans le contexte d'études éventuelles portant sur les interactions des glycoprotéines d'enveloppe avec les protéines accessoires.

Finalement, un modèle récapitulatif pourrait être suggéré basé sur l'ensemble des observations réalisées. Si le ratio entre la protéine Gag et les protéines d'enveloppe portant un signal de polarisation/endocytose est altéré dû à une surexpression de l'enveloppe, le mécanisme

d'endocytose va enlever de la surface cellulaire les glycoprotéines qui sont en excès. Dans une telle situation, l'enveloppe incorporée au virion serait seulement celle qui est associée avec Gag. Une fois l'interaction Gag-Env établie, les fonctions de Vpu reliées à la morphogénèse et la relâche auraient moins d'impact sur l'incorporation des glycoprotéines dans les nouveaux virions. Dans le deuxième scénario, la présence du mutant sur le signal de polarisation/endocytose augmente la quantité d'enveloppe exprimée à la surface de la cellule. Dans ces conditions la présence de Vpu favoriserait une utilisation efficace des protéines disponibles pour la formation et une relâche rapide des nouveaux virions. Une incorporation augmentée des glycoprotéines d'enveloppe pourrait assurer une augmentation de l'infectivité dans ce cas.

Beaucoup des effets cytopathiques observés chez la cellule hôte pendant une infection virale sont dus à des altérations du métabolisme ou structure de la cellule qui vont faciliter les divers événements survenant durant la réplication virale. Ces effets ne sont pas toujours dus à de simples effets toxiques des protéines virales mais à des effets secondaires des virus, effets reliés à leur mécanisme de réplication. De plus, l'habilité des virus à se répliquer dans les cellules de l'hôte peut être déterminée par la disposition de macromolécules spécifiques au sein de celles-ci. Ces molécules sont de localisation externe, comme les récepteurs, ou internes, comme les facteurs de transcription ou réplication. Tous ces éléments sont déterminants pour le développement de l'infection productive et pour l'apparition du phénotype de certaines protéines virales. Une différence importante dans les effets cytopathiques lors de l'infection par le VIH a été retrouvée chez trois clones différents de cellules Jurkat. La formation de syncytia et la mortalité cellulaire ont été les événements qui ont mieux distingué le comportement des différents clones envers l'infection virale. Ces observations ont été reliées à une différence d'expression de la molécule CD4 au niveau de la surface cellulaire. Le récepteur pour le VIH, la protéine CD4, est considéré, avec CXCR-4, comme étant une des composantes cellulaires importantes pour l'induction de la formation de syncytia par le VIH (Watkins et al., 1997; Fortin et al., 1999). Le niveau d'expression de ces récepteurs chez différentes cellules serait donc un déterminant cellulaire

important pour la cytopathogénicité virale. L'effet de la protéine accessoire Vpu sur la relâche virale a été aussi exprimé d'une manière différente chez les trois clones analysés, suggérant une dépendance de cette fonction de Vpu pour des déterminants cellulaires qui sont exprimés de façon différente chez chaque clone. Ce phénotype de Vpu avait en fait déjà été rapporté comme étant dépendant du type cellulaire (Sakai et al., 1995); il apparaît ici que cette différence puisse même exister au sein de clones des mêmes cellules. D'autre part, des aspects reliés à la cellule, comme son état de prolifération, sont déterminants pour l'expression de cette activité de Vpu (Deora et al., 2001). La différence d'infectivité retrouvée chez les virions récupérés de chaque clone montrent que les trois stocks cellulaires, non seulement diffèrent dans les effets que le virus peut exercer sur eux, mais dans les caractéristiques des virus qu'ils produisent. Cette dernière observation pourrait être reliée à divers facteurs cellulaires influençant la capacité infectieuse des virus produits. Une spécificité cellulaire similaire, bien documentée, a été décrite pour la protéine accessoire Vif qui est capable de compenser la fonction de facteurs cellulaires requis pour la production de particules virales infectieuses, facteurs qui sont absents dans plusieurs lignées cellulaires (Gabuzda et al., 1992). Indépendamment de Vif, certains facteurs cellulaires seraient déterminants pour la « qualité » des virus sortant des différents clones et pourraient influencer des caractéristiques du virus telles que l'infectivité et la cytopathogénicité. Les résultats présentés dans cette thèse ne permettent cependant pas de déterminer la nature de ces facteurs. Par analogie, des études d'infection de macrophages isolés de jumeaux comparativement à ceux isolés de donneurs non-reliés suggèrent un effet sélectif exercé par la cellule sur le virus. Ces effets seraient dûs à des interactions protéine-protéine survenant à différentes étapes du cycle de réplication viral (Cunningham et al., 2000). Finalement, des C-C chémokines, l'IL-16 et des facteurs avec activité antivirale peuvent être plus élevés dans des clones cellulaires provenant d'individus présentant une infection non-progressive (Scala et al., 1997); comme dans l'étude précédente, la nature de ces facteurs n'a toutefois pas été clairement établie.

L'objectif visé dans la dernière partie du projet était d'établir une lignée de cellules MDCK infectables par le VIH. Cet objectif se justifiait premièrement par l'intérêt d'étudier l'infection dans cette lignée épithéliale bien caractérisée et différenciée *in vitro*; de plus, une procédure d'infection permet, contrairement à l'introduction d'ADN, d'avoir une population où toutes les cellules produisent du virus. Finalement, on peut s'attendre à des niveaux plus élevés de production virale permettant ainsi de répondre à certaines questions, par le biais d'expériences impossibles à réaliser autrement. Ces objectifs ont été atteints par transfection de la lignée cellulaire MDCK avec des vecteurs d'expression pour les récepteurs viraux, les protéines cellulaires CD4 et CXCR-4. Le choix du récepteur de chémokines CXCR-4 comme co-récepteur viral était de pouvoir éventuellement infecter les cellules avec les nombreuses souches virales majoritairement T tropiques existantes dans le laboratoire. Les cellules transfectées ont été capables de supporter une infection productive avec différents virus produits dans le laboratoire. De plus, la formation de syncytia dépendante de l'enveloppe virale a été observée. Ces deux événements indiquent que les deux molécules, CD4 et CXCR-4, sont biologiquement actives dans les cellules transfectées.

Il n'y a pas beaucoup d'exemples dans la littérature de cellules non-humaines où la co-expression de CD4 et du co-récepteur viral est suffisante pour permettre une infection productive. Bien qu'il existe des rapports indiquant que la co-expression de ces deux molécules rend les cellules permissives à la fusion dépendante de l'enveloppe virale (Berson et al., 1996; Feng et al., 1996), les données concernant l'infection virale productive sont plutôt rares. Le meilleur système développé jusqu'à maintenant est celui des cellules de vison (Mv 1 Lu) qui, après transfection avec CD4 et CXCR-4, sont capables de former des syncytia et de supporter une multiplication virale normale. Les approches utilisés n'ont toutefois pas permis de produire des quantités importantes de virus ni de mesurer l'infectivité de ceux-ci dans un autre système (Feng et al., 1996). Les cellules non-humaines les plus utilisées pour l'établissement de systèmes cellulaires infectables par le VIH sont les cellules dérivées de rongeurs en utilisant le récepteur principal CD4 co-transfecté avec la

molécule CXCR-4 ou la molécule CCR-5. Ces essais permettent l'entrée virale dans des cellules murines sans toutefois aboutir à une infection virale productive (Tachibana et al., 1997; Berger et al. 1999). Alternativement on observe une production virale ponctuelle sans véritable cinétique de réplication dans des cellules de lapin infectées (Speck et al., 1998). *In vivo*, les modèles de souris et lapins transgéniques ont supporté seulement de très bas niveaux de réplication (Browning et al., 1997; Dunn et al., 1995). L'établissement d'une infection productive chez les cellules de souris, même si celles-ci expriment CD4 et CXCR-4/CCR-5, est bloqué à différentes étapes de la réplication virale (Bieniasz et Cullen, 2000). En plus du blocage dans l'interaction virus-cellule, le cycle de réplication est ralenti au niveau de la transcription, due à un défaut d'association de la cycline T1 murine avec Tat empêchant ainsi la transactivation nécessaire à l'expression des gènes viraux (Hart et al., 1989; Newstein et al., 1990). L'expression de la cycline T1 humaine avec les récepteurs viraux a cependant démontré qu'un blocage additionnel se retrouve lors de l'assemblage et de la relâche virale (Mariani et al., 2000). Des expériences récentes utilisant des hétérokaryons murin-humain ont permis de réconcilier l'ensemble des observations en suggérant fortement que des co-facteurs spécifiques de l'hôte sont requis par les protéines virales pour permettre les interactions nécessaires aux fonctions d'assemblage et de relâche virale. La fusion de cellules humaines aux cellules murines infectées pourraient compléter pour l'absence des co-facteurs nécessaires à l'assemblage chez les cellules murins (Mariani et al., 2001). Le fait d'avoir une infection productive après la transfection permanente des cellules MDCK avec le récepteur et le co-récepteur viral démontre la capacité de ces cellules à supporter les différentes étapes de la réplication, c'est-à-dire, l'entrée virale, la transcription et l'expression des gènes viraux, l'assemblage et la relâche virale. Ces propriétés des cellules MDCK, en plus de les rendre attrayantes pour l'étude de l'infection par le VIH dans le contexte de cellules polarisées, pourrait faire penser à l'espèce canine comme un modèle animal potentiel pour l'infection par le VIH .

Les essais de production virale à partir de ces cellules MDCK infectables ont permis d'obtenir des quantités importantes de virus qui

devraient permettre la réalisation de plusieurs expériences nécessitant beaucoup de matériel viral. Une expérience typique, entre autres, serait la détermination de la composition en protéines cellulaires des virions récupérés des deux domaines membranaires.

La capacité des cellules à former une monocouche de cellules polarisées a aussi été analysée. Les données obtenues permettent de conclure que ces cellules sont toujours capables de former un pseudo-épithélium étanche possédant une résistance électrique compatible avec les données existants dans la littérature (Lodge et al., 1994; Lodge et al., 1997b). De plus, la majeure partie du virus produit dans ces cellules s'assemble au domaine basolatéral confirmant le ciblage observé chez les cellules MDCK transfectées. Par contre, un mécanisme de sortie « par défaut » a été observé quand des quantités particulièrement importantes de virus sont produites. Ce phénomène a été interprété comme le résultat d'une saturation de la voie de transport vers la membrane basolatérale mais demeure à confirmer.

L'infection des cellules épithéliales par des virus demeure un des meilleurs systèmes pour l'étude des mécanismes impliqués dans le ciblage des protéines de membrane. L'établissement d'une lignée de cellules MDCK qui, en plus de conserver les caractéristiques de cellules polarisées, sont infectables par le VIH, pourrait permettre de poursuivre des recherches dans ce domaine. Un aspect important serait d'identifier la localisation du co-récepteur CXCR-4 au niveau de la membrane plasmique. L'expression des deux molécules CD4 et CXCR-4 à la surface cellulaire pourrait aussi permettre d'étudier l'influence de celles-ci et/ou les interactions fonctionnelles avec les protéines virales dans le contexte d'une infection de cellules polarisées. Les quantités considérables de virus produites ont déjà permis de déterminer l'infectivité spécifique des virus sortant des deux domaines membranaires. Bien que des expériences additionnelles soient requises, les résultats préliminaires indiquent une diminution d'infectivité des virus relâchés du côté basolatéral, ce qui peut être interprété comme une évidence indirecte d'un ciblage basolatéral du récepteur CD4. Si cette observation est confirmée, elle suggère une modulation spécifique de la molécule CD4 sur l'infectivité

des virions assemblés du côté basolatéral de la membrane. Des expériences visant à poursuivre ces travaux ont déjà été proposées au chapitre 4. Il serait certainement intéressant d'examiner d'autres protéines cellulaires d'une manière similaire.

En ce qui concerne Nef et Vpu, le fait que ces deux protéines virales inhibent l'effet de réduction de l'infectivité sur les virus relâchés du côté basolatéral de la membrane plasmique, démontre qu'une activité de ces protéines accessoires peut dépendre du site d'assemblage du virus. À notre connaissance il s'agit du premier exemple d'un tel phénomène observé chez les protéines du VIH. Il reste toutefois à établir si cette « polarisation » de l'effet de ces deux protéines est contrôlée par des signaux qui interagissent avec le mécanisme de transport cellulaire. Finalement, la régulation négative de CD4 par la protéine Nef au sein des cellules MDCK est consistante avec le concept que cette fonction de Nef ne dépend ni de l'espèce ni du type cellulaire (Garcia et al., 1993).

L'ensemble des travaux présentés dans cette ouvrage a permis de mettre en relief la grande importance des facteurs cellulaires et viraux sur la biologie du VIH dans le contexte de leur localisation intracellulaire. D'autre part, il faut aussi souligner l'importance de l'établissement des cellules MDCK infectables par le VIH qui devrait permettre la poursuite des études plus approfondies de la biogénèse des particules virales dans le contexte de cellules polarisées.

CONTRIBUTIONS MAJEURES

En résumé, les contributions majeures de ce travail de recherche ont été les suivantes:

1.- Identification d'une interaction de type fonctionnelle entre la protéine accessoire Vpu et le signal de polarisation/endocytose de la glycoprotéine gp 41 du VIH-1.

2.- Démonstration que des clones de cellules lymphocytaires humaines dérivés de la même lignée cellulaire peuvent varier de façon considérable dans leur capacité d'établir une infection productive et cytotytique par le VIH-1.

3.- Génération d'une lignée de cellules MDCK capables d'avoir une infection productive par le VIH par co-transfection et expression stable des récepteur et co-récepteur du virus les molécules de surface CD4 et CXCR-4.

4.- Observation d'une infectivité réduite des virions de la surface basolatérale des cellules MDCK infectables; ce phénomène est aboli par la présence simultanée des protéines Vpu et Nef.

Publication comme coauteur

En plus des articles apparaissant dans les chapitres 2 et 3, j'ai participé à un autre projet qui a résulté en une publication où j'apparaîs comme coauteur. Ma contribution dans ce projet est reliée aux expériences d'infection de PBMC humains, c'est-à-dire, production de virus infectieux, titrage, infection des PBMC et contrôle du développement de l'infection. La publication « Polarized Human Immunodeficiency Virus Budding in Lymphocytes Involves a Tyrosine-Based signal and Favors Cell-to-Cell Viral Transmission » est parue

dans la revue Journal of Virology (Deschambeault, J., J.-P. Lalonde, **G. Cervantes-Acosta**, R. Lodge, É. A. Cohen et G. Lemay. 1999. J. Virol. **73**: 5010-5017).

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au département de Microbiologie et Immunologie de l'Université de Montréal sous la direction des Docteurs Guy Lemay et Éric A. Cohen.

Je voudrais d'abord exprimer toute ma gratitude au Dr. Guy Lemay pour m'avoir permis de faire mes études de doctorat au sein de son laboratoire, pour son excellente direction et, également, pour son entière disponibilité tout au long de mes études de doctorat. Le Dr. Lemay m'a ouvert la porte de son laboratoire et a su me faire confiance à une époque cruciale de ma vie. Je remercie en outre mon codirecteur, le Dr. Éric A. Cohen pour ses précieux conseils et son support professionnel indéfectible. Les entretiens enrichissants avec les Drs. Lemay et Cohen, toujours hautement appréciés, n'ont jamais cessé d'être pour moi d'un très grand secours.

Je suis très reconnaissant également au Dr. Robert Lodge et à Mme. Julie Deschambeault pour leur précieuse collaboration technique, pour les intéressantes discussions qu'ils ont eu avec moi touchant mon sujet de recherche ainsi que pour le temps qu'ils ont consacré à m'initier au confinement.

Je désire aussi souligner l'assistance technique de Mesdames Carole Danis, Johanne Mercier, Nicole Rougeau, et Nesserine Daniel, techniciennes de laboratoire, qui m'ont aidé à mener à bonne fin certaines expériences. J'adresse aussi mes remerciements au Dr. Xiao-Jian Yao pour sa disponibilité peu commune.

Je remercie en outre M. Serge Sénéchal pour son travail dans le laboratoire de cytofluorométrie ainsi que MM. Francis Deshaies et Hayssam Khalil pour l'aide qu'ils m'ont apporté dans l'exécution de certaines figures apparaissant dans mes articles.

J'aimerais aussi témoigner ma reconnaissance aux organismes qui m'ont supporté financièrement pendant mes études de doctorat: l'Universidad Del Norte (Barranquilla-Colombie), le Ministère de l'Éducation du Québec et le Conseil de Recherche médical du Canada.

Je remercie les membres du jury qui ont accepté d'examiner et de critiquer ce travail.

Finalement, j'adresse mes remerciements chaleureux à tous ceux et celles qui ont collaboré de près comme de loin à l'obtention de mon doctorat et qui ont contribué à rendre agréable mon séjour à l'Université de Montréal. Parmi ceux-ci, je désire mentionner tout particulièrement les membres des laboratoires des Drs. Guy Lemay et Éric A. Cohen.

RÉFÉRENCES

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, et J. S. Pober.** Cells and tissues of the immune system. Dans: Cellular and molecular immunology. 2ème. ed., W. B. Saunders Company, 1994:14-30.
- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, et J. S. Pober.** Congenital and acquired immunodeficiencies. Dans: Cellular and molecular immunology. 4ème. ed., W. B. Saunders Company, 2000:445-467.
- Aguilar, R. C., M. Boehm, I. Gorshkova, R. J. Crouch, K. Tomita, T. Saito, H. Ohno et J. S. Bonifacino.** 2001. Signal-binding specificity of the μ 4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. *J. Biol. Chem.* **276**:13145-13152.
- Aiken, C., J. Konner, N. R. Landau, M. E. Lenburg, et D. Trono.** 1994. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* **76**:853-864.
- Akkona, R. K., R. M. Walton, M. L. Chen, Q. X. Li, V. Planelles, et I. S. Chen.** 1996. High efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotypes with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J. Virol.* **70**:2581-2585.
- Alberts, B., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, et P. Walter.** Intracellular compartments and transport. Dans: Essential Cell Biology. An introduction to the Molecular Biology of the cell. Garland Publishing, Inc., 1998:447-480.
- Aldovini, A., et R. A. Young.** 1990. Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus. *J. Virol.* **64**:1920-1926.

- Ali, N., et W. H. Evans.** 1990. Priority targeting of GPI-anchored proteins to the bilecanalicular (apical) plasma membrane of hepatocytes. *Biochem. J.* **271**:193-199.
- Apodaca, G., M. Bomsel, J. Arden, P. P. Breitfeld, K. Tang, et K. E. Mostov.** 1991. The polymeric immunoglobulin receptor. A model protein to study transcytosis. *J Clin Invest.* **87**:1877-1882.
- Araneta, M. R., L. Mascola, A. Eller, L. O'Neil, M. M. Ginsberg, M. Bursaw, J. Marik, S. Friedman, C. A. Sims, M. L. Rekart, et al.** 1995. HIV transmission through donor artificial insemination. *JAMA* **273**:854-858.
- Arthur, L. O., J. W. Bess Jr., R. C. Sowder II, R. E. Benveniste, D. L. Mann, J.-C. Chermann, et L. E. Henderson.** 1992. Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* **258**:1935-1938.
- Bachand, F., X. J. Yao, M. Hrimech, N. Rougeau, et É. A. Cohen.** 1999. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 requires a direct interaction with the p6 domain of the p55 gag precursor. *J. Biol.Chem.* **274**:9083-9091.
- Barat, C., V. Lullien, O. Schatz, G. Keith, M. Nugeyre, F. Gruninger-Leitch, F. Barre-Sinoussi, S. Le Grice, et J. L. Darlix.** 1989. HIV-1 reverse transcriptase specifically interacts with the anticodon domain of its cognate primer tRNA. *EMBO J.* **8**:3279-3285.
- Barat, C., O. Schatz, S. Le, Grice, et J.-L. Darlix.** 1993. Analysis of the interactions of HIV1 replication primer tRNA-

Lys,3 with nucleocapsid protein and reverse transcriptase. *J. Mol. Biol.* **231**:185-190.

Barre-Sinoussi, F., J.-C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axier-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, et L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.

Bartles, J. R., H. M. Feracci, B. Stieger, et A. L. Hubbard. 1987. Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane *in vivo*: comparison of the pathways taken by apical and basolateral proteins using subcellular fractionation. *J. Cell Biol.* **105**:1241-1251.

Baur, A. S., E. T. Sawai, P. Dazin, W. J. Fantl, C. Cheng-Mayer, et B. M. Peterlin. 1994. HIV-1 Nef leads to inhibition or activation of T cells depending on its intracellular localization. *Immunity.* **1**:373-384.

Berger, E. A., P. M. Murphy, et J. M. Farber. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **17**:657-700.

Bergmann, J. E., et P. J. Fusco. 1988. The M protein of vesicular stomatitis virus associates specifically with the basolateral membranes of polarized epithelial cells independently of the G protein. *J. Cell Biol.* **107**:1707-1715.

Berkowitz, R. D., A. Ohagen, S. Hoglund, et S. P. Goff. 1995. Retroviral nucleocapsid domain mediates the specific recognition of genomic viral RNAs by chimeric Gag polyproteins during RNA packaging *in vivo*. *J. Virol.* **69**:6445-6456.

- Berlioz-Torrent, C., B. L. Shacklett, L. Erdtmann, L. Delamarre, I. Bouchaert, P. Sonigo, M. C. Dokhlar, et R. Benarous.** 1999. Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J. Virol.* **73**:1350-1361.
- Berson, J. F., D. Long, B. J. Doranz, J. Rucker, F. R. Jirik, et R. W. Doms.** 1996. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Virol.* **70**:6288-6295.
- Bieniasz, P. D., et B. R. Cullen.** 2000. Multiple blocks to human immunodeficiency virus type 1 replication in rodent cells. *J. Virol.* **74**:9868-9877.
- Blobel, G., et B. Dobberstein.** 1975. Transfer of protein across membranes 1. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immuno-globulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* **67**:835-851.
- Boge, M. S., S. Wyss, J. S. Bonifacino, et M. Thali.** 1998. A membrane proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor. *J. Biol. Chem.* **273**:15773-15778.
- Bonifacino, J. S., et E. C. Dell'Angelica.** 1999. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J. Cell Biol.* **145**:923-926.
- Bour, S., C. Perrin, et K. Strebel.** 1999. Cell surface CD4 inhibits HIV-1 particle release by interfering with Vpu activity. *J. Biol. Chem.* **274**:33800-33806.

- Bour, S., U. Schubert, K. Peden, et K. Strebel.** 1996. The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor?. *J. Virol.* **70**:820-829.
- Bour, S., U. Schubert, et K. Strebel.** 1995. The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein specifically binds to the cytoplasmic domain of CD4: implications for the mechanism of degradation. *J. Virol.* **69**:1510-1520.
- Bour, S., et K Strebel.** 1996. The human immunodeficiency virus (HIV) type 2 envelope protein is a functional complement to HIV type 1 Vpu that enhances particle release of heterologous retroviruses. *J. Virol.* **70**: 8285-8300.
- Bresnahan, P. A., W. Yonemoto, S. Ferrell, D. Williams-Herman, R. Geleziunas, et W. C. Greene.** 1998. A dileucine motif in HIV- Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. *Curr. Biol.* **5**:1235-1238.
- Broliden, P. A., B. Makitalo, L. Akerblom, J. Rosen, K. Broliden, G. Utter, M. Jondal, E. Norrby, et B. Wahren.** 1991. Identification of amino acids in the V3 region of gp120 critical for virus neutralization by human HIV-1-specific antibodies. *Immunology* **73**:371-376.
- Brown, P. O.** 1997. Integration. Dans: *Retroviruses* (Coffin, J. M., S. H. Hughes, et H. E. Varmus, eds), **1**:161-203, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Browning, J., J. W. Horner, M. Pettoello-Montovani, C. Raker, S. Yurasov, R. A. DePinho, et H. Goldstein.** 1997. Mice transgenic for human and CCR5 are susceptible to HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:14637-14641.

- Bukrinski, M. I., S. Haggerty, M. P. Dempsey, N. Sharova, A. Adzhubei, L. Spitz, P. Lewis, D. Goldfarb, M. Emerman, et M. Stevenson.** 1993. A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**:666-669..
- Bukrinski, M. I., N. Sharova, M. P. Dempsey, T. L. Stanwick, A. G. Bukrinskaya, S. Haggerty, et M. Stevenson.** 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:6580-6584.
- Buonocore, L., T. G. Turi, B. Crise, et J. K. Rose.** 1994. Stimulation of heterologous protein degradation by the Vpu protein of HIV-1 requires the transmembrane and cytoplasmic domain of CD4. *Virology* **204**:482-486.
- Camaur, D., et D. Trono.** 1996. Characterisation of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J. Virol.* **70**:6106-6111.
- Cann, A. J., M. J. Churcher, M. Boyd, W. O'Brien, J. Q. Zhao, J. Zack, et I. S. Chen.** 1992. The region of the envelope gene of human immunodeficiency virus type 1 responsible for determination of cell tropism. *J. Virol.* **66**:305-309.
- Cantin, R., J-F. Fortin, G. Lamontagne, et M. Tremblay.** 1997. The acquisition of host-derived major histocompatibility complex class II glycoproteins by human immunodeficiency virus type 1 accelerates the process of virus entry and infection in human T-lymphoid cells. *Blood* **90**:1091-1100.
- Cao, J., L. Bergeron, E. Helseth, M. Thali, H. Repke, et J. Sodroski.** 1993. Effects of amino acid changes in the

extracellular domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **67**:2747-2755.

Caras, I. W. 1991. Probing the signal for glycosylphosphatidylinositol anchor attachment using decay accelerating factor as a model system. *Cell Biol. Int. Rep.* **15**:815-826.

Carpen, O., I. Virtanen, V.-P. Lehto, et E. Saksela. 1983. Polarization of NK cell cytoskeleton upon conjugation with sensitive target cells. *J. Immunol.* **131**:2695-2698.

Carr, C.M., et P. S. Kim. 1993. A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell* **73**:823-832.

Cartier C., P. Sivard, C. Tranchat, D. Decino, C. Desgranges, et V. Boyar. 1999. Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection. **274**:19434-19440.

Casanova, J. E., G. Apodaca, et K. E. Mostov. 1991. An autonomous signal for basolateral sorting in the cytoplasmic domain of the polymeric immunoglobulin receptor. *Cell* **66**:65-75.

Cen, S., A. Khorchid, J. Gabor, L. Rong, M. A. Wainberg, et L. Kleiman. 2000. Roles of Pr55gag and NCp7 in tRNA₃^{Lys} genomic placement and the initiation step of reverse transcription in human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **74** :10796-10800.

Cereijido M., E. S. Robbins, W. J. Dolan, A. Rotunno, et D. Sabatini. 1978. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J. Cell., Biol.* **77**:853-880.

- Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger, et P. S. Kim.** 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**:263-273.
- Checroune, F., X. J. Yao, H. G. Gottlinger, D. Bergeron, et É. A. Cohen.** 1995. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1: role of conserved regions within the p6 domain of Pr55gag. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **10**:1-7.
- Coady, M. J., N. G. Daniel, E. Tiganos, B. Allain, J. Friberg, J.-Y. Lapointe, et É. A. Cohen.** 1998. Effects of Vpu on *Xenopus* oocyte membrane conductance. *Virology* **244**:39-49.
- Coffin, J. M.** Retroviridae and their replication. Dans: *Fundamental Virology, Second Edition.*, edited by B. N. Fields, D. M. Knipe et al. Raven Press, Ltd., New York, **1991**:645-723.
- Coffin, J.M., S. H. Hughes, et H. E. Varmus.** *Retroviruses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1997.
- Cohen, É. A., G. Dehni, J. G. Sodroski, et W. A. Haseltine.** 1990. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J Virol.* **64**:3097-3099.
- Cohen, É. A., R. A. Subbramanian, et H. G. Gottlinger.** 1996. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **214**:219-235.
- Cohen, É. A., E. F. Terwilliger, J. G. Sodroski, et W. A. Haseltine.** 1988. Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1. *Nature* **334**:532-534.
- Colas, B., et S. Maroux.** 1980. Simultaneous isolation of brush border and basolateral membranes from rabbit enterocytes:

presence of brush border hydrolases in the basolateral membrane of rabbit enterocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **600**:406-420.

Collins, K. L., B. K. Chen, S. A. Kalams, B. D. Walker, et D. Baltimore. 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **391**:397-401.

Compans, R. W., et R. V. Srinivas. 1991. Protein sorting in polarized epithelial cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **170**:141-181

Connors, R. I., B. K. Chen, S. Choe, et N. R. Landau. 1995. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* **206**:935-944.

Cosson, P. 1996. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO J.* **15**:5783-5788.

Cosson, P., et F. Letourneur. 1997. Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr. Opin Cell Biol.* **9**:484-487.

Cunningham, A. L., S. Li, J. Juarez, G. Lynch, M. Alali, et H. Naif. 2000. The level of HIV infection of macrophages is determined by interaction of viral and host cell genotypes. *J. Leukoc. Biol.* **68**:311-317.

Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Claham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, et R. A. Weiss. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature (London)* **312**:763-767.

- Danielsen, E. M., J. P. Vyas, et A. J. Kenny.** 1980. A neutral endopeptidase in the microvillar membrane of pig intestine. *Biochem. J.* **191**:645-648.
- Dargement, C., A. Le Bivic, S. Rothenberger, B. Iacopetta, et L. C. Kuehn.** 1993. The internalization signal and the phosphorylation site of transferrin receptor are distinct from the main basolateral sorting information. *EMBO J.* **12**:1713-1721.
- Dayton, A., J. G. Sodroski, C. A. Rosen, W. C. Goh, et W. A. Haseltine.** 1986. The transactivator gene of human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **44**:941-947.
- de Hoop, M. J., et C. G. Dotti.** 1993. Membrane traffic in polarized neurons in culture. *J. Cell Science. Suppl.* **17**:85-92.
- Delamarre, L., C. Pique, A. R. Rosenberg, V. Blot, M.-P. Grange, I. Le Blanc, et M.-C. Dokh lar.** 1999. The Y-S-L-I tyrosine-based motif in the cytoplasmic domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope is essential for cell-to-cell transmission. *J. Virol.* **73**:9659-9663.
- Dell'Angelica, E. C., J. Klumperman, W. Stoorvogel, et J. S. Bonifacino.** 1998. Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science* **280**:431-434.
- Dell'Angelica, E. C., C. Mullins, et J. S. Bonifacino.** 1999a. AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptor. *J. Biol. Chem.* **274**:7278-7285.
- Dell'Angelica, E. C., C. E. Ooi, et J. S. Bonifacino.** 1997. β 3A-adaptin: a subunit of the adaptor-like complex AP-3. *J Biol Chem.* **272**:15078-15084.

- Dell'Angelica, E. C., V. Shotelersuk, R. C. Aguilar, W. A. Gahl, et J. S. Bonifacino.** 1999b. Altered trafficking of lysosomal membrane protein in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the β 3A subunit of the AP-3 adaptor complex. *Mol. Cell.* **3**:11-21.
- Del Pozo, M. A., P. Sanchez-Mateos, M. Nieto, et F. Sanchez-Madrid.** 1995. Chemokine regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J. Cell. Biol.* **131**:495-508.
- Deora, A., et L. Ratner.** 2001. Viral protein U (Vpu)-mediated enhancement of Human immunodeficiency virus type 1 particle release depends on the rate of cellular proliferation. *J. Virol.* **75**:6714-6718.
- De Rocquigny, H., C. Gabus, A. Vincent, M. C. Fournié-Zaluski, B. Roques, et J.-L. Darlix.** 1992. Viral RNA annealing activities of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein require only peptide domains outside the zinc fingers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:6472-6476.
- Deschambeault, J., J.-P. Lalonde, G. Cervantes-Acosta, R. Lodge, É. A. Cohen, et G. Lemay.** 1999. Polarized human immunodeficiency virus budding in lymphocytes involves a tyrosine-based signal and favors cell-to-cell viral transmission. *J. Virol.* **73**:5010-5017.
- Desnuelle, P.** 1979. Intestinal and renal aminopeptidase: a model of a transmembrane protein. *Eur. J. Biochem.* **101**:1-11.
- Dorfman, A. T., A. Bukovsky, A. S. Ohagen, H. Hoglund et G. Gottlinger.** 1994a. Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **68**:8180-8187.

- Dorfman, T., F. Mammano, W. A. Haseltine, et H. G. Göttlinger.** 1994b. Role of the matrix protein in the virion association of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **68**:1689-1696.
- Dotti, C. G., et K. Simons.** 1990. Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Cell* **62**:63-72.
- Dubay, J. W., S. R. Duvay, H. J. Shin, et E. Hunter.** 1995. Analysis of the cleavage site of the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein: requirement of precursor cleavage for glycoprotein incorporation. *J. Virol.* **69**:4675-4682.
- Dubay, J. W., S. J. Robert, B. H. Hahn, et E. Hunter.** 1992. Truncation of the human immunodeficiency virus type, 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. *J. Virol.* **66**:6616-6625.
- Dunn, C. S., M. Mehtali, L. M. Houdebine, J. P. Gut, A. Kirn, et A. M. Aubertin.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 infection of human CD4-transgenic rabbits. *J. Gen. Virol.* **76**:1327-1336.
- Earl, P. L., C. C. Broder, D. Long, S. A. Lee, J. Peterson, S. Chakrabarti, R. W. Doms, et B. Moss.** 1994. Native oligomeric human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein elicits diverse monoclonal antibody reactivities. *J. Virol.* **68**:3015-3026.
- Earl, P. L., R. W. Doms, et B. Moss.** 1990. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:648-652.

- Edbauer, C. A., et R. B. Naso. 1984.** Cytoskeleton-associated Pr65gag and assembly of retrovirus temperature-sensitive mutants in chronically infected cells. *Virology* **143**:389-397.
- Egan, M. A., L. M. Carruth, J. F. Rowell, X. Yu, et R. F. Siliciano. 1996.** Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein. *J. Virol.* **70**:6547-6557.
- Ehlers, M. R. W., et J. F. Riordan. 1991.** Membrane proteins with soluble counterparts: role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochem.* **30**:10065-10074.
- Einfeld, D. 1996.** Maturation and assembly of retroviral glycoproteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **214**:133-175.
- Einfeld, D., et E. Hunter. 1991.** Transport of membrane proteins to the cell surface. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **170**:107-139.
- Englund, P. T. 1993.** The structure and biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:121-138.
- Ewart, G. D., T. Shuterland, P. W. Gage, et G. B. Cox. 1996.** The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 forms cation-selective ion channels. *J. Virol.* **70**:7108-7115.
- Fan, L., et K. Peden. 1992.** Cell free transmission of vif-mutants of HIV-1. *Virology* **190**:19-29.
- Fauci, A. S., A. M. Macher, D. L. Longo, H. C. Lane, A. H. Rook, H. Masur, et E. P. Gelmann. 1984.** NIH conference. Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiologic, clinical,

immunologic, and therapeutic considerations. *Ann. Intern. Med.* **100**:92-106.

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

Fisher, A. G., E. Collalti, L. Ratner, R. C. Gallo, et F. Wong-Staal. 1985. A molecular clone of HTLV-III with biological activity. *Nature* **316**:262-265.

Fisher, A. G., B. Ensoli, L. Ivanoff, M. Chamberlain, S. Petteway, L. Ratner, R. C. Gallo, et F. Wong-Staal. 1987. The *src* gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro. *Science* **237**:888-893.

Fisher, W. B., L. R. Forrest, G. R. Smith, et M. S. P. Sansom. 2000. Transmembrane domains of viral ion channel proteins: a molecular dynamics simulation study. *Biopolymers* **53**:529-538.

Fölsch, H., H. Ohno, J. S. Bonifacino, et I. Mellman. 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* **99**:189-198.

Fortin, J.-F., B. Barbeau, H. Hedman, E. Lundgren, et M. J. Tremblay. 1999. Role of the leukocyte function antigen-1 conformational state in the process of human immunodeficiency virus type-1 mediated syncytium formation in virus infection. *Virology*. **257**:228-238.

Frankel, A. D., et J. A. T. Young. 1998. HIV-1: Fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:1-25

Freed, E. D., et M. A. Martin. 1995. Virion incorporation with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific amino

acid substitution in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J. Virol.* **69**:1984-1989.

Freedman, R. B. 1989. Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins. *Cell* **57**:1069-1072.

Fu, W., R. J. Gorelick, et A. Rein. 1994. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 dimeric RNA from wild-type and protease-defective virions. *J. Virol.* **68**:5013-5018.

Fultz, P. N., P. J. Vance, M. J. Endres, B. Tao, J. D. Dvorin, I. C. Davis, J. D. Lifson, D. C. Montefiori, M. Marsh, M. H. Malim, et J. A. Hoxie. 2001. In vivo attenuation of simian immunodeficiency virus by disruption of a tyrosine-dependent sorting signal in the envelope glycoprotein cytoplasmic tail. *J. Virol.* **75**:278-291.

Gabuzda, D. H., K. Lawrence, E. Langhoff, E. Terwilliger, T. Dorfman, W. A. Haseltine, et J. Sodroski. 1992a. Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* **66**:6489-6495.

Gabuzda, D. H., A. Lever, E. Terwilliger, et J. Sodroski. 1992b. Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* **66**:3306-3315.

Gabuzda, D. H., U. Olshevsky, P. Bertani, W. A. Haseltine, et J. Sodroski. 1991. Identification of membrane anchorage domains of the HIV-1 gp160 envelope glycoprotein precursor. *J. AIDS Hum. Retrovirol.* **4**:34-40.

Gallay, P., T. Hope, D. Chin, et D. Trono. 1997. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**:9825-9830.

- Gallo, P., S. Swingler, C. Aiken, et D. Trono.** 1995. HIV-1 infection of nondividing cell: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator. *Cell* **80**:379-388.
- Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai, G. White, P. Foster, et P.D. Markham.** 1984. Frequent detection and isolation of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in serum of patients with AIDS. *Science* **224**:500-503.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, R. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G.D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, et M. Popovic.** 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:865-867.
- Gamble, T. R., F. F. Vajdos, S. Yoo, D. K. Korthylake, S. M. Hauseweart, W. I. Sundquist, et C. P. Hill.** 1996. Crystal structure of human cyclophilin A bound to amino-terminal domain of the HIV-1 capsid. *Cell* **87**:1285-1294.
- Gamble, T. R., S. Yoo, F. F. Vajdos, U. K. von Schwedler, D. K. Korthylake, H. Wang, J. P. McCutcheon, W. I. Sundquist, et C. P. Hill.** 1997. Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* **278**:849-853.
- Garcia, J. V., J. Alfano, et A. D. Miller.** 1993. The negative effect of human immunodeficiency virus type 1 Nef on cell surface CD4 expression is not species specific and requires the cytoplasmic domain of CD4. *J. Virol.* **67**:1511-1516.

- Garnier, L., J. Bradford Bowzard, et J. W. Wills.** 1998. Recent advances and remaining problems in HIV assembly. *AIDS* **12** (suppl A):S5-S16.
- Garoff, H.** 1985. Using recombinant DNA techniques to study protein targeting in the eucaryotic cell. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**:403-445.
- Gaush, C. R., W. L. Hard, et T. F. Smith.** 1966. Characterization of an established line of canine kidney cells (MDCK). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **122**:931-935.
- Gill, M. J., L. R. Sutherland, et D. L. Church.** 1992. Gastrointestinal tissue cultures for HIV in HIV-infected/AIDS patients. *AIDS* **6**:553-556.
- Gitti, R. K., B. M. Lee, J. Walker, M. F. Summer, S. Yoo, et W. I. Sundquist.** 1996. Structure of the amino terminal core domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* **273**:231-235.
- Goldsmith, M. A., M. T. Warmerdam, R. E. Atchison, M. D. Miller, et W. C. Greene.** 1995. Dissociation of the CD4 downregulation and viral infectivity enhancement function of human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J. Virol.* **69**:4112-4121.
- Göttlinger, H. G., T. Dorfman, É. A. Cohen, et W. A. Haseltine.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 enhances the production of capsids from widely divergent retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:7381-7385.
- Gratton, S., X.-J. Yao, S. Sundararajan, É. A. Cohen, et R.-P. Sékaly.** 1996. Molecular analysis of the cytoplasmic domain of CD4. Overlapping but noncompetitive requirement for Ick association and down-regulation by Nef. *J. Immunol.* **157**:3305-3311.

- Greenberg, M., L. DeTulleo, I. Rapoport, J. Skowronski, et T. Kirchhausen.** 1998. A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr. Biol.* **5**:1239-1242.
- Greene, W. C.** 1990. Regulation of HIV-1 gene expression. *Annu. Rev. Immunol.* **8**:453-476.
- Greene, W. C.** 1991. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *New. Engl. J. Med.* **324**:308-317.
- Grice, A. L., I. D. Kerr, et M. S. P. Sansom.** 1997. Ion channels formed by HIV-1 Vpu: a modelling and simulation study . *FEBS Letters* **405**:299-304.
- Gross, I., H. Hohenberg, C. Juckhagel, et H.-G. Krausslich.** 1998. N-terminal extension of human immunodeficiency virus capsid protein converts the *in vitro* assembly phenotype from tubular to spherical particles. *J. Virol.* **72**:4798-4810.
- Hammond, C., et A. Helenius.** 1994. Folding of VSV-G protein: sequential interaction with BiP and calnexin. *Science* **266**:456-458.
- Harrich, D., J. Garcia, J. Wu, R. Mitsuyasu, J. Gonzalez, et R. Gaynor.** 1989. Role of SP1-binding domains in *in vitro* transcriptional regulation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *J. Virol.* **63**:2585-2591.
- Hart, C. E., C. Y. Ou, J. C. Galphin, J. Moore, L. T. Bacheler, J. J. Wasmuth, S. R. J. Petteway, et G. Schochetman.** 1989. Human chromosome 12 is required for elevated HIV-1 expression in human-hamster hybrid cells. *Science.* **246**:488-491.

- Hauri, H. P., et K. Matter.** 1991. Protein traffic in intestinal epithelial cells. *Semin. Cell Biol.* **2**:355-364.
- Hay, J. C., et R. H. Scheller.** 1997. SNARES and NSF in targeted membrane fusion. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**:505-512.
- He, J., S. Choe, R. Walker, P. Di Marzio, D. O. Morgan, et N. R. Landau.** 1995. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrest cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J. Virol.* **69**:6705-6711.
- Heise, C., S. Dandekar, P. Kumar, R. Duplantier, R. M. Donovan, et C. H. Halsted.** 1991. Human immunodeficiency virus infection of enterocytes and mononuclear cells in human jejunal mucosa. *Gastroenterology* **100**:1521-1527.
- Helseth, E., U. Olshevsky, C. Furman, et J. Sodroski.** 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* **65**:2119-2123.
- Helseth, E., U. Olshevsky, D. Gabuzda, B. Ardman, W. Haseltine, et J. Sodroski.** 1990. Changes in the transmembrane region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein affect membrane fusion. *J. Virol.* **64**:6314-6318.
- Henklein, P., R. Kinder, U. Schubert, et B. Bechinger.** 2000. Membrane interaction and alignment of structures within the HIV-1 Vpu cytoplasmic domain: effect of phosphorylation of serines 52 and 56. *FEBS Letters* **482**:220-224.
- High, S. et B. Dobberstein.** 1992. Mechanisms that determines the transmembrane disposition of proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **4**:581-586.

- Hoglund, S., A. Ohagen, K. Lawrence, et D. Gabuzda.** 1994. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* **201**:349-355.
- Hrimech, M., X. J. Yao, F. Bachand, N. Rougeau, et É. A. Cohen.** 1999. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr functions as an immediate-early protein during HIV-1 infection. *J. Virol.* **73**:4101-4109.
- Huang, M., J. M. Orenstein, M. A. Martin, et E. O. Freed.** 1995. p6 Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J. Virol.* **69**:6810-6818.
- Hunter, E.** 1988. Membrane insertion and transport of viral glycoproteins: a mutational analysis. Dans: Robbins P. W. (ed). Protein transfer and organelle biogenesis. Das R.C., Academic. pp109-158.
- Hunter, E.** 1994. Macromolecular interacton in the assembly of HIV and other retroviruses. *Semin. Virol.* **5**:71-83.
- Hunter, E., et R. Swanström.** 1990. Retroviral envelope glycoproteins. Dans: Retroviruses - Strategies for replication. R. Swanstrom and P. K. Vogt, eds. (Berlin: Springer-Verlag), 187-253.
- Hunziker, W., C. Harter, K. Matter, et I. Mellman.** 1991. Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* **66**:907-920.
- Hurtley, S. M., et A. Helenius.** 1989. Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**:277-307.
- Inabe, K., M. Nishizawa, S. Tajima, K. Ikuta, et Y. Aida.** 1999. The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine

leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions. *J. Virol.* **73**:1293-1301.

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

Javaherian, K., A. J. Langlois, C. McDanal, K. L. Ross, L. I. Eckler, C. L. Jellis, A. T. profi, J. R. Rusche, D. P. Bolognesi, et S. D. Putney. 1989. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:6768-6772.

Joag, S. V., I. Adamy, Z. Li, L. Foresman, D. M. Pinzon, C. Wang, E. B. Stephens, R. Raghavan, et O. Narayan. 1997. Animal model of mucosally transmitted human immunodeficiency virus type 1 disease: intravaginal and oral deposition of simian/human immunodeficiency virus in macaques results in systemic infection, elimination of CD4+ T cells and AIDS. *J. Virol.* **71**:4016-4023.

Johnson, A. E. 1997. Protein translocation at the ER membrane: a complex process become more so. *Trends Cell Biol.* **7**:90-95.

Johnson, R. T. 1995. The pathogenesis of HIV infections of the brain. *Curr. Top. Microbiol.* **202**:3-10.

Jones, T. A., G. Blaug, M. Hansen, et E. Barklis. 1990. Assembly of gag- β -galactosidase proteins into retrovirus particles. *J. Virol.* **64**:2265-2279.

Jones, L. V., R. W. Compans, A. R. Davis, T. J. Bos, et D. P. Nayak. 1985. Surface expression of influenza virus neuraminidase, an aminotermally anchored viral membrane glycoprotein, in polarized epithelial cells. *Mol. Cell Biol.* **5**:2181-2189.

- Jones, K. A., J. T. Kadonaga, P. A. Luciw, et R. Tjian.** 1986. Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Spl. *Science* **232**:755-759.
- Katz, R. A., et A. M. Skalka.** 1994. The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **63**:133-173.
- Kerjaschki, D., L. Noronha-Blob, B. Sacktor, et M. G. Farquhar.** 1984. Microdomains of distinctive composition in the kidney proximal tubule brush border. *J. Cell. Biol.* **98**:1505-1513.
- Keshet, E., et H. M. Temin.** 1979. Cell-killing by spleen necrosis virus is correlated with a transient accumulation of spleen necrosis virus DNA. *J. Virol.* **31**:376-388.
- Kestler III, H. W., D. J. Ringler, K. Mori, D. L. Panicali, P. K. Sehgal, M. D. Daniel, et R. C. Desrosiers.** 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**:651-662.
- Kilpatrick, D. R., R. V. Srinivas, E. B. Stephens, et R. W. Compans.** 1987. Effects of deletion of the cytoplasmic domain upon surface expression and membrane stability of a viral envelope glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **262**:16116-16121.
- Kim, S., R. Byrn, J. Groopman, et D. Baltimore.** 1989. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J. Virol.* **63**:3708-3713.
- Kimpton, J., et M. Ederman.** 1992. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated β -galactosidase gene. *J. Virol.* **66**:2232-2239.

- Kirchhausen, T., J. S. Bonifacino, et H. Riezman.** 1997. Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:488-495.
- Klimkait T., K. Strebel, M. D. Hoggan, M. A. Martin, et J. M. Orenstein.** 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J. Virol.* **64**:621-629.
- Koh, K., M. Miyaura, A. Yoshida, A. Sakurai, M. Fujita, et A. Adachi.** 2000. Cell-dependent gag mutants of HIV-1 are crucially defective at the stage of uncoating/reverse transcription in non permissive cells. *Microbes Infect* **2**:1419-1423.
- Kornfeld, R., et S. Kornfeld.** 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**:631-664.
- Kuehn, M. J., et R. Schekman.** 1997. COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:477-483.
- Kwong, P. D., R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, et W. A. Hendrickson.** 1998. Structure of an HIV gp 120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393** :648-659.
- LaBranche, C. C., M. M. Sauter, B. S. Haggarty, P. J. Vance, J. Romano, T. K. Hart, P. J. Bugelski, et J. A. Hoxie.** 1994. Biological, molecular, and structural analysis of a cytopathic variant from a molecularly cloned simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **68**:5509-5522.
- LaBranche, C. C., M. M. Sauter, B. S. Haggarty, P. J. Vance, J. Romano, T. K. Hart, P. J. Bugelski, M. Marsh, et J. A. Hoxie.** 1995. A single amino acid change in the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane

molecule increases envelope glycoprotein expression on infected cells. *J. Virol.* **69**:5217-5227.

Lama, J., A. Mangasarian, et D. Trono. 1999. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr. Biol.* **9**:622-631.

Lazaride, E., et W. J. Nelson. 1985. Expression and assembly of the erythroid membrane-skeletal protein ankyrin (goblin) and spectrin in the morphogenesis of chicken neurons. *J. Cell Biochem.* **27**:423-441.

Learmont, J. C., A. F. Geczy, J. Mills, L. J. Ashton, C. H. Raynes-Greenow, R. J. Garsia, W. B. Dyer, L. McIntyre, R. B. Oelrichs, D. I. Rhodes, N. J. Deacon, et J. S. Sullivan. 1999. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sidney Blood Bank Cohort. *N. Engl. J. Med.* **340**:1715-1722.

Le Bivic, A., A. Quaroni, B. Nichols, et E. Rodriguez-Boulan. 1990. Biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2, a human intestinal epithelial cell line. *J. Cell. Biol.* **111**:1351-1361.

Le Bivic, A., Y. Sambuy, A. Patzak, N. Patil, M. Chao, et E. Rodriguez-Boulan. 1991. An internal deletion in the cytoplasmic tail reverses the apical localization of human NGF receptor in transfected MDCK cells. *J. Cell Biol.* **115**:607-618.

Lee, M. H., K. Sano, F. E. Morales, et D. T. Imagawa. 1987. Sensitive reverse transcriptase assay to detect and quantitate human immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1717-1721.

- Leonard, C. K., M. W. Spellman, L. Riddle, R. J. Harris, J. N. Thomas, et T. J. Gregory.** 1990. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cell. *J. Biol. Chem.* **265**:10373-10382.
- Levy, J. A.** 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.* **57**:183-289.
- Levy, J. A., A. D. Hoffman, S. M. Kramer, J. A. Landis, J. M. Shimabukuro, et L. S. Oskiro.** 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**:840-842.
- Levy, J. A., L. S. Kaminsky, et W. J. W. Morrow.** 1985. Infection by the retrovirus associated with the acquired immunodeficiency syndrome: clinical, biological and molecular features. *Ann. Intern. Med.* **103**:694-699.
- Lisanti, M. P., I. Caras, M. A. Davitz, et E. Rodriguez-Boulan.** 1989. A glycolipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **109**:2145-2156.
- Lisanti, M. P., M. C. Field, I. W. Caras, A. K. Menon, et E. Rodriguez-Boulan.** 1991. Mannosamine, a novel inhibitor of glycosyl-phosphatidylinositol incorporation into proteins. *EMBO J.* **10**:1969-1977.
- Lisanti, M. P., A. Le Bivic, A. Saltiel, et E. Rodriguez-Boulan.** 1990. Preferred apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchored proteins: a highly conserved feature of the polarized epithelial cell phenotype. *J. Membr. Biol.* **113**:155-167.

- Lisanti, M. P., et Rodriguez-Boulan, E.** 1990. Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in polarized epithelial cells. *Trends Biochem. Sci.* **15**:113-118.
- Lodge, R., L. Delamarre, J.-P. Lalonde, J. Alvarado, D. A. Sanders, M.-C. Dokh elar, E. A. Cohen, et G. Lemay.** 1997a. Two distinct oncornaviruses harbor an intracytoplasmic tyrosine-based basolateral targeting signal in their viral envelope glycoprotein. *J. Virol.* **71**:5696-5702.
- Lodge, R., H. Göttlinger, D. Gabuzda,  . A. Cohen, et G. Lemay.** 1994. The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J. Virol.* **68**:4857-4861.
- Lodge, R., J.-P. Lalonde, G. Lemay, et  . A. Cohen.** 1997b. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO J.* **16**:695-705.
- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, et J. Darnell.** Structure des membranes: la membrane plasmique. Dans: *Biologie Moléculaire de la Cellule*, 3 me édition, W.H. Freeman and Company, 1995a:595-632.
- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, et J. Darnell.** Cellules nerveuses. Dans: *Biologie Moléculaire de la Cellule*, 3 me édition, W.H. Freeman and Company, 1995b:925-990.
- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. L. Zipursky, P. Matsudaira, et J. Darnell.** Synthèse et répartition des protéines destinés aux membranes, au milieu extracellulaire et aux lysosomes. Dans: *Biologie Moléculaire de la Cellule*, 3 me édition, W.H. Freeman and Company, 1995c:669-738.

- Louvard, D., M. Kedinger, et H. P. Hauri.** 1992. The differentiating intestinal epithelial cell: Establishment and maintenance of functions through interaction between cellular structures. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**:157-195.
- Luban, J., K. L. Bossolt, E. K. Franke, G. V. Kalpana, et S. P. Goff.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 gag protein binds to cyclophilins A and B. *Cell* **73**:1067-1078.
- Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, et R. Axel.** 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**:333-348.
- Maldarelli, F., M. Y. Chen, R. L. Willey, et K. Strebel.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu is an oligomeric type 1 integral membrane proteine. *J. Virol.* **67**:5056-5061.
- Malim, M. H., et B. R. Cullen.** 1991. HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* **65**:241-248.
- Malim, M. H., J. Hauber, S. Y. Le, J. V. Maizel, et B. R. Cullen.** 1989. The HIV-1 rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-257.
- Mammano, F., E. Kondo, J. Sodroski, A. Bukovsky, et H. G. Gottlinger.** 1995. Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoproteins with short cytoplasmic domains. *J. Virol.* **69**:3824-3830.
- Mangasarian, A., et D. Trono.** 1997. The multifaceted role of HIV Nef. *Res. Virol.* **148**:30-33.

- Margottin, F., S. P. Bour, H. Durand, L. Selig, S. Benichou, V. Richard, D. Thomas, K. Strebelt, et R. Benarous.** 1998. A novel human WD protein, h- β TrCP, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif. *Mol. Cell* **1**:565-574.
- Mariani, R., B. A. Rasala, G. Rutter, K. Wieggers, S. M. Brandt, H.-G. Kräusslich, et N. R. Landau.** 2001. Mouse-human heterokarions support efficient human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J. Virol.* **75**:4141-3151.
- Mariani, R., G. Rutter, M. E. Harris, T. J. Hope, H. G. Krausslich, et N. R. Landau.** 2000. A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells. *J. Virol.* **74**:3859-3870.
- Mariani, R., et J. Skowronski.** 1993. CD4 downregulation by nef alleles isolated from HIV-1-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:5549-5553.
- Marsh, M., et A. Pelchen-Mattews.** 2000. Endocytosis in viral replication. *Traffic* **1**:525-532.
- Matter, K., W. Hunziker, et I. Mellman.** 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* **71**:741-753.
- Matter, K., M. Brauchbar, K. Bucher, et H.-P. Hauri.** 1990. Sorting of endogenous plasma membrane proteins occurs from two sites in cultured human intestinal epithelial cells. (Caco 2). *Cell* **60**:429-437.
- Matter, K., et I. Mellman.** 1994. Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**:545-554.

- Matter, K., E. M. Yamamoto, et I. Mellman.** 1994. Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J. Cell Biol.* **126**:991-1004.
- McCune, J. M., L. B. Rabin, M. B. Feinberg, M. Lieberman, J. C. Kosek, G. R. Reyes, et I. L. Weissman.** 1988. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53**:55-67.
- McNiven, M. A.** 1998. Dynamin: a molecular motor with pinchase action. *Cell* **94**:151-154.
- McQueen, N. L., D. P. Nayak, E. B. Stephens, et R. W. Compans.** 1986. Polarized expression of a chimeric protein in which the transmembrane and cytoplasmic domains of the influenza virus hemagglutinin have been replaced by those of the vesicular stomatitis virus G protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**:9318-9322.
- McQueen, N. L., D. P. Nayak, E. B. Stephens, et R. W. Compans.** 1987. Basolateral expression of a chimeric protein in which the transmembrane and cytoplasmic domains of the vesicular stomatitis virus G protein have been replaced by those of the influenza virus hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* **262**:16233-16240.
- Mellors, J. W., C. R. J. Rinaldo, P. Gupta, R. M. White, J. A. Todd, et L. A. Kingsley.** 1996. Prognosis in HIV-1 infection predicted by quantity of virus in plasma. *Science* **272**:1167-1170.
- Miller, M. D., C. M. Farnet, et F. D. Bushman.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J. Virol.* **71**:5382-5390.
- Miller, C. J., et J. Hu.** 1999. T cell tropic simian immunodeficiency virus and simian-human immunodeficiency viruses are readily

transmitted by vaginal inoculation of rhesus macaques, and Langerhans' cells of the female genital tract are infected with SIV. *J. Inf. Dis.* **179**: S413-S417.

Miller, R. J., J. Scott Cairn, S. Bridges, et N. Sarver. 2000. Human immunodeficiency virus and AIDS: insights from animal lentiviruses. *J. Virol.* **74**:7187-7195.

Moore, J. P., A. Trkola, et T. Dragic. 1997. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr. Opin. Immunol.* **9**:551-562.

Mostov, K., G. Apodaca, B. Aroeti, et C. Okamoto. 1992. Plasma membrane protein sorting in polarized epithelial. *J. Cell Biol.* **116**:577-583.

Mostov, K. E., P. Breitteld, et J. M. Harris. 1987. An anchor-minus form of the polymeric immunoglobulin receptor is secreted predominantly apically in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* **105**:2031-2036.

Mostov, K., M. B. A. ter Beest, et S. J. Chapin. 1999. Catch the μ 1B train to the basolateral surface. *Cell* **99**:121-122.

Murphy, F. A. , C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, et M. D. Summers. 1995. Virus Taxonomy. Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 10, Springer-Verlag, Wien.

Nabel, G., et D. Baltimore. 1987. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* **326**:711-713.

Nathke, I. S., L. E. Hinck, et W. J. Nelson. 1993. Epithelial cell adhesion and development of cell surface polarity: possible

mechanisms for modulation of cadherin function, organization and distribution. *J. Cell Sci.-Suppl.* **17**:139-145.

Nermut, M. V., et D. Thomas. 1994. Fullerene-like organization of HIV gag-protein shell in virus-like particles produced by recombinant baculovirus. *Virology* **198**:288-296.

Newstein, M., E. J. Stanbridge, G. Casey, et P. R. Shank. 1990. Human chromosome 12 encode a species-specific factor which increases human immunodeficiency virus type 1 *tat*-mediated *trans* activation in rodent cells. *J. Virol.* **64**:4565-4567.

Nichols, B. J., C. Ungermann, H. R. B. Pelham, W. T. Wickner, et A. Haas. 1997. Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature* **387**:199-202.

Nie, Z., D. Bergeron, R. A. Subbramanian, X. J. Yao, F. Checroune, N. Rougeau, et É. A. Cohen. 1998. The putative alpha helix 2 of human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains a determinant which is responsible for the nuclear translocation of proviral DNA in growth-arrested cells. *J. Virol.* **72**:4104-4115.

Nieto, M., J. M. Frade, D. Sancho, M. Mellado, A. C. Martinez, et F. Sanchez-Madrid. 1997. Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. *J. Exp. Med.* **186**:153-158.

Novick, P., et M. Zerial. 1997. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:496-504.

Ohno, H., J. Stewart, M.-C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, T. Kirchhausen, et J. S. Bonifacino. 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signal with clathrin-associated proteins. *Science* **269**:1872-1875.

- Ohno, H., T. Tomemori, F. Nakatsu, Y. Okazaki, R. C. Aguilar, H. Foelsch, I. Mellman, T. Saito, T. Shirasawa, et J. S. Bonifacino.** 1999. Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett.* **449**:215-220.
- Olivetta, E., K. Pugliese, R. Bona, P. D'Aloja, F. Ferrantelli, A. C. Santarcangelo, G. Mattia, P. Verani, et M. Federico.** 2000. cis Expression of the F12 human immunodeficiency virus (HIV) Nef allele transforms the highly productive NL4-3 HIV type 1 to a replication-defective strain: involvement of both Env gp41 and CD4 intracytoplasmic tails. *J. Virol.* **74**:483-492.
- Ott, D. E., L. V. Coren, B. P. Kane, L. K. Busch, D. G. Johnson, R. C. Sowder II, E. N. Chertova, L. O. Arthur, et L. E. Henderson.** 1996. Cytoskeletal proteins inside human immunodeficiency virus type 1 virions. *J. Virol.* **70**:7734-7743.
- Owens, R. J., et R. W. Compans.** 1989. Expression of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein is restricted to basolateral surfaces of polarized epithelial cells. *J. Virol.* **63**:978-982.
- Owens, R. J., J. W. Dubay, E. Hunter, et R. W. Compans.** 1991. Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:3987-3991.
- Palade, G.E.** 1975. Intracellular aspects of the processing of protein synthesis. *Science* **189**:347-358.
- Pandori, M. W., N. J. S. Fitch, H. M. Craig, D. D. Richman, C. A. Spina et J. C. Guatelli.** 1996. Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein. *J. Virol.* **70**:4283-4290.

- Patnaik, A., V. Chau, et J. W. Wills.** 2000. Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 13069-13074.
- Paxton, W., R. I. Connor, et N. R. Landau.** 1993. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J. Virol.* **67**:7229-7237.
- Pavlikis, G. N.** The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. Dans: *Aids: Biology, diagnosis, treatment and prevention*, fourth edition, edited by Vincent T. De Vita Jr., Samuel Hellman and Steven A. Rosenberg. Lippincot-Raven Publishers, 1997.
- Pelham, H. R. B.** 1995. Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**:530-535.
- Peng, I., J. E. Dennis, E. Rodriguez-Boulan, et D. A. Fischman.** 1990. Polarized release of enveloped viruses in the embryonic chick heart: demonstration of epithelial polarity in the presumptive myocardium. *Dev. Biol.* **141**:164-72.
- Peng, C., B. K. Ho, T. W. Chang, et N. T. Chang.** 1989. Role of the human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity. *J. Virol.* **63**:2550-2556.
- Pfeffer, S. R.** 1991. Targeting of proteins to the lysosome. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **170**:43-65
- Pickl, W. F., F. X. Pimentel-Muñoz, et B. Seed.** 2001. Lipid rafts and pseudotyping. *J. Virol.* **75**:7175-7183.

- Pinto, L. H., L. J. Holsinger, et R. A. Lamb.** 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**:517-528.
- Pollard, V. M., et M. H. Malim.** 1998. The HIV-1 Rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:491-532.
- Prill, V., L. Lehmann, K. Von Figura, et C. Peters.** 1993. The cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase contains overlapping but distinct signals for basolateral sorting and rapid internalization in polarized MDCK cells. *EMBO J.* **12**:2181-2193.
- Profy, A. T., P. A. Salinas, L. I. Eckler, N. M. Dunlop, P. L. Nara, et S. D. Putney.** 1990. Epitopes recognized by the neutralizing antibodies of an HIV-1 infected individual. *J. Immunol.* **144**:4641-4647.
- Rabenandrasana, C., S. Baghdiguan, J. Marvaldi, et J. Fantini.** 1990. CD4 molecule are restricted to the basolateral membrane domain of in vitro differentiated human colon cancer cell (HT29-D4). *FEBS* **265**:75-79.
- Reicin, A. S., S. Paik, R. D. Berkowitz, J. Luban, I. Lowy, et S. P. Goff.** 1995. Linker insertion mutations in the human immunodeficiency virus type 1 gag gene: effects on virions particles assembly, release, and infectivity. *J. Virol.* **69**:642-650.
- Reines, D., J. W. Conaway, et R. C. Conaway.** 1996. The RNA polymerase II general elongation factors. *Biochem. Sci.* **9**:351-355.
- Rindler, M. J., L.M. Chuman, L. Shaffer, et M. H. Saier.** 1979. Retention of differentiated properties in an established dog kidney epithelial cell line (MDCK). *J. Cell. Biol.* **81**:635-648.
- Rindler, M. J., I. E. Ivanov, H. Plesken, E. Rodriguez-Boulan, et D. D. Sabatini.** 1984. Viral glycoproteins destined

for apical or basolateral plasma membrane domains traverse the same Golgi apparatus during their intracellular transport in doubly infected Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* **98**:1304-1319.

Robinson, M. S. 1994. The role of clathrin, adaptor and dynamin in endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**:538-544.

Rodriguez-Boulan, E., et W. J. Nelson. 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotypes. *Science* **245**:718-725.

Rodriguez-Boulan, E., et M. Pandergast. 1980. Polarized distribution of viral envelope proteins in the plasma membrane of infected epithelial cells. *Cell* **20**:45-54.

Rodriguez-Boulan, E., et S. K. Powell. 1992. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**:395-427.

Rodriguez-Boulan, E., et D. D. Sabatini. 1978. Asymmetric budding of viruses in epithelial cell monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**:5071-5075.

Ross, T. M., A. E. Oran, et B. R. Cullen. 1999. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of viral Nef protein. *Curr. Biol.* **9**:613-621.

Roth M. G., D. Gundersen, N. Patil, et E. Rodriguez-Boulan. 1987. The large external domain is sufficient for the correct sorting of secreted or chimeric influenza virus hemagglutinins in polarized monkey kidney cells. *J. Cell Biol.* **104**:769-782.

Sakai, H., K. Tokunaga, M. Kawamura, et A. Adachi. 1995. Function of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein in various cell types. *J. Gen. Virol.* **76**:2717-2722.

- Saksela, K., G. Cheng, et D. Baltimore.** 1995. Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J.* **14**:484-491.
- Sargent, P. B.,** 1991. What distinguishes axons from dendrites? Neurons know more than we do. *Trends Neuro. Sci.* **12**:203-205.
- Sattentau, Q. J., et J. P. Moore.** 1991. Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding. *J. Exp. Med.* **174**:407-415.
- Sauter M. M., A. Pelchen-Matthews, R. Bron, M. Marsh, C. C. LaBranche, P. J. Vance, J. Romano, B. S. Haggarty, T. K. Hart, W. M. Lee, et J. A. Hoxie.** 1996. An internalization signal in the simian immunodeficiency virus transmembrane protein cytoplasmic domain modulates expression of envelope glycoproteins on the cell surface. *J. Cell Biol.* **132**:795-811.
- Scala, E., G. D'Offizi, R. Rosso, O. Turriziani, R. Ferrara, A.-M. Mazzone, G. Antonelli, F. Aiuti, et R. Paganelli.** 1997. C-C chemokines, IL-16, and soluble antiviral factor activity are increased in cloned T cells from subjects with long-term nonprogressive HIV infection. *J. Immunol.* **158**:4485-4492.
- Schnittman, S. M., M. C. Psallidopoulos, H. C. Lane, L. Thompson, M. Baseler, F. Massari, C. H. Fox, N. P. Salzman, et A. S. Fauci.** 1989. The reservoir for HIV-1 human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* **245**:305-308.
- Schubert, U., L. C. Anton, I. Bacik, J. H. Cox, S. Bour, J. R. Bennink, M. Orłowski, K. Strebel, et J. W. Yewdell.** 1998. CD4 glycoprotein degradation induced by human

immunodeficiency virus type 1 protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J. Virol.* **72**:2280-2288.

Schubert, U., A. V. Ferrier-Montiel, M. Oblatt-Montal, P. Henklein, K. Strebel et M. Montal. 1996. Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1 infected cells. *FEBS Letters* **398**:12-18.

Schubert, U., P. Heinklein, B. Boldyreff, E. Wingender, K. Strebel, et T. Porstmann. 1994. The human immunodeficiency virus type 1-encoded Vpu protein is phosphorylated by casein kinase-2 (CK-2) at position Ser52 and Ser56 within a predicted α -helix-turn- α -helix-motif. *J. Mol. Biol.* **236**:16-25.

Schubert, U., D. E. Ott, E. N. Chertova, R. Welker, U. Tessmer, M. F. Princiotta, J. R. Bennink, H.-G. Kräusslich, et J. W. Yewdell. 2000. Proteasome inhibition interferes with Gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:13057-13062.

Schubert, U., et K. Strebel. 1994. Differential activities of the human immunodeficiency virus type 1-encoded Vpu protein are regulated by phosphorylation and occur in different cellular compartments. *J. Virol.* **68**:2260-2271.

Schultz, A. M., L. E. Henderson, et S. Oroszlan. 1988. Fatty acylation of proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**:611-647.

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

- Schwartz, S., B. K. Felber, E. M. Fenyö, et G. N. Pavlakis.** 1990a. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. *J. Virol.* **64**:5448-5456.
- Schwartz, S., B. K. Felber, et G. N. Pavlakis.** 1991. Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is Rev-dependent and regulated by splicing. *Virology* **183**:677-686.
- Schwartz, O., V. Marechal, S. Le Gall, F. Lemonnier, et J. M. Heard.** 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.* **2**:338-342.
- Shioda, T., J. A. Levy, et C. Cheng-Mayer.** 1991. Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature* **349**:167-169.
- Siegel, V., et P. Walter.** 1988. Each of the activities of signal recognition particle (SRP) is contained within a distinct domain: Analysis of biochemical mutants of SRP. *Cell* **52**:39-49.
- Simons, K.** 1987. Membrane traffic in an epithelial cell line derived from the dog kidney. *Kidney Int.* **32**:S201-S207.
- Simons, K., et S. D. Fuller.** 1985. Cell surface polarity in epithelia. *Ann. Rev. Cell Biol.* **1**:243-288.
- Simpson, F., A. A. Peden, L. Christopoulou, et M. S. Robinson.** 1997. Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J. Cell Biol.* **137**:835-845.
- Sodroski, J., W. C. Goh, C. Rosen, A. Dayton, E. Terwilliger, et W. Haseltine.** 1986. A second post-transcriptional *trans*-activator gene required for HTLV-III replicaton. *Nature* **321**:412-417.

- South, T. L., et M. F. Summers.** 1993. Zinc- and sequence-dependent binding to nucleic acids by the N-terminal zinc finger of the HIV-1 nucleocapsid protein. NMR structure of the complex with the Psi-site analog, dACGCC. *Protein Sci.* **2**:3-19.
- Sova, P., et D. J. Volsky.** 1993. Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and non permissive cells with *vif*-negative human immunodeficiency virus type 1. *Virology*. **67**:6322-6326.
- Speck, R. F., M. L. Penn, J. Wimmer, U. Esser, B. F. Hague, T. J. Kindt, R. E. Atchison, et M. A. Goldsmith.** 1998. Rabbit cells expressing human CD4 and human CCR5 are highly permissive for human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virology*. **72**:5728-5734.
- Srinivasakumar, N., M. L. Hammarskjold, et D. Rekosh.** 1995. Characterization of deletion mutation in the capsid region of human immunodeficiency virus type 1 that affect particle formation and Gal-Pol precursor incorporation. *J. Virology*. **69**:6106-6114.
- Starcich, B. R., B. H. Hahn, G. M. Shaw, P. D. McNeely, S. Modrow, H. Wolf, E. S. Parks, W. P. Park, S. F. Josephs, R. C. Gallo, et al.** 1986. Identification and characterization of conserved and variable regions of the envelope gene HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**:637-648.
- Stein, B. S., et E. G. Engleman.** 1990. Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a *cis* or medial compartment of the Golgi complex. *J. Biol. Chem.* **265**:2640-2649.
- Stein, B. S., S. D. Gowda, J. D. Lifson, R. C. Penhallow, K. G. Bensch, et E. G. Engleman.** 1987. pH-independent HIV

entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. *Cell*. **49**:659-668.

Stephens, E. B., et R. W. Compans. 1988. Assembly of animal viruses at cellular membranes. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**:489-516.

Strack, B., A. Calistri, M. A. Accola, G. Palù, et H. G. Göttlinger. 2000. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**:13063-13068.

Strebel, K., T. Klimkait, F. Maldarelli, et M. A. Martin. 1989. Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 vpu protein. *J. Virol.* **63**:3784-3791.

Stumptner-Cuvelette, P., S. Morchoisne, M. Dugast, S. Le Gall, G. Raposo, O. Schwartz, et P. Benaroch. 2001. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:12144-12149.

Subbramanian, R., et É. A. Cohen. 1994. Molecular biology of the human immunodeficiency virus accessory proteins. *J. Virol.* **68**:6831-6835.

Tachibana, K., T. Nakajima, A. Sato, K. Igarashi, H. Shida, H. Iizasa, N. Yoshida, O. Yoshie, T. Kishimoto, et T. Nagasawa. 1997. *J. Exp. Med.* CXCR4/fusin is not a species-specific barrier in murine cells for HIV-1 entry. **185**:1865-1870.

Tan X., R. Pearce-Pratt, et D. M. Phillips. 1993. Productive infection of a cervical epithelial cell line with human immunodeficiency virus: implications for sexual transmission. *J. Virol.* **67**:6447-6452.

Tashiro, M., J. T. Seto, S. Choosakul, M. Yamakawa, H. D. Klenk, et R. Rott. 1992. Budding site of sendai virus in

polarized epithelial cells is one of the determinants for tropism and pathogenicity in mice. *Virology* **187**:413-422.

Terwilliger, E. F., É. A. Cohen, Y. Lu, J. G. Sodroski, et W. A. Haseltine. 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:5163-5167.

Terwilliger, E., J. G. Sodroski, C. A. Roseu, et W. A. Haseltine. 1986. Effects of mutations within the 3' orf open reading frame region of the mutant T-cell lymphotropic virus type III (HTLV-III-LAV) on replication and cytopathogenicity. *J. Virol.* **60**:754-762.

Thali, M., J. P. Moore, C. Furman, C. MacArthur, D. D. Ho, J. Robinson, et J. Sodroski. 1993. Characterisation of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding. *J. Virol.* **67**:3978-3988.

Thali M, A. Bukovsky, E. Kondo, B. Rosenwirth, C. T. Walsh CT, J. Sodroski, et H. G. Gottlinger. 1994. Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* **372** :363-365.

Thomas, D. C., C. B. Brewer, et M. G. Roth. 1993. Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J. Biol. Chem.* **268**:3313-3320.

Tiganos, E., J. Friberg, B. Allain, N. G. Daniel, X.-J. Yao, et É. A. Cohen. 1998. Structural and functional analysis of the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *Virology* **251**:96-107.

Tiganos, E., X.-J. Yao, J. Friberg, N. Daniel, et É. A. Cohen. 1997. Putative α -helical structures in the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein and CD4 are involved

in binding and degradation of the CD4 molecule. *J. Virol.* **71**:4452-4460.

Turner, B. G., et M. S. Summers. 1999. Structural Biology of HIV. *J. Mol. Biol.* **285**:1-32

Van Meer, G., B. Gumbiner, et K. Simons. 1986. The tight junctions does not allow lipid molecules to diffuse from one epithelial cell to the next. *Nature* **322**:639-641.

Varmus, H. 1988. Retroviruses. *Science* **240**:1427-1435.

Walter, P., R. Gilmore, et G. Blobel. 1984. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* **38**:5-8.

Wang, C., R. A. Lamb, et L. H. Pinto. 1994. Direct measurement of the influenza A virus M2 protein ion channel activity in mammalian cells. *Virology* **205**:133-140.

Watkins, B. A., R. Crowley, A. E. Davis, A. T. Louie, et M. S. Reitz, Jr. 1997. Syncytium formation induced by human immunodeficiency virus type 1 isolates correlates with affinity for CD4. *J. Gen. Virol.* **78**:2513-2522.

Wei, P., M. E. Garber, S.-M. Fang, W. H. Fischer, et K. A. Jones. 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**:451-462.

Weissenhorn, W., A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, et D. C. Wiley. 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**:426-430.

Welker, R., H. Kottler, H. R. Kalbitzer, et H. G. Krausslich. 1996. Human immunodeficiency virus type-1 Nef protein is

incorporated into virions particles and specifically cleaved by the viral proteinase. *Virology* **219**:228-236.

Wiegers, K., G. Rutter, H. Kottler, U. Tessmer, H. Hohenberg, et H.-G. Krausslich. 1998. Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites. *J. Virol.* **72**:2846-2854.

Wilkinson, P. C., et A. Higgins. 1987. OKT3-activated locomotion of human blood lymphocytes: a phenomenon requiring contact of T cells with Fc receptor-bearing cells. *Immunology* **60**:445-451.

Willey, R. L., A. BucklerWhite, et K. Strebel. 1994. Sequences present in the cytoplasmic domain of CD4 are necessary and sufficient to confer sensitivity to the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein. *J. Virol.* **68**:1207-1212.

Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, et K. Strebel. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulate the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J. Virol.* **66**:226-234.

Wisher, M. H., et W. H. Evans. 1975. Functional polarity of rat hepatocyte surface membrane: isolation and characterization of plasma membrane subfractions from the blood-sinusoidal, bile-canalicular and contiguous surfaces of hepatocyte. *Biochem. J.* **146**:375-388.

Wyatt, R., P. D. Kwong, E. Desjardins, R. W. Sweet, J. Robinson, W. A. Hendrickson, et J. G. Sodroski. 1998. The antigenic structure of the HIV gp 120 envelope glycoprotein. *Nature* **393** : 705-710.

Wyss, S., C. Berlioz-Torrent, M. Boge, G. Blot, S. Höning, R. Benarous, et M. Thali. 2001. The highly conserved C-

terminal dileucine motif in the cytosolic domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is critical for its association with the AP-1 clathrin adapter. *J Virol.* **75**:2982-2992.

Yao, X.-J., J. Friberg, F. Checroune, S. Gratton, F. Boisvert, R. P. Sekaly, et É. A. Cohen. 1995. Degradation of CD4 induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: a predicted alpha-helix structure in the proximal cytoplasmic region of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *Virology* **209**:615-623.

Yao, X. J., H. Göttinger, W. A. Haseltine, et É. A. Cohen. 1992. Envelope glycoprotein et CD4 independence of *vpu*-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J. Virol.* **66**:5119-5126.

Yu, X., Y. Xin, Z. Matsuda, T. H. Lee, et M. Essex. 1992. The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J. Virol.* **66**:4966-4971.

Zang, Y., H. Qian, Z. Love, et E. Barklis. 1998. Analysis of the assembly function of the human immunodeficiency virus type 1 gag protein nucleocapsid domain. *J. Virol.* **72**:1782-1789.

Zhou, W., L. J. Parent, J. W. Wills, et M. D. Resh. 1994. Identification of a membrane binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interact with acidic phospholipids. *J. Virol.* **68**:2556-2569.

ANNEXE

Polarized Human Immunodeficiency Virus Budding in Lymphocytes Involves a Tyrosine-Based Signal and Favors Cell-to-Cell Viral Transmission

JULIE DESCHAMBEAULT,¹ JEAN-PHILIPPE LALONDE,^{1,2} GUILLERMO CERVANTES-ACOSTA,¹
ROBERT LODGE,^{1†} ÉRIC A. COHEN,¹ AND GUY LEMAY^{1,2*}

*Département de Microbiologie et Immunologie¹ and Groupe de Recherche en Transport Membranaire,²
Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada*

Received 18 August 1998/Accepted 19 February 1999

Maturation and release of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is targeted at the pseudopod of infected mononuclear cells. However, the intracellular mechanism or targeting signals leading to this polarized viral maturation are yet to be identified. We have recently demonstrated the presence of a functional YXXL motif for specific targeting of HIV-1 virions to the basolateral membrane surface in polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cells (MDCK). Site-directed mutagenesis was used to demonstrate that the membrane-proximal tyrosine in the intracytoplasmic tail of the HIV-1 transmembrane glycoprotein (gp41) is an essential component of this signal. In the present study, immunolocalization of viral budding allowed us to establish that this tyrosine-based signal is involved in determining the exact site of viral release at the surface of infected mononuclear cells. Substitution of the critical tyrosine residue was also shown to increase the amount of envelope glycoprotein at the cell surface, supporting previous suggestions that the tyrosine-based motif can promote endocytosis. Although alteration of the dual polarization-endocytosis motif did not affect the infectivity of cell-free virus, it could play a key role in cell-to-cell viral transmission. Accordingly, chronically infected lymphocytes showed a reduced ability to transmit the mutant virus to a cocultivated cell line. Overall, our data indicate that the YXXL targeting motif of HIV is active in various cell types and could play an important role in viral propagation; this may constitute an alternative target for HIV therapeutics and vaccine development.

The last step in the viral multiplication cycle of enveloped viruses is the maturation and release of viral particles together with acquisition of the lipid envelope. In most retroviruses, including human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), this is accomplished by budding at the plasma membrane; where the viral envelope glycoproteins are incorporated into the released virions. Retroviruses are peculiar among enveloped viruses in that viral glycoproteins are not required for the actual budding process (7, 16, 41). In the absence of these proteins, the viral capsids are assembled and released with their lipid envelope devoid of viral glycoproteins; as a result, the virions produced are noninfectious.

It is now well established that the plasma membrane surface of eucaryotic cells presents distinct protein and lipid compositions in specific membrane domains (4, 18, 42, 50). Although most studies have been performed with epithelial cells, in which well-defined apical and basolateral surfaces can be distinguished, the same phenomenon also seems to exist in other cell types. Lymphocytes are one such example of cells exhibiting a definite form of polarization at their membrane surface. This has been best demonstrated on activated lymphocytes, which developed cytoplasmic projections called uropodes (2,

56, 57, 58). It was also shown that specific cytokines are able to induce this polarization phenotype (8).

In accordance with the differentiated nature of the eucaryotic plasma membrane, viral budding is often seen as "polarized," being targeted to specific regions of the cell surface. This most often results from the transport of viral envelope glycoproteins to the corresponding membrane regions. This phenomenon has been studied mostly with epithelial cells, showing that different viruses will preferentially or exclusively bud from either the apical or basolateral membrane domain (44, 45, 53). There is much less information about polarized viral release in other cell types. It has been reported that viral budding can occur from either axonal extensions or the cell body in infected neuronal cells, with the site of budding depending on the virus examined (6, 9, 10, 43, 55).

In the last few years, evidence of a polarized release of HIV-1 in epithelial cells has been accumulating. It has been shown that this release is generally restricted to the basolateral surface. This is clearly due to targeting of the envelope glycoprotein since, in its absence, viral release occurs from both the apical and basolateral poles of the cells (13, 19, 27, 34). Interestingly, budding of HIV virions was also seen to be polarized at the surface of infected lymphocytes (12, 36, 38, 39, 48). Viral release is observed mostly at one pole, generally corresponding to contact sites between lymphocytes or with a solid support (35, 36). Both types of contact may generate a cell surface analogous to the basolateral domain of epithelial cells. Supporting this idea, it has long been known that vesicular stomatitis virus destined for the basolateral surface of epithelial cells is released through these contact sites when isolated epithelial cells are allowed to reattach to a solid support or interact with each other in suspension (42, 45). It has also been suggested

* Corresponding author. Mailing address: Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7. Phone: (514) 343-2422. Fax: (514) 343-5701. E-mail: guy.lemay@umontreal.ca.

† Present address: Cell Biology and Metabolism Branch, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-5430.

that cytoskeletal elements located underneath the cell surface may play an important role in the differentiation of distinct membrane domains for epithelial cells, as well as in the reorganization of cell morphology for lymphocytes (2, 32, 54). A specific distribution of cytoskeletal elements underlying sites of HIV budding was shown and supports the idea that cytoskeletal elements are also involved in defining viral assembly sites (37).

Although their exact nature remains controversial, it is now generally believed that specific targeting signals are present on proteins destined for different membrane domains. Basolateral signals seem to consist of either dileucine motifs (26) or, more commonly, tyrosine-based motifs in a general Y-X-X-(aliphatic or aromatic) consensus (18, 20, 28, 31, 51). Such tyrosine-based motifs are also often associated with endocytosis signals, and there can be an overlap between these two classes of motifs (5, 11, 47, 49). It has been reported that replacement of a tyrosine, analogous to the substitutions shown to abolish HIV polarized budding in epithelial cells, results in decreased endocytosis and accumulation of envelope glycoproteins at the cell surface of lymphocytes infected with either HIV-1 or simian immunodeficiency virus (SIV) (24, 47, 49). Some evidence was also presented for a uniform cell surface glycoprotein distribution of a similar SIV mutant, in contrast to the wild-type envelope, which appears to be restricted mostly to one pole of lymphocytes (11, 24, 49).

In the present study, mutant HIV strains altered in their basolateral polarization signal were examined in infected mononuclear cells to determine if the tyrosine-based polarization signal of HIV is also active in such cell types and could play a role in viral pathogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Proviral constructs. Site-directed mutagenesis of envelope expression vectors has been described previously (31). A *KpnI-KpnI* fragment (nucleotides 3701 to 5893) from the wild-type HIV provirus HXBc2 (14, 40) was introduced in the mutated envelope expression vectors to reestablish the original sequences essential for Tat expression (15). Proviral constructs were derived by subcloning a *Sall-BamHI* fragment (nucleotides 5331 to 8017) from these different mutated hybrid envelope fragments into an HXBc2 proviral construct harboring a *BglII-BglII* deletion (nucleotides 7163 to 7628) in the region encoding the envelope glycoprotein. This strategy facilitated the screening of proviruses reconstructed with the different mutated but full-length glycoprotein-encoding fragments. All mutations were confirmed by DNA sequencing.

Cells. The Jurkat CD4⁺ human lymphoid cell line was maintained in RPMI 1640 medium containing 10% fetal calf serum and 1% antibiotics (3). The simian virus 40-transformed African green monkey kidney COS-7 and the HeLa-CD4-LTR- β -gal cell lines used in this study were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 8% fetal calf serum and 1% antibiotics. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from a normal donor were purified and activated as previously described (29).

Transfection of Jurkat lymphocytes. Human Jurkat lymphocytic cells were transfected with the different proviral DNA constructs (15 μ g of proviral DNA per 10⁷ cells) by using a DEAE-dextran technique essentially as described previously (60). The number of surviving cells was determined every 3 days by using trypan blue exclusion as a criteria for viability. The cells were then centrifuged, resuspended in fresh medium, and diluted to a concentration of 500,000 cells/ml for further growth. After maximum cell death and cytotoxicity induced by HIV during viral multiplication, the remaining cells were amplified as a total population and used for subsequent experiments. In some experiments, the chronically infected Jurkat cells were activated overnight with 12-phorbol-13-myristate acetate (PMA; Sigma) at a final concentration of 160 nM to upregulate HIV-1 gene expression (46).

Infection of human PBMCs. Infectious virus was recovered from COS cells transfected with either wild-type or mutant proviral DNAs, and its titer was determined with the HeLa-CD4-LTR- β -gal indicator cell line (23). Activated PBMCs were then infected at a multiplicity of infection of 1. Development of the infection was monitored as described for Jurkat cells by measuring both cell viability and viral reverse transcriptase activity (25).

FACS analysis. The presence of viral envelope glycoprotein at the cell surface was measured with a fluorescence-activated cell sorter (FACS). Cells were fixed with 2% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) before being processed. Briefly, the cells were incubated in a 1/200 dilution of human anti-

HIV antiserum 162 and, following adsorption for 1 h on ice, washed three times with PBS and reincubated with a 1/100 dilution of fluorescein-conjugated goat anti-human antibody (Boehringer Mannheim). Following incubation and three washes in PBS, the cells were analyzed with a FACStar cytofluorometer (Beckton Dickinson).

Immunofluorescence analysis. Immunological detection of p24 capsid protein was performed with cells dried on 15-well slides. The cells were fixed and permeabilized with a 50:50 mixture of cold acetone and methanol, preincubated for 30 min at 25°C in PBS containing 2% nonfat milk, and then incubated for 2 h with a monoclonal mouse anti-p24 capsid protein without dilution. The cells were then washed and reincubated for 30 min with a 1:50 dilution of fluorescein-conjugated goat anti-mouse antibody before being given their final washes. To determine the percentage of polarization, the cells were examined by fluorescence microscopy with a Axioskop microscope (Zeiss), using adequate filters for visualization of green fluorescence (fluorescein with a 530-nm wavelength). Confocal laser scanning microscopy was performed with an LSM 410 microscope (Zeiss) equipped with a Pln-APOCHROMAT 63 \times oil immersion objective and an Ar/Kr laser. The fluorescein isothiocyanate images were obtained by scanning the cells with the 488-nm laser and filtering the emission with a 515- to 540-nm band-pass filter. For each cell studied, an image of the additive signal through its whole thickness was first digitized and the confocal serial sections were then scanned.

Efficiency of cell-to-cell viral transmission. Chronically infected nonadherent Jurkat cells, producing either wild-type or Y712S virus, were added at a very low concentration (3,000 cells) to the indicator cell line HeLa-CD4-LTR- β -gal cells (300,000 cells) in six-wells plates in duplicate. After intercellular contact for different times (1, 4, or 16 h), the indicator epithelial cells were washed and cultivated for 48 h before the cells were stained for β -galactosidase expression as previously described (23); positive (blue) cells were then counted under the microscope at \times 100 magnification. Infectivity of cell-free virus was tested by infection of HeLa-CD4-LTR- β -gal cells with the equivalent of 300,000 cpm of reverse transcriptase activity determined on 50- μ l aliquots (25); staining for β -galactosidase expression was performed 48 h later.

RESULTS

Cell surface expression of mutant glycoproteins. Chronically infected Jurkat CD4⁺ lymphocytes were established by transfection of plasmids containing either wild-type or mutated HIV-1 proviral DNA to assess the functional properties of mutant envelope glycoproteins in lymphocytes. It has been previously established that virus mutants can replicate efficiently in such transfected cells. Kinetics of cell killing, development of viral reverse transcriptase activity, peak reverse transcriptase levels, and reverse transcriptase levels following establishment of chronically infected cells were all identical when wild-type and mutant viruses were compared (reference 28 and unpublished data). In these mutants (Fig. 1), the intracytoplasmic membrane-proximal tyrosine critical in the basolateral targeting signal (tyrosine 712) was replaced by a serine residue (Y712S), a nonconservative substitution that removes the aromatic ring while keeping a hydroxyl side chain. Alternatively, the same tyrosine was replaced by an alanine (Y712A; nonconservative substitution) or a phenylalanine (Y712F; the aromatic ring is conserved). The level of envelope glycoprotein at the cell surface was first examined by flow cytometric analysis (FACS). The analysis was performed on cells taken at 9 days posttransfection, a time point slightly before the maximal virus titer was achieved and corresponding to the peak in cell death and syncytium formation (28); at this point, essentially all the cells were infected and strongly positive by the p24 immunofluorescence assay (data not shown). Substitutions of the membrane-proximal tyrosine 712 residue result in an increased level of cell surface glycoprotein (Fig. 2a); the mean fluorescence intensity was about threefold higher in cells expressing the Y712S (or Y712A) mutant than in cells expressing the wild type and was 50% higher in cells expressing the Y712F mutant than in cells expressing the wild type. In parallel, the same analysis was performed on chronically infected lymphocytes (21 days posttransfection) induced with PMA; this treatment favors the upregulation of HIV-1 gene expression (46). Under these conditions, two different cell populations were

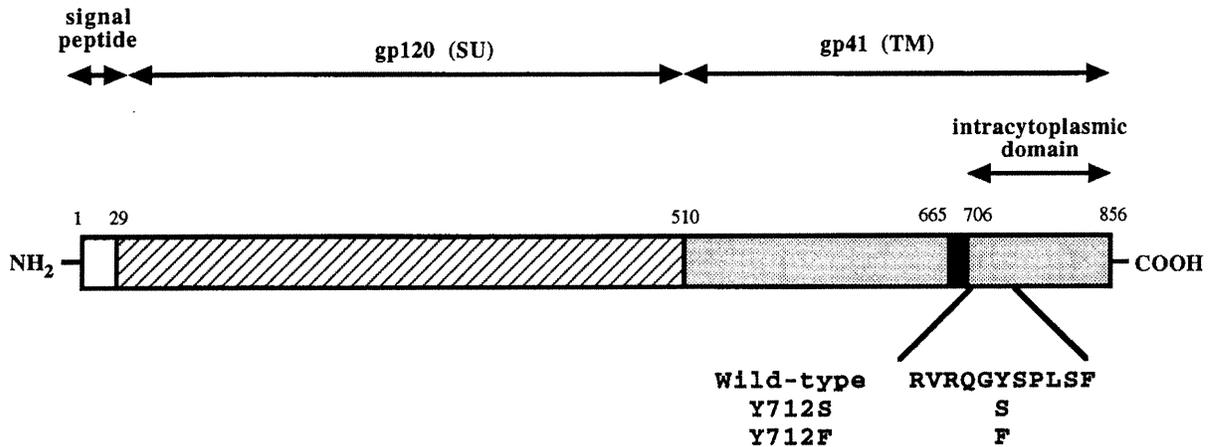


FIG. 1. Schematic representation of the HIV envelope glycoprotein. A schematic view of the glycoprotein primary structure (856 amino acids) is presented. The amino acid sequence of the intracytoplasmic juxtamembrane region is presented underneath, as well as the nature of the mutations used in the present study.

observed by FACS analysis, and the mean fluorescence intensity in the population of strongly positive cells was still two- to threefold lower than that observed at the peak of viral production (Fig. 2b). Nevertheless, the relative levels of surface envelope glycoproteins observed with the different mutants were similar when such chronically infected cell populations were compared to the cells at the peak of viral production. Again, replacement of tyrosine 712 with a serine (or alanine) and, to a lesser extent, conservative replacement with a phenylalanine increase the level of envelope glycoprotein at the cell surface.

It therefore appears that the amount of cell surface envelope glycoprotein is normally downmodulated by the amino acid motif encompassing the membrane-proximal tyrosine residue. This phenomenon is observed in infected cells and is still observed at the time of chronic infection.

Polarization of viral budding. The site of viral budding at the cell surface of infected Jurkat lymphocytes was examined to determine if mutation of the basolateral polarization signal could also affect the localization of viral budding in these cells. Permeabilization of the cells prior to the immunodetection

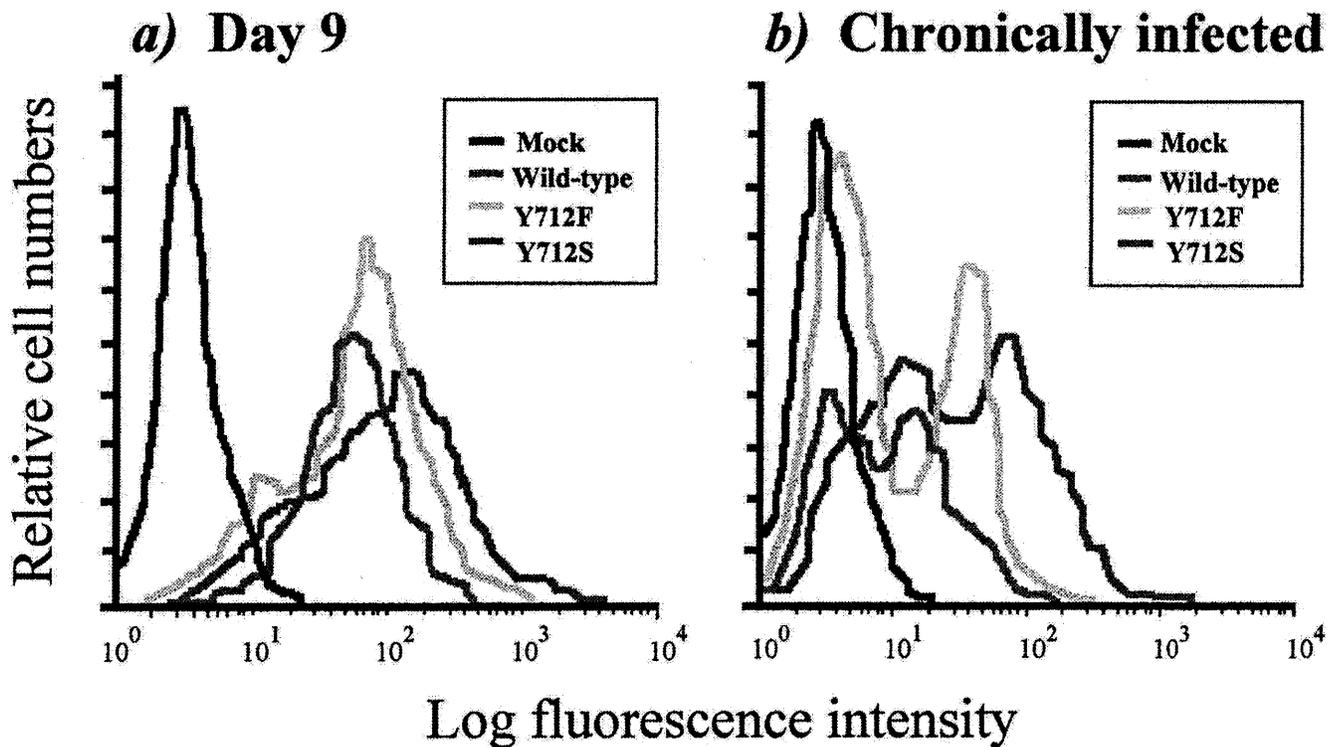


FIG. 2. Cell surface expression of the HIV envelope glycoprotein. Transfected Jurkat cells were subjected to FACS analysis with an anti-HIV antiserum on unfixed cells. The analysis was performed on day 9 posttransfection (a) as well as on chronically infected Jurkat cells induced with PMA soon after chronic infection was established (b). For both panels, results are presented for the mock infection (noninfected) and infection with wild-type, mutant Y712S (identical results were obtained with Y712A), and mutant Y712F viruses.

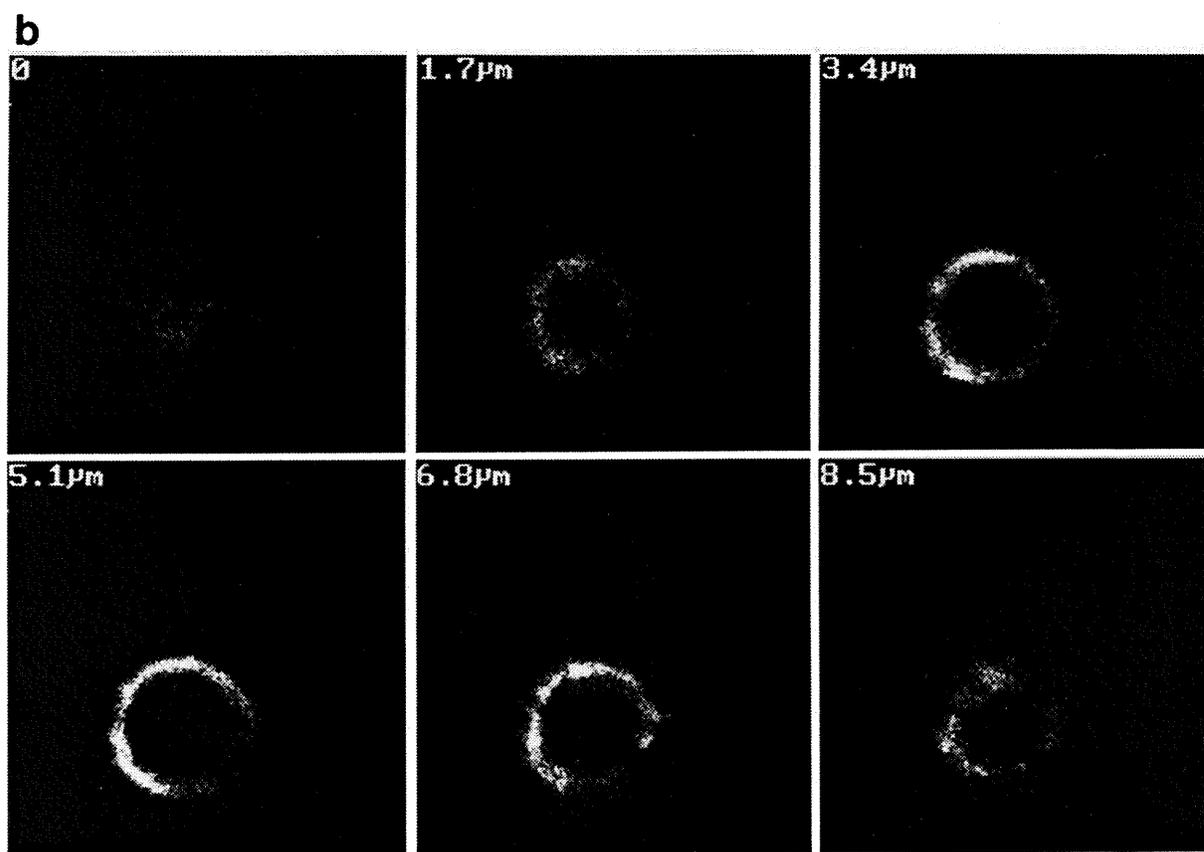
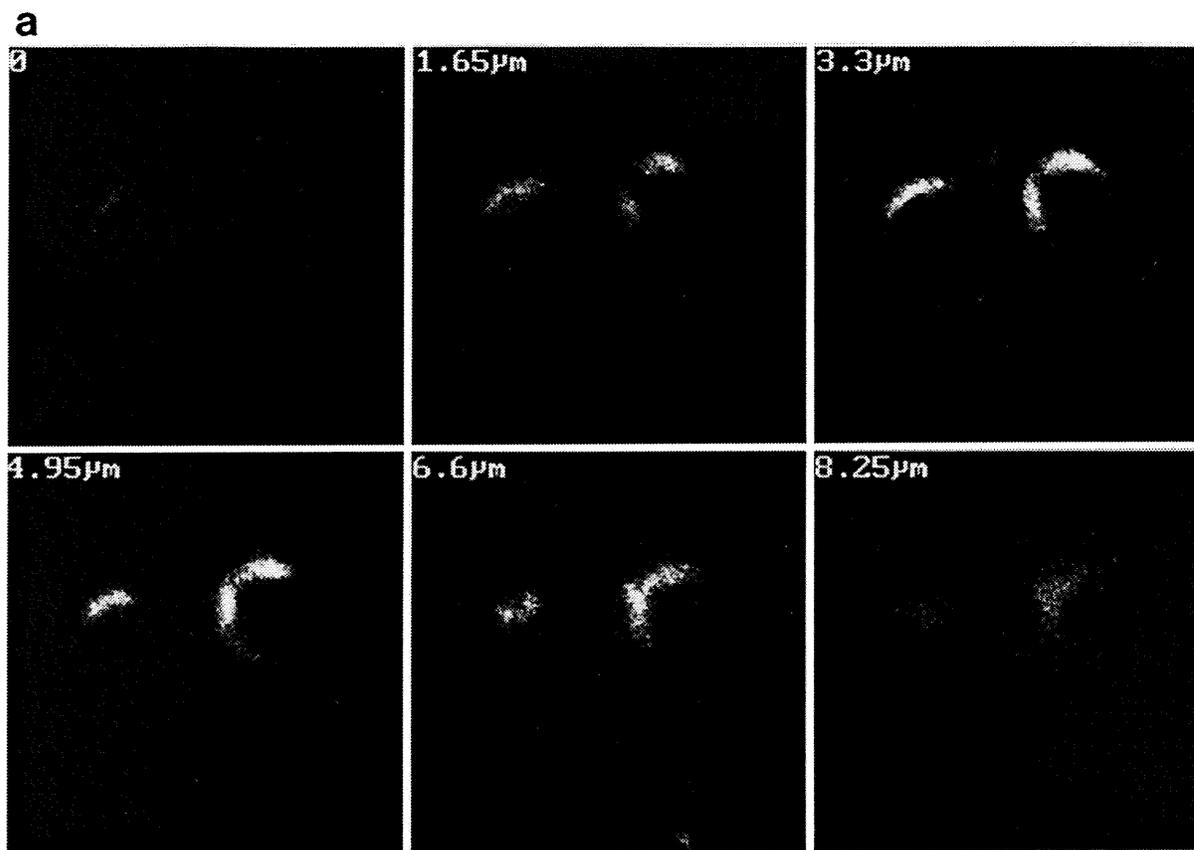


FIG. 3. Polarized localization of p24. Transfected Jurkat cells at the peak of viral replication (9 days posttransfection) were analyzed by confocal microscopy with a monoclonal anti-p24 antibody as described in Materials and Methods. Cells transfected with wild-type proviral DNA exhibit polarized localization of the p24 protein (a), while cells transfected with mutant Y712S DNA showed a lack of polarization (b). Numbers in top left corners indicate the depth of each serial section. Magnification, $\times 360$.

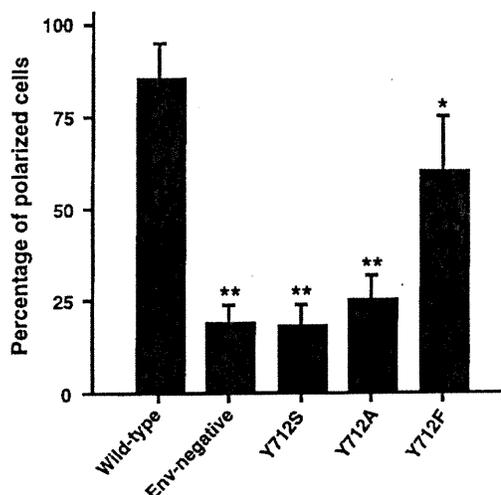


FIG. 4. Percentage of Jurkat cells exhibiting polarized p24 localization. Transfected Jurkat cells were permeabilized and examined by immunofluorescence with the anti-p24 antibody. Polarization was scored as positive when clear restriction of p24 staining to less than one-half of cell periphery was observed at one pole of the cell. The wild type, envelope-negative, and different mutant viruses were examined; in each case, 100 cells were examined and two independent readings were taken by two different investigators who were unaware of the nature of the different samples. Mean results are presented with error bars indicating standard deviation. Statistical significance was established by Student's *t* test; significant differences from wild type at $P < 0.05$ (*) or $P < 0.005$ (**) are indicated.

procedure allowed us to use an antibody directed against the major capsid protein p24 to localize the region of the cell surface where assembly and budding of the capsid occur. A preferential viral budding through one pole of the cell was easily demonstrated and was best visualized by confocal microscopy examination of serial sections of cells infected with wild-type virus at the time of peak viral production (Fig. 3a). Since these experiments were performed on fixed and permeabilized cells for the detection of a nonmembrane protein, the phenomenon observed could not be due to antibody "capping" but must be the consequence of an actual transport of the protein to this specific region underneath the cell membrane surface. Essentially identical results were observed when chronically infected cells were examined, except that only a percentage of the cells had a sufficient expression level for immunofluorescence detection (data not shown).

When the different mutants were examined, it was quite clear that the membrane-proximal tyrosine was essential for the polarization phenotype, as previously observed in epithelial cells (27, 28). The distribution of fluorescence appeared uniform, without any apparent patches or preferential pole of release at the surface of lymphocytes infected with viruses whose membrane-proximal tyrosine was substituted (Fig. 3b).

To quantitate the data, cells processed for immunofluorescence were examined by two different investigators who were unaware of the nature of the different samples. One hundred cells were counted for each sample, and each cell was scored positive or negative for the polarization phenotype (Fig. 4); cells were considered positive when the signal was restricted to less than half of the cell periphery. These data confirmed that tyrosine 712 is critical for the polarization phenotype of viral budding in lymphocytes since only 20 to 25% of the cells infected with the mutant were scored as exhibiting an apparent polarized p24 distribution while more than 85% of cells infected with the wild type exhibited this phenotype. A conser-

vative replacement of tyrosine 712 by phenylalanine had only a partial effect, with 55 to 60% of the cells showing some evidence of polarization of viral budding. The presence of an aromatic ring thus appears critical for the polarization signal, as also observed for polarized budding in epithelial cells (28) and for the downmodulation of the viral glycoprotein at the cell surface (Fig. 2). The budding of a mutant virus defective for envelope expression was also examined. This mutant proviral DNA was *trans*-complemented by cotransfection with a wild-type envelope expression vector; the enveloped virions transiently produced in COS cells were then used to infect Jurkat lymphocytes. Budding of the resulting nonenveloped virions produced 48 h later in these lymphocytes was nonpolarized, with the p24 protein being located essentially all around the cells (Fig. 4 and data not shown). This further supports our assumption that polarization of viral budding is a property associated exclusively with the envelope glycoprotein.

In addition to the Jurkat cell line, the polarization of viral budding in primary human PBMCs was briefly investigated. These cells were infected with either wild-type or Y712S mutant virus, and both viruses were found to replicate with similar kinetics in these cells. Cells were taken at the time of peak viral replication and examined by immunofluorescence for p24 distribution. Despite the somewhat heterogeneous nature of this cell population, about 60% of wild-type-infected cells that exhibited a detectable immunofluorescence signal showed a concentration of this signal to a distinct membrane region; this polarization was apparently lost in the Y712S mutant since only 15 to 20% of the cells exhibited such a concentrated fluorescence signal (data not shown).

Polarization of viral release in Jurkat cells was finally confirmed by electron microscopy, which showed that the detection of p24 in a specific region of the cell surface did, in fact, reflect a viral budding specifically restricted at these plasma membrane regions. Wild-type virus was released exclusively at one pole of the cells, while the Y712S mutant was found in the form of complete or budding virions on various plasma membrane regions essentially all around the cells (data not shown).

Cell-to-cell viral transmission. Having established that the tyrosine-based polarization signal is functional in human mononuclear cells, we examined the effect of this signal on viral multiplication. It was previously reported that the wild-type and mutant viruses affected in their polarization phenotype progressed at very similar rates in the transfected-cell population (28). However, in these experiments leading to the establishment of chronically infected cells, propagation via highly concentrated cell-free virus is probably predominant. A difference in the efficiency of early transmission by cell-to-cell contact was thus still a possibility and will be the most likely consequence of a change in the polarized-budding phenotype that could target viral budding at sites of intercellular contact. To assess more directly the effect of polarized release on viral transmission between cells, small numbers of Jurkat cells chronically infected with the wild-type or Y712S mutant virus were applied to the indicator cell line HeLa-CD4-LTR- β -gal, for 1, 4, or 16 h. After 48 h, the indicator cells were fixed and stained to investigate the efficiency of transmission between lymphocytes and epithelial cells. In this assay, transmission of viral infection was found to be three to four times more efficient from Jurkat cells chronically infected with the wild-type virus than from cells infected with the mutant (Fig. 5a). The difference observed could not be due to a reduction in viral infectivity per se. Chronically infected cells established with either wild-type or mutant viruses released identical amount of viruses, as established by their similar reverse transcriptase levels. These viruses were tested for their infectivity as cell-free

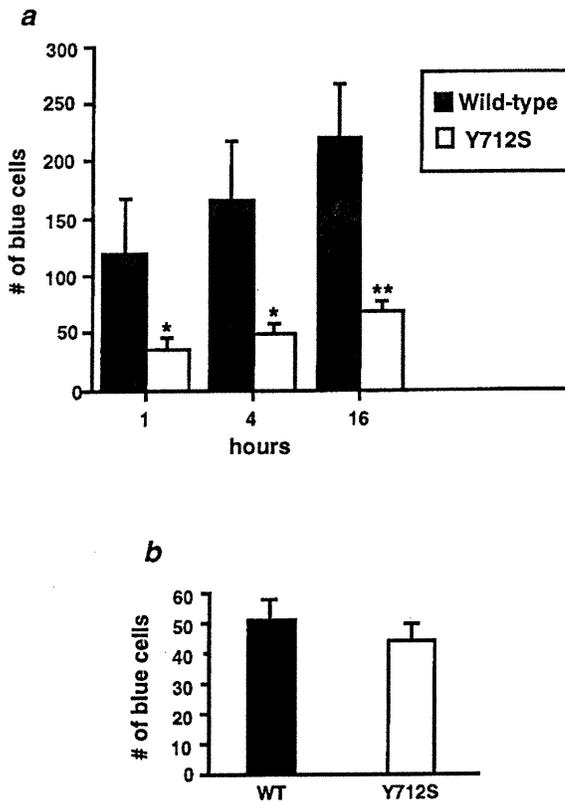


FIG. 5. Efficiency of cell-to-cell viral transmission. (a) Chronically infected Jurkat cells (3,000 cells) expressing either the wild type or the Y712S mutant were seeded in the presence of 300,000 HeLa-CD4-LTR- β -gal cells for 1, 4, or 16 h. The number of blue cells was counted 48 h after the beginning of the contact; the results are presented as the average of three independent experiments with error bars indicating standard deviation. (b) Viruses were recovered from the same chronically infected cell lines used in panel a. The same viral production, as measured by a reverse transcriptase assay, was observed in these cells, and the same volumes of virus inoculum were thus used to measure the infectivity of cell-free viruses on HeLa-CD4-LTR- β -gal cells. Results for the wild type (WT) and Y712S mutant are presented as the average of three independent experiments with error bars indicating standard deviation. Statistical significance was established by Student's *t* test; significant differences from wild type at $P < 0.02$ (*) or $P < 0.005$ (**) are indicated.

viruses by using the same HeLa indicator cell line. As previously observed for transiently released viruses (28), the infectivity of mutant viruses released from chronically infected cells was found to be identical to that of wild-type virus in this assay (Fig. 5b).

DISCUSSION

Various evidence has previously led us to suspect that the targeting motif, previously identified as a basolateral signal for HIV-1 budding in epithelial cells, could play a role during viral maturation in human mononuclear cells. In epithelial cells, regions of contact with other cells or with a solid support are considered analogous to basolateral surfaces; viruses normally budding at the basolateral surface (for example, vesicular stomatitis virus) are specifically released at cell-to-cell or cell-substrate interfaces, while apically targeted viruses (for example, influenza virus) are released mostly through free cell surfaces. Series of observations have also shown a preferential budding of HIV-1 and human T-cell leukemia virus type 1 at sites where infected lymphocytes, or monocytes, are in contact

with epithelial cells (1, 38, 39, 61). Additional studies revealed that this specific budding at one pole of infected cells is not restricted to intercellular contact sites but can also be found on individual infected monocytes (37).

In the present study, it has been clearly shown that the intracytoplasmic membrane-proximal tyrosine residue is involved in this polarized budding phenotype of HIV in lymphocytes, as was the case in polarized epithelial MDCK cells. It should be mentioned that the presence of a tyrosine-based signal involved in the polarized budding of SIV in lymphocytes had also been previously suggested. In this case, the polarization of the envelope glycoprotein at the cell surface was affected when the membrane-proximal tyrosine 723 residue was replaced by another amino acid (24), and the resulting viruses appeared to be less pathogenic (21). In the last few years, similar tyrosine-based signals have been found in various basolateral proteins and have been associated with various types of targeted protein delivery (5, 20, 22, 30, 31, 33, 51, 52). A tyrosine-based signal has been proposed to be involved in endocytosis of the HIV glycoprotein at the cell surface (47), while this signal is inhibited in the presence of an excess of viral capsid proteins (11). An increase in the amount of envelope glycoproteins at the cell surface with the mutant proviral constructs used in the present study suggests that the endocytosis signal is still functional under conditions of a normal ratio between capsid and envelope proteins. There is thus at least a partial overlap between the signals responsible for basolateral delivery and for endocytosis of HIV-1 envelope glycoprotein at the cell surface, and both signals can be active in lymphocytes. It is suggested that endocytosis maintains limited levels of the viral glycoprotein at the cell surface whereas the signal is inhibited by interaction with capsid protein in the process of viral budding (30, 51).

It remains to be established if both targeted viral budding and endocytosis of envelope glycoprotein from the cell surface are actually important during viral multiplication and/or viral pathogenesis. Observations showing preferential release at intercellular contact zones did suggest a role for polarization in viral transmission from infected to uninfected cells (38, 39). It is generally accepted that the transmission of virus by close contact between infected and uninfected cells is much more efficient than transmission by cell-free viruses. This could play an important role during sexual transmission from infected cells toward the epithelial surface of mucosa.

In the present study, the presence of the polarization signal was shown to favor propagation of the viral infection under conditions where viral propagation by cell-to-cell contact is likely to be predominant. The effect was observed when small numbers of chronically infected cells producing limited amounts of viruses were used, thus mostly avoiding transmission via released cell-free virus. A short delay in viral propagation for the mutant virus was also occasionally observed at very early times in transfection experiments or when infection with cell-free virus was performed at a very low multiplicity of infection, two situations where cell-to-cell propagation would be transiently predominant (data not shown). We believe that cell-to-cell transmission from small numbers of cells producing low levels of virus is representative of a situation that could occur in vivo, especially during sexual transmission, when infected mononuclear cells transmit the virus at mucosal surfaces. This also suggests that the polarized-budding phenotype of HIV could have important consequences during viral propagation in the infected host by favoring transmission from antigen-presenting cells to interacting T lymphocytes. This importance of tyrosine-based signals in retroviral pathogenesis is further supported by analogy to other viruses. For bovine leu-

kemia virus, a tyrosine-based motif was shown to be essential for infection and maintenance of a high viral load in infected animals (59). Furthermore, two of three tyrosine-based motifs in the intracytoplasmic tail of the transmembrane protein are apparently involved in signal transduction pathways (59). This might have significance, considering that cytoskeletal elements in polarized lymphocytes can be colocalized with signal-transducing protein kinase C (17). Also, during T-cell activation, tyrosine phosphorylation of different substrates is induced at the site of polarization. It is thus quite possible that retroviruses harboring tyrosine-based signals can take advantage of a normal cellular process, by which various specific molecules are relocalized to the pseudopod during lymphocyte activation, in order to facilitate an efficient viral transmission from infected to uninfected cells. The polarization signal in HIV could thus become a new therapeutic target to limit cell-to-cell propagation of the virus.

ACKNOWLEDGMENTS

J.D. and J.-P.L. contributed equally to this work.

We thank Serge Sénéchal and Hugo Diluydy for performing the FACS analysis and confocal microscopic examination, respectively, and for their help in interpreting the results. We thank M. Robert Alain from IAF (Institut Armand Frappier) for performing electron microscopic observations and Xian Jian Yao for providing us with purified human PBMCs. We thank Carole Danis, Nicole Rougeau, Isabelle Courchesne, and Johanne Mercier for technical support.

This work was supported by grants from the National HIV Research and Development Program (NHRDP) and Medical Research Council of Canada (MRC) (to G.L. and É.A.C.) as well as a Fonds pour la formation de chercheur et l'aide à la recherche (FCAR) group grant. É.A.C. is the recipient of an MRC scientist award, and G.L. is the recipient of a scholarship from the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). J.P.L. was the recipient of a FCAR studentship through the Groupe de recherche en transport membranaire, J.D. and R.L. were recipients of NHRDP studentships, and G.C.-A. is the recipient of a studentship from the Ministère de l'éducation du Québec.

REFERENCES

- Bourinbaïar, A. S., and D. M. Phillips. 1991. Transmission of human immunodeficiency virus from monocytes to epithelia. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 4:56-63.
- Carpén, O., I. Virtanen, V. P. Lehto, and E. Saksela. 1983. Polarization of NK cell cytoskeleton upon conjugation with sensitive target cells. *J. Immunol.* 131:2695.
- Cohen, É. A., G. Dehni, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1990. Human immunodeficiency virus *vpr* product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* 64:3097-3099.
- Compans, R. W., and R. V. Srinivas. 1991. Protein sorting in polarized epithelial cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 170:141-181.
- Dagermont, C., A. Le Bivic, S. Rothemberger, B. Lacopetta, and L. C. Kuhn. 1993. The internalization signal and the phosphorylation site of transferrin receptor are distinct from the main basolateral sorting information. *EMBO J.* 12:1713-1721.
- de Hoop, M. J., and C. G. Dotti. 1993. Membrane traffic in polarized neurons in culture. *J. Cell Sci. Suppl.* 17:85-92.
- Delchambre, M., D. Gheysen, D. Thine, C. Thiriart, E. Jacobs, E. Verdin, M. Horth, A. Burny, and F. Bex. 1989. The gag precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles. *EMBO J.* 13:2653-2660.
- del Pozo, M. A., P. Sanchez-Mateos, M. Nieto, and F. Sanchez-Madrid. 1995. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J. Cell Biol.* 131:495-508.
- Dotti, C. G., and K. Simons. 1990. Polarized sorting of viral glycoproteins to the axon and dendrites of hippocampal neurons in culture. *Cell* 62:63-72.
- Dotti, C. G., J. Kartenbeck, and K. Simons. 1993. Polarized distribution of the viral glycoproteins of vesicular stomatitis, fowl plague and Semliki Forest viruses in hippocampal neurons in culture: a light and electron microscopy study. *Brain Res.* 610:141-147.
- Egan, M. C., L. M. Carruth, J. F. Rowell, X. Yu, and R. F. Siliciano. 1996. Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55^{gag} precursor protein. *J. Virol.* 70:6547-6556.
- Fais, S., M. R. Capobianchi, I. Abbate, C. Castilletti, M. Gentile, P. C. Fei, F. Ameglio, and F. Dianzani. 1995. Unidirectional budding of HIV-1 at the site of cell-to-cell contact is associated with co-polarization of intercellular adhesion molecules and HIV-1 viral matrix protein. *AIDS* 9:329-335.
- Fantini, J., S. Baghdigian, N. Yahi, and J. C. Chermann. 1991. Selected human immunodeficiency virus replicates preferentially through the basolateral surface of differentiated human colon epithelial cells. *Virology* 185:904-907.
- Fisher, A. G., E. Collalti, L. Ratner, R. C. Gallo, and F. A. Wong-Staal. 1985. Molecular clone of HTLV-III with biological activities. *Nature* 316:262-265.
- Gabuzda, D. H., A. Lever, E. Terwilliger, and J. Sodroski. 1992. Effects of deletions in the cytoplasmic domain in biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J. Virol.* 66:3306-3315.
- Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines, and M. De Wilde. 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor pr55^{gag} virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* 59:103-112.
- Gregorio, C. C., E. A. Repasky, V. M. Fowler, and J. D. Black. 1994. Dynamic properties of ankyrin in T lymphocytes: colocalization with spectrin and protein kinase C beta. *J. Cell Biol.* 125:345-358.
- Handler, J. S. 1989. Overview of epithelial polarity. *Annu. Rev. Physiol.* 51:729-740.
- Haston, W. S. 1987. F-actin distribution in polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Sci.* 88:495-501.
- Honing, S., and W. Hunziker. 1995. Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat Igp120 (lamp-1) in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 128:321-332.
- Hoxie, J. A. 1998. In vivo attenuation of SiVmac239 by mutation of a conserved Tyr in the TM cytoplasmic tail, abstr. 520. *In Proceedings of the 5th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections.*
- Hunziker, W., C. Harter, K. Matter, and I. Mellman. 1992. Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* 66:907-920.
- Kimpton, J., and M. Emerman. 1992. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated β -galactosidase gene. *J. Virol.* 66:2232-2239.
- LaBranche, C. C., M. M. Sauter, B. S. Haggarty, P. J. Vance, J. Romano, T. K. Hart, P. J. Bugelski, M. Marsh, and J. A. Hoxie. 1995. A single amino acid change in the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane molecule increases envelope glycoprotein expression on infected cells. *J. Virol.* 69:5217-5227.
- Lee, M. H., K. Sano, F. E. Morales, and D. T. Imagawa. 1987. Sensitive reverse transcriptase assay to detect and quantitate human immunodeficiency virus. *J. Clin. Microbiol.* 25:1717-1721.
- Letourneur, F., and R. A. Klausner. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 69:1143-1157.
- Lodge, R., H. Göttlinger, D. Gabuzda, É. A. Cohen, and G. Lemay. 1994. The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J. Virol.* 68:4857-4861.
- Lodge, R., J.-P. Lalonde, G. Lemay, and É. A. Cohen. 1996. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO J.* 16:695-705.
- Lodge, R., R. A. Subbramanian, J. Forget, G. Lemay, and É. A. Cohen. 1998. MuLV-based vectors pseudotyped with truncated HIV glycoprotein mediate specific gene transfer in CD4(+) peripheral blood lymphocytes. *Gene Ther.* 5:655-664.
- Marsh, M., A. Pelchen-Matthews, and J. A. Hoxie. 1997. Roles for endocytosis in lentiviral replication. *Trends Cell Biol.* 7:1-4.
- Matter, K., W. Hunziker, and I. Mellman. 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* 71:741-753.
- McNeill, H., M. Ozawa, R. Kemler, and W. J. Nelson. 1990. Novel function of the cell adhesion molecule uvomorulin as an inducer of cell surface polarity. *Cell* 62:309-316.
- Ohno, H., J. Stewart, M.-C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyataka, T. Saito, A. Gailusser, T. Kirchhausen, and J. S. Bonifacino. 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* 269:1872-1875.
- Owens, R. J., and R. W. Compans. 1989. Expression of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein is restricted to basolateral surfaces of polarized epithelial cells. *J. Virol.* 63:978-982.
- Pearce-Pratt, R., and D. M. Phillips. 1993. Studies of adhesion of lymphocytic cells: implications for sexual transmission of human immunodeficiency virus. *Biol. Reprod.* 48:431-445.
- Pearce-Pratt, R., D. Malamud, and D. M. Phillips. 1994. Role of the cytoskeleton in cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 68:2898-2905.
- Perotti, M.-E., X. Tan, and D. M. Phillips. 1996. Directional budding of human immunodeficiency virus from monocytes. *J. Virol.* 70:5916-5921.

38. Phillips, D. M., and A. S. Bourinbaier. Mechanism of HIV spread from lymphocytes to epithelia. *Virology* 186:261-273.
39. Phillips, D. M., V. R. Zacharopoulos, X. Tan, and R. Pearce-Pratt. 1994. Mechanisms of sexual transmission of HIV: does HIV infect intact epithelia? *Trends Microbiol.* 2:454-458.
40. Ratner, L., A. Fisher, L. L. Jagodzinski, H. Mitsuya, R. S. Liou, R. C. Gallo, and F. Wong-Staal. 1987. Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 3:57-69.
41. Rhee, S. S., and E. Hunter. 1990. Structural role of the matrix protein of type D retroviruses in gag polyprotein stability and capsid assembly. *J. Virol.* 64:4383-4389.
42. Rodriguez-Boulan, E., and W. J. Nelson. 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* 245:718-725.
43. Rodriguez-Boulan, E., and S. K. Powell. 1992. Polarity of epithelial and neuronal cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:395-427.
44. Rodriguez-Boulan, E., and D. D. Sabatini. 1978. Asymmetric budding of viruses in epithelial cell monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:5071-5075.
45. Rodriguez-Boulan, E. 1983. Membrane biogenesis: enveloped RNA viruses and epithelial polarity. *Mol. Cell Biol.* 1:119-170.
46. Rosenberg, Z. F., and A. S. Fauci. 1989. Induction of expression of HIV in latently or chronically infected cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5:1-4.
47. Rowell, J. F., P. E. Stanhope, and R. F. Siliciano. 1995. Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. *J. Immunol.* 155:473-488.
48. Sasaki, H., M. Nakamura, T. Ohno, Y. Matsuda, Y. Yuda, and Y. Nonomura. 1990. Myosin-actin interaction plays an important role in human immunodeficiency virus type 1 release from host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2026-2030.
49. Sauter, M. M., A. Pelchenmatthews, R. Bron, M. Marsh, C. C. Labranche, P. J. Vance, J. Romano, B. S. Haggarty, T. K. Hart, W. M. F. Lee, and J. A. Hoxie. 1996. An internalization signal In in the simian immunodeficiency virus transmembrane protein cytoplasmic domain modulates expression of envelope glycoproteins on the cell surface. *J. Cell Biol.* 132:795-811.
50. Sullivan, S. J., G. Daukas, and S. H. Zigmond. 1984. Asymmetric distribution of the chemotactic peptide receptor on polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* 99:1461-1467.
51. Thomas, D. C., C. B. Brewer, and M. G. Roth. 1993. Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J. Biol. Chem.* 268:3313-3320.
52. Thomas, D. C., and M. G. Roth. 1994. The basolateral targeting signal in the cytoplasmic domain of glycoprotein G from vesicular stomatitis virus resembles a variety of intracellular targeting motifs related by primary sequence but having diverse targeting activities. *J. Biol. Chem.* 269:15732-15739.
53. Tucker, S. P., and R. W. Compans. 1993. Virus infection of polarized epithelial cells. *Adv. Virus Res.* 42:187-247.
54. Vasiliev, J. M. Polarization of pseudopodial activities. 1991. *J. Cell Sci.* 98:1-4.
55. Weclewicz, K., M. Ekström, K. Kristensson, and H. Garoff. 1998. Specific interactions between retrovirus Env and Gag proteins in rat neurons. *J. Virol.* 72:2832-2845.
56. Wilkinson, P. C., and A. Higgins. 1987. OKT3-activated locomotion of human blood lymphocytes: a phenomenon requiring contact of T cells with Fc receptor-bearing cells. *Immunology* 60:445-451.
57. Wilkinson, P. C. 1987. Leucocyte locomotion: behavioural mechanisms for accumulation. *J. Cell Sci. Suppl.* 8:103-119.
58. Wilkinson, P. C. 1986. The locomotor capacity of human lymphocytes and its enhancement by cell growth. *Immunology* 57:281-289.
59. Willems, L., J. S. Gatot, M. Mamericks, D. Portetelle, A. Burny, P. Kerkhofs, and R. Kettman. 1995. The YXXL signalling motifs of the bovine leukemia virus transmembrane protein are required for in vivo infection and maintenance of high viral loads. *J. Virol.* 69:4137-4141.
60. Yao, X. J., R. A. Subbramanian, N. Rougeau, F. Boisvert, D. Bergeron, and É. A. Cohen. 1995. Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 VPR: role of predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J. Virol.* 69:7032-7044.
61. Zacharopoulos, V. R., M. E. Perotti, and D. M. Phillips. 1992. Lymphocyte-facilitated infection of epithelia by human T-cell lymphotropic virus type I. *J. Virol.* 66:4601-4605.