

Université de Montréal

Analyse du trafic et de la distribution intracellulaire de la protéine Gag du VIH-1
dans les cellules HEK 293T : importance de l'efficacité de la relâche virale

par
Alexandre Orthwein

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du
grade de Maître ès Sciences (M.Sc) en microbiologie et immunologie

Juin 2007

© Alexandre Orthwein 2007



w
4
U58
2007
v.107

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Analyse du trafic et de la distribution intracellulaire de la protéine Gag du VIH-1
dans les cellules HEK 293T : importance de l'efficacité de la relâche virale

présenté par :
Alexandre Orthwein

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jacques Thibodeau, Président-Rapporteur

Dr Éric A. Cohen, Directeur de recherche

Dr Jacques Archambault, Membre du Jury

Sommaire

La formation des particules du VIH-1, agent étiologique du SIDA, débute par le recrutement de la protéine virale Pr55^{Gag} au site d'assemblage. Cette protéine est nécessaire et suffisante à la production de telles particules. Cependant, le site initial de recrutement de Pr55^{Gag} et son trafic subséquent restent un sujet de controverse. Il a longtemps été considéré que le VIH-1 s'assemblait préférentiellement à la membrane plasmique (MP) des lymphocytes T ainsi que de certaines lignées cellulaires transformées. Or, des études récentes suggèrent que Pr55^{Gag} pourrait être directement ciblé vers des compartiments intracellulaires, les corps multivésiculaires (CMV) avant d'être dirigé vers la MP. Le but de notre étude était donc d'analyser le ciblage initial de Pr55^{Gag} et son trafic subséquent dans les cellules HEK293T, présentant une localisation de Gag à la MP mais aussi dans les CMV. Nous avons adapté une méthode de fractionnement cellulaire nous permettant de séparer efficacement la MP des CMV. Couplée à des expériences de marquage métabolique, cette approche nous a permis de montrer que Gag est principalement ciblé vers la MP. Alors qu'une partie est relâchée dans le milieu extracellulaire, une portion significative de Gag est internalisée vers les CMV où il s'accumule principalement sous forme mature. Ce processus, sensible aux drogues affectant l'intégrité du cholestérol à la MP est par ailleurs influencé par la capacité de Gag à être efficacement relâché via la protéine accessoire Vpu. Enfin, nos travaux montrent que la multimérisation de Gag serait nécessaire à sa localisation dans les CMV. Globalement, notre étude suggère que le VIH-1 est assemblé et relâché préférentiellement à la membrane plasmique. Les particules assemblées ou en voie d'assemblage qui ne sont pas relâchées efficacement seraient internalisées par un processus dépendant du cholestérol et ciblées vers les CMV où ils s'accumulent. Le rôle des particules virales associées aux CMV dans la transmission et la persistance virale reste un aspect majeur du VIH-1 à élucider.

Mots clés : VIH-1, Pr55^{Gag}, assemblage, relâche, Vpu, multimérisation, endocytose, membrane plasmique, corps multivésiculaires.

Summary

Production of HIV-1 particles, which is known to be the etiologic agent of AIDS, requires a series of coordinated events, particularly the recruitment of the viral precursor Pr55^{Gag} to HIV-1 site of assembly: Pr55^{Gag} is necessary and sufficient to induce HIV-1 particle formation and budding. It has long been considered that HIV-1 assembly takes place primarily at the plasma membrane (PM) of infected T lymphocytes as well as in a number of transformed cell lines. However, recent studies have proposed that Pr55^{Gag} is initially and directly targeted to intracellular compartments called multivesicular bodies compartments (MVB) before reaching the PM. Thus, Pr55^{Gag} initial targeting and the precise location of the initial site of particle assembly remain controversial and poorly understood. Our goal was to evaluate Pr55^{Gag} targeting and its subsequent trafficking in HEK 293T cells, that present both PM- and MVB localization of Gag. Therefore, we adapted a sub-cellular fractionation that efficiently separates PM from MVB. This method coupled to pulse-chase labeling allowed us to follow the trafficking of newly synthesized Gag. Our results demonstrate that Gag is primarily targeted to the PM. A significant portion of Gag, mainly as a mature form, is then internalized to MVB through an endocytosis process that is sensitive to drugs affecting PM-associated cholesterol and modulation of the viral release efficiency through the action of the accessory protein Vpu. Furthermore Gag localization into MVB seems to be dependant on its capacity to multimerize efficiently. Altogether, our data suggest that the plasma membrane is the primary site of HIV-1 assembly and release of viral particles. Gag and virus that are partially or fully assembled can be subsequently internalized through a process that is dependent on cholesterol: this mechanism can be modulated by the release efficiency of the viral particles. More studies are nevertheless required to better understand the importance of virus accumulating in MVB in the transmission and propagation of HIV-1.

Keywords : HIV-1, plasma membrane, Gag trafficking, viral assembly, Vpu, multivesicular bodies, endocytosis, multimerisation, viral release.

Table des matières

Sommaire	iii
Summary	iv
Liste des figures	vii
Sigle et abréviations	ix
Remerciements	xi

Première Partie : Introduction

1. Introduction : Généralités	2
2. Organisation génomique du VIH	3
2.a. Gènes codant pour des protéines structurales	5
2.b. Gènes codant pour des protéines régulatrices	11
2.c. Gènes codant pour des protéines accessoires	12
3. Cycle de réplication du VIH-1	15
3.a. Reconnaissance de la cellule cible, adsorption et entrée du VIH-1	15
3.b. Transcription inverse	16
3.c. Import nucléaire du PIC	17
3.d. Intégration du provirus	18
3.e. Expression des gènes viraux	18
3.f. Assemblage et formation de la particule virale	20
3.g. Maturation et structure finale des virions	23
4. Ciblage et mouvement intracellulaire de la protéine Gag	25
4.a. Plateformes d'assemblage	25
4.b. Localisation intracellulaire de Gag : Importance du type cellulaire	29
4.c. Facteurs cellulaires influençant la localisation intracellulaire de Gag	32
4.d. Facteurs viraux influençant la localisation intracellulaire de Gag	36
4.e. Études précédentes et modèles proposés de ciblage et de trafic de Gag	42

5. Les différents processus d'internalisation cellulaires	47
5.a. Clathrine et voie d'endocytose clathrine-dépendante	48
5.b. Cavéoles et radeaux lipidiques	50
5.c. Macropinocytose et Phagocytose	51
6. Problématique et objectifs du projet	53

Deuxième Partie : Article et résultats complémentaires

1. Article	57
2. Résultats complémentaires	102
2.a. Importance de l'efficacité de relâche : rôle de Vpu	102
2.b. Importance de la multimérisation de Gag dans sa localisation	103

Troisième Partie : Discussion et Conclusions

1. Discussion	109
2. Perspectives et conclusions	123

<u>Quatrième partie : Bibliographie</u>	128
--	-----

Liste des figures

Première partie

Figure 1 : Organisation génomique du VIH-1/VIS _{cpz} et du VIH-2/VIS _{sm} .	4
Figure 2 : Structure de la polyprotéine Pr55 ^{Gag} du VIH-1.	4
Figure 3 : Cycle de réplication du VIH-1 : importance de la phase précoce.	20
Figure 4 : Assemblage et formation de la particule virale du VIH-1.	24
Figure 5 : Machinerie cellulaire impliqué dans la formation des vésicules luminales (ESCRT) des CMV et la formation de particules virales.	25
Figure 6 : Structure de la particule immature et mature : importance de la protéase virale.	26
Figure 7 : Importance des CMV au niveau cellulaire : voie d'exocytose et de dégradation.	30
Figure 8 : Les CMV, intermédiaire dans l'assemblage et la formation des particules virales.	45
Figure 9 : La membrane plasmique, site préférentiel d'assemblage et de libération des particules virales.	47
Figure 10 : Les voies majeures d'endocytose cellulaires.	48

Deuxième partie

Article :

Figure 1 : PM separation from LE/MVB after iodixanol gradient-based sub-cellular fractionation.	90
Figure 2 : HIV-1 Gag steady-state distribution after sub-cellular fractionation.	91
Figure 3 : Ultrastructural analysis of HIV-1 Gag association with different sub-cellular compartments.	92
Figure 4 : Sub-cellular trafficking of HIV-1 Gag.	93
Figure 5 : Chlorpromazine, an inhibitor of clathrin-dependent endocytosis does not affect HIV-1 Gag trafficking in HEK 293 T cells.	94
Figure 6 : Effect of cholesterol-binding drugs on HIV-1 Gag trafficking in HEK 293T cells.	95
Figure supplémentaire 1 : HIV-1 Gag detected in high density fractions is membrane-associated.	100
Figure supplémentaire 2 : HIV-1 Gag membrane association.	101

Figure supplémentaire 3 : HIV-1 Gag membrane association in presence of endocytosis inhibitors.	101
--	-----

Résultats complémentaires :

Figure 1 : Vpu affecte la distribution intracellulaire de Gag dans les HEK293T à confluence.	105
---	-----

Figure 2 : Vpu favorise la relâche de particules virales matures dans le milieu extracellulaire à confluence.	106
--	-----

Figure 3 : La multimérisation de Gag est nécessaire à sa localisation dans les CMV.	107
--	-----

Troisième partie

Figure 1 : Analyse de la migration de la membrane plasmique dans un contexte d'altération des voies endocytaires.	116
--	-----

Figure 2 : Internalisation et transmission de particules virales des macrophages et des cellules dendritiques vers une cellule cible.	122
--	-----

Figure 3 : Modèle du ciblage du précurseur Pr55^{Gag} et de son trafic subséquent dans les cellules HEK293T.	126
---	-----

Sigles et abréviations

AIP1/ALIX	<i>Actin Interacting Protein 1/ ALG-2-interacting protein X</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AP-2/AP-3	<i>Adaptor protein 2/3</i>
APOBEC3G	<i>Apolipoprotein B RNA-editing Enzyme Complex 3G</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	ARN de transfert
β -TrCP	<i>β-Transducin Binding Protein</i>
CA	Capside
CCP	<i>Clathrin-coated pits</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CMH I/II	Complexe majeur d'histocompatibilité I/II
CMV	Corps multivésiculaires
C3R	<i>Complement 3 receptor</i>
CTS	<i>Central Termination Sequence</i>
CTX	<i>Cholera-toxin B</i>
CsA	Cyclosporine A
CyPA	Peptidyl-Prolyl cis-trans Cyclophiline Isomerase A
Da/kDa	Dalton/kiloDalton
DSIF	<i>DRB-sensitivity inducing factor</i>
DRM	<i>Detergent-resistant membrane</i>
Env	Glycoprotéine de l'enveloppe
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex required for Transport</i>
FAT	<i>Factor Acetyltransferase</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HAT	Histone Acétyltransférase
HMG I	<i>High Mobility Group DNA-binding protein</i>
HHV-8	<i>Human Herpesvirus 8</i>
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen DR</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
Lamp1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LBPA	<i>Lysobisphosphatidic acid</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
<i>LE/MVB</i>	<i>Late endosome/Multivesicular bodies</i>
<i>LMM</i>	<i>Low Molecular Mass</i>
LFA-1	<i>Leukocyte function-associated antigen 1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LTR	<i>Long Terminal Repeat sequence</i>
MA	Matrice
M β CD	Méthyl- β -Cyclodextrine
MHR	<i>Major Homology Region</i>
MLV	<i>Murine Leukemia Virus</i>
NC	Nucléocapside
Nef	<i>Negative factor</i>
NELF	<i>NegativeEelongation Factor</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>

OMS	Organisation mondiale de la Santé
PBS	<i>Primer Binding Site</i>
p-TEFb	<i>positive TranscriptionEelongation Factor b</i>
PIC	<i>Preintegration Complex</i>
PI3K	Phosphoinositide-3-Kinase
PI(4,5)P ₂	<i>Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate</i>
PM/MP	<i>Plasma membrane/Membrane plasmique</i>
PNS	<i>Post-nuclear Supernatant</i>
PPT	<i>Polypurine Tract</i>
PR	Protéase
RE	Réticulum endoplasmique
Rev	<i>Regulation of expression of viral proteins</i>
RRE	<i>Rev Responsive Element</i>
RT/TI	<i>Reverse transcriptase, transcriptase inverse</i>
SIDA/AIDS	Syndrome d'Immunodéficience Acquise
SR-A	<i>Scavenger Receptor A</i>
TAR	<i>Transactivator Responsive Element</i>
Tat	<i>Transactivator of transcription</i>
TC/LTC	tétracystéine biarsénique/ <i>extended linker sequence TC</i>
TGN	<i>Trans-Golgi Network</i>
TEM	<i>Tetraspanin-enriched microdomain</i>
TIP47	<i>Tail-interacting protein of 47 kDa</i>
TMgp41	<i>Transmembrane glycoprotein 41</i>
Tsg101/ <i>tsg101</i>	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
Vif	<i>Viral infectivity factor</i>
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIH-1 et VIH-2	Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 et 2
VIS/SIV	Virus de l'Immunodéficience simienne
VIS _{cpz} , VIS _{sm}	VIS de chimpanzés, VIS de macaques enfumés
VLP	<i>Virus-like Particle, pseudovirion</i>
Vpr	<i>Viral protein R</i>
Vps4A/B	<i>Vacuolar protein sorting 4 homolog A/B</i>
Vpu	<i>Viral protein U</i>
Vpx	<i>Viral protein X</i>
WT	<i>Wild type</i>

Remerciements

Avant tout, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr Éric A. Cohen, de m'avoir permis d'effectuer ma maîtrise dans son laboratoire ainsi que pour son encadrement tout au long de mon cursus universitaire.

Je remercie très spécialement mes collègues et amis, l'heureux papa Andrés Finzi et Johanne Mercier, avec qui j'ai vécu des moments formidables tout au long de ma maîtrise. Je veux aussi remercier tous les membres du laboratoire qui ont contribué à leur façon à la réussite du projet.

J'ai une attention particulière pour Vincent Lacoste et mes ex-compagnons de route en Guyane qui m'ont appris à avoir le recul et la sérénité nécessaires aux bons moments pour aller de l'avant.

Merci à Imed Gallouzi qui a été le premier à croire en mes capacités et qui été mon premier soutien. Je n'oublis pas mes anciens responsables en France qui ont, dans un contexte difficile, montré toute leur motivation à faire de la recherche particulièrement Catherine Florentz.

Je n'aurais pu mener ce projet à bien sans mes amis locaux ou à l'étranger particulièrement et dans le désordre Amandine Betzi, Tom L. States, Mélanie Wellman, Laëtitia Genève, Marie-Hélène Coté, Nicolas L'heureux, Fanny Rollin, Alexia Jung, Adeline Mathien qui est je ne sais où en antarctique.

Finalement, je souhaiterais remercier mon compagnon qui m'a soutenu, supporté dans le bon et le mauvais sens du terme, et surtout qui a toujours été présent tout au long de ma dernière année de maîtrise. Il est parfois difficile de dissocier travail et vie privée, j'espère que j'y suis parvenu au moins un peu. Et puis même si je suis loin de ma famille, je ne les oublies pas : le soutien de mon père et ma mère, ma sœur, ma cousine et ma grand-mère et leur présence de loin ou de près m'a permis d'une manière ou d'une autre à rester qui je suis.

Première partie : Introduction

1. Introduction : Généralités

La découverte du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) en 1983 a considérablement affecté non seulement la recherche scientifique de ces 25 dernières années mais a par ailleurs eu des répercussions profondes sur nos comportements sexuels et nos relations interindividuelles. C'est à la fin des années 1970 que de nombreux patients homosexuels de New-York et San Francisco souffrant de fatigue, de perte de poids et parfois même de formes rares de cancer sont déclarés. En 1981, le CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) d'Atlanta, constatant un nombre anormalement élevé de cas de sarcomes de Kaposi (tumeurs cutanées causées par l'herpèsvirus humain HHV-8), considère alors ces cas comme faisant partie d'un véritable problème sanitaire [1]. Cependant l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience humaine acquise ou SIDA n'est isolé qu'en 1983 [2]; [3]. L'épidémie, qui a pris de l'ampleur au courant des années 1980, est toujours en expansion de nos jours. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) considère que 35 à 45 millions de personnes vivraient avec le VIH actuellement et que près de 60 % des individus infectés se trouveraient en Afrique subsaharienne. Par ailleurs, plus de 5 millions de personnes auraient été nouvellement infectées par le VIH en 2005 et près de 3 millions de décès seraient attribués au SIDA [4].

La propagation rapide du VIH notamment en Afrique est due aux propriétés uniques de ce rétrovirus. Faisant partie de la sous-famille des lentivirus, on distingue chez l'humain deux membres : le VIH-1 et le VIH-2. Le VIH-1 est très répandu puisqu'il est l'agent causatif de l'épidémie mondiale alors que le VIH-2, moins virulent, se retrouve principalement en Afrique de l'Ouest. Les analyses phylogénétiques réalisées sur ces deux rétrovirus indiquent que le VIH-1 et -2 proviendraient d'une transmission singe-homme du virus de l'immunodéficience simienne infectant respectivement les chimpanzés (VIS_{cpz}) et les macaques à face de suie (VIS_{sm}) [5]. Le VIH-1 est particulier en ce sens qu'il établit une infection persistante causant une destruction lente et progressive du système immunitaire : les lymphocytes T CD4+ sont la cible privilégiée du VIH-1 et sa déplétion conjuguée à des dysfonctionnements des autres cellules du système immunitaire (monocytes/macrophages, cellules B, cellules NK) conduit à l'apparition d'une immunosuppression ou SIDA (pour une revue, [6]). À ceci s'ajoutent la dégénérescence du système nerveux central ainsi que l'apparition de nombreuses

maladies opportunistes qui profitent de l'affaiblissement du système immunitaire. Cependant, des études effectuées sur des modèles simiens, remettent en question le concept d'infection chronique caractérisée par une dégradation lente des protections immunitaires [7]; [8]; [9]. En effet, l'infection par le VIH-1 se caractérise par trois grandes phases : dans un premier temps une virémie élevée ainsi que l'apparition de symptômes pseudo-grippaux constituent la primo-infection. Or, lors de cette phase aiguë de l'infection, une destruction massive des cellules T mémoires CD4+ a été observée au niveau des muqueuses dans le cas du SIV [8]; [9]. Cette déplétion au niveau des sites d'entrée potentiels de nombreux pathogènes, pourrait causer un coup fatal au système immunitaire et expliquerait la plus grande susceptibilité de l'organisme aux infections opportunistes. La deuxième étape de l'infection est la phase chronique caractérisée par une diminution de la charge virale sanguine bien que le virus continue de se répliquer mais aussi par une diminution progressive du nombre de lymphocytes T CD4+. La phase SIDA est enfin marquée par des niveaux très bas de cellules T CD4+, ouvrant la porte à des infections opportunistes qui peuvent causer le décès du patient immunodéprimé. Les traitements antirétroviraux actuels interfèrent sur différents mécanismes développés par le VIH pour maintenir l'infection : bien qu'ils présentent dans certains cas des effets secondaires plus ou moins importants, ils permettent de ralentir durablement la progression de l'infection et ont augmenté de manière considérable la durée de vie des patients infectés.

2. Organisation génomique du VIH

Le VIH faisant partie de la famille des rétrovirus et de la sous-famille des lentivirus, il possède un génome composé de deux copies d'ARN simple brin, linéaire, non-segmenté et de polarité positive. Chaque brin d'ARN est formé d'environ 9.8 kilobases et présente en 5' une coiffe alors qu'en 3' on retrouve une séquence polyA. Une séquence non codante en 5' formée d'une région R (*repeated*), U5 (unique en 5') et PBS (*primer binding site*) ainsi qu'une séquence non codante en 3' formée des régions PPT (polypurine), U3 (unique en 3') et R encadrent le génome viral (Figure 1). Le VIH-1 et VIH-2 partagent une homologie de séquence de 42 % mais sont phylogénétiquement distincts. Ces deux lentivirus étant des rétrovirus complexes, ils possèdent non seulement des gènes structuraux tels que *gag*, *pol* et *env* mais aussi des gènes codant pour des protéines de régulation (*tat*, *rev*) et des gènes codant pour des protéines accessoires (*nef*, *vif*, *vpu* et *vpr/vpx*) qui sont importantes

2.a. Gènes codant pour des protéines structurales

gag

Le gène *gag* code pour la polyprotéine Pr55^{Gag} dont le poids moléculaire est de 55 kDa. Ce précurseur, lors de la formation de la particule virale, est clivé par la protéase virale PR, générant la matrice (MA ou p17), la capsid (CA ou p24), la nucléocapsid (NC ou p7), p6 ainsi que deux *spacer* p2 et p1 (pour une revue, [12]; Figure 2). La polyprotéine Gag joue un rôle central dans l'assemblage de la particule virale puisqu'elle est capable à elle seule de former des pseudovirus (VLP ou *virus-like particles*) en absence d'autres constituants viraux [13]; [14].

La matrice est composée de 132 acides aminés et tapisse la surface interne de la particule virale (Figures 2 et 6). Cette protéine présente au niveau de son domaine N-terminal une région basique ainsi qu'un acide myristique attaché de manière covalente au résidu Glycine présent au niveau de la région N-terminale de MA. Ces deux éléments, formant le domaine M (Membrane-binding domain ; Figure 2), sont essentiels à l'association aux membranes [15]; [16]; [17]; [18]; [19]. Des mutations au niveau du résidu Glycine présent à l'extrémité N-terminale de Pr55^{Gag} ou de la région basique peuvent être dommageables pour l'assemblage du virus : les six résidus du domaine N-terminal de MA sont cependant suffisants pour induire la myristylation de cette région [20] et la formation de particules virales en absence d'autres séquences de MA [20]; [21]; [22]. Des études structurales ont montré que la région basique de MA chargée positivement interagirait avec les acides phospholipidiques constituant les membranes chargées négativement ([19]; section 3f). MA est en outre essentielle à l'incorporation de la glycoprotéine de l'enveloppe (Env) lors de la formation du virion [23]; [24]. Ces deux protéines virales s'associeraient à TIP47 (*Tail-interacting protein of 47 kDa*), une protéine cellulaire impliquée dans le mouvement des endosomes vers le TGN (*Trans-Golgi Network*) [25]. Les résidus 5 à 16 de MA seraient essentiels à l'incorporation de Env [25]. MA a par ailleurs été montrée comme restant associée avec le complexe de préintégration (PIC) lors de l'infection de nouvelles cellules cibles [26]; [27]. MA conférerait un signal de localisation nucléaire (NLS) permettant au complexe de traverser le pore nucléaire et de compléter le cycle de réplication viral au niveau de cellules différenciées ou ne se divisant pas [26]; [28]. Ce NLS se situerait dans la région

basique, décrite précédemment [26] : la substitution du domaine NLS conduit à un défaut de réplication du VIH-1 dans les cellules différenciées en arrêt de cycle alors qu'il conserve sa capacité à se multiplier dans des cellules en division [26]; [29]. Enfin, des travaux récents ont montré que MA serait capable d'interagir avec des protéines adaptatrices, la protéine AP-3, via son domaine N-terminal [30] et la protéine AP-2 via un motif YxxΦ à la jonction entre MA et CA [31]. AP-3 est notamment impliquée dans le mouvement de protéines lysosomales. Cette interaction influencerait le site de localisation de la protéine Gag et la formation de particules virales [30]. AP-2 est quant à elle impliquée dans les processus d'internalisation clathrine-dépendante de protéines présentes au niveau de la membrane plasmique. L'abrogation de l'interaction AP-2-Gag augmente la relâche virale [31] (pour plus de détails voir la section 4.c). Toutes ces observations mettent en avant le rôle central de MA dans l'initiation de la formation de la particule virale et la poursuite du cycle viral.

La capsid (CA) qui suit MA au niveau du précurseur Pr55^{Gag} forme le corps de la particule virale mature et est importante pour l'assemblage du virion et son entrée dans la cellule cible. CA est constituée de deux larges hélices α séparées par une région flexible [30, 32-34]. La première, située au niveau N-terminal est nécessaire à la formation de la structure centrale conique de la particule virale mais n'intervient pas dans l'assemblage de la particule virale immature [22, 23, 35-37]. Ce domaine constituant les deux tiers de CA interagit par ailleurs avec la peptidyl-prolyl cis-trans cyclophiline isomérase A (CyPA) et permet son incorporation dans la particule virale [38-41]. CyPA est en fait le récepteur intracellulaire de la cyclosporine A, un immunosuppresseur (CsA) qui se fixe au site actif de CyPA [42]. L'infectivité des particules nouvellement formées est diminuée lorsque CyPA n'est plus incorporée dans les virions [41]. Les données récentes suggèrent que CyPA pourrait jouer le rôle de chaperonne d'assemblage lors de la formation du corps du virion [43] bien qu'il ait été initialement proposé que CyPA déstabilise la structure conique et facilite le désassemblage de la particule virale suite à son entrée dans la cellule cible [44]. A l'opposée, la région C-terminale est cruciale à la formation de la particule virale et son corps central [23, 45-47]. Cette région est suffisante à la formation de VLP lorsqu'elle est couplée à un domaine d'ancrage aux membranes et à un motif qui facilite la relâche de particules virales [48]. CA peut former des dimères

en solution grâce à son domaine C-terminal [32]: le domaine fonctionnel de dimérisation au niveau de Pr55^{Gag} s'étendrait de la région C-terminale de CA jusqu'au *spacer* p2 [49] et la capacité de cette région à dimériser est cruciale lors de l'assemblage de particules virales. En outre, cette région contient un motif de 20 acides aminés appelé MHR (*Major Homology Region*) du fait de sa forte conservation chez les rétrovirus [50]. Cette région favorise les interactions protéine-protéine indispensables à l'assemblage des particules virales et aux étapes post-assemblage [51, 52]. La modification conformationnelle de CA permet la formation d'une structure conique, caractéristique des virions matures. Enfin, la région C-terminale de CA fait partie d'un domaine appelé domaine I pour *Gag-Gag interaction* englobant la fin de CA en plus de la région N-terminale de la nucléocapside (NC) (Figure 2). L'interaction entre les molécules de Gag serait le résultat d'un phénomène concomitant de multimérisation des domaines CA et d'interactions entre la nucléocapside et l'ARN viral [53-55].

Le domaine I contient une région basique présente dans NC et importante pour l'encapsulation des deux copies du génome viral (Figure 2). Il présente deux motifs en doigt de zinc qui permettent d'interagir spécifiquement avec le génome viral et de l'incorporer dans la particule en formation : la présence de ces deux motifs est essentielle à la réplication virale [56-58]. La NC est très basique et interagit avec une région présente en amont de la partie codante pour Gag au niveau du génome à ARN non épissé [59, 60]. Cependant, dans le cas où l'ARN viral n'est pas disponible, des ARN cellulaires peuvent être incorporés dans la particule en formation. NC contient par ailleurs certains résidus basiques qui sont essentiels à l'incorporation non-spécifique d'acides nucléiques [61, 62]: elle permet notamment le recrutement de l'ARN^{Lys} qui fera office d'amorce (*primer*) lors de la rétrotranscription du génome viral. La présence des domaines en doigts de zinc et leur disponibilité jouent un rôle important dans l'initiation de la multimérisation ainsi que dans le maintien du cône central du virion [63]. En effet, la multimérisation des molécules de Gag débiterait par des interactions électrostatiques entre la région basique de NC et les groupements phosphates de l'ARN en voie d'encapsulation. Dans le corps central de la particule virale mature, NC entoure les deux ARN viraux. Ainsi le rôle central de NC est de permettre l'incorporation du génome viral en plus

d'initier les interactions intermoléculaires au niveau de Gag nécessaires à la formation des particules virales.

Au niveau C-terminal du précurseur Pr55^{Gag} se trouve le domaine p6, région spécifique aux lentivirus. Il est à la fois important pour l'incorporation de la protéine accessoire Vpr via le motif LXXLF [64-66] mais plus encore dans les étapes tardives de l'assemblage et de la relâche des particules virales [67]. La libération de la particule virale du site d'assemblage requiert un étranglement de la membrane limitante avant son détachement et le domaine p6 intervient dans ce processus [68]. En fait, il constitue la région la plus variable en séquence et en longueur : il contient cependant certains motifs conservés dont les motifs P(T/S)AP et YPLTSL au niveau de sa région N-terminale. Le motif P(T/S)AP interagit directement avec la protéine cellulaire Tsg101 (*Tumor susceptibility gene 101*), qui est un composant de la machinerie cellulaire ESCRT-I (*Endosomal Sorting Complex required for Transport I*) (pour une revue, [69]; Figure 5). Tsg101 est notamment impliquée dans la reconnaissance des protéines cargo ubiquitinées présents au niveau d'endosomes tardifs et à leur translocation à l'intérieur de ces compartiments intracellulaires (pour une revue, [70]). Le motif YPLTSL permet quant à lui d'interagir avec la protéine cellulaire AIP1/ALIX, impliquée dans le contrôle de la formation des vésicules intraluminales des endosomes tardifs : AIP1 interagit avec le complexe ESCRT-III, particulièrement la protéine CHMP4A, mais aussi avec la protéine Tsg101 [71](Figure 5). Cette association favoriserait la formation des particules virales ([71]; voir section 3.f). Les motifs d'interaction avec Tsg101 et AIP1/ALIX constituent le domaine L ou *late* dont la fonction principale est de recruter le complexe ESCRT et promouvoir le détachement de la particule virale de la membrane où elle s'est assemblée (Figure 2). La machinerie ESCRT est constituée de trois groupes, ESCRT-I, II et III, qui interviennent à différentes étapes de la formation des vésicules intraluminales des corps multivésiculaires (CMV) (Figure 5), compartiments tardifs (ou endosomes tardifs) essentiels au recyclage et à la dégradation de protéines cargo notamment les récepteurs de cytokines présents à la surface cellulaire [72].

pol

Le gène *pol* code pour l'ensemble des enzymes virales nécessaires au cycle de réplication du VIH-1, que sont la protéase (PR), la transcriptase inverse (TI) et l'intégrase (IN). Le précurseur Pol est en fait le résultat d'un décalage du cadre de lecture de type -1 lors de la synthèse du précurseur Pr55^{Gag}. Cet événement rare (5 à 10% des cas) donne naissance au précurseur Pr160^{Gag-Pol} [73]. La protéase, constituée de 99 acides aminés est très importante pour l'infectivité virale puisqu'elle induit la maturation des particules virales [74-76]. Elle est par ailleurs une cible privilégiée des traitements contre le VIH-1. Au niveau du précurseur Pr160^{Gag-Pol}, PR dimérise et s'autoclive. Cette automaturation permet par la suite de cliver les précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160^{Gag-Pol}, de manière séquentielle et ordonnée pour générer les différentes protéines structurales (MA, CA, NC et p6) ainsi que les enzymes virales IN et TI (pour une revue, [77]). Cette maturation induit une modification importante de la structure virale permettant la formation du corps central où l'ARN et la NC sont condensés pour former une structure conique à l'intérieur de la particule virale. Cette étape est essentielle puisqu'elle confère aux particules virales nouvellement formées leur infectivité et leur capacité à fusionner avec de nouvelles cellules cibles [76].

Le VIH-1 a la capacité de convertir son génome à ARN en ADN double brin lors des phases précoces de l'infection. Cette réaction est catalysée par la transcriptase inverse (TI) qui est un hétérodimère contenant une sous-unité de 66 kDa et une sous-unité de 51 kDa. La petite sous-unité provient du clivage par PR de la grosse sous-unité de 66 kDa qui a perdu son domaine ARNase H. La TI rassemble à elle seule quatre activités essentielles à la prolifération du VIH-1 : une activité ADN polymérase ARN dépendante, une activité ADN polymérase ADN dépendante, une activité hélicase et enfin une activité ARNase H qui permet de cliver l'ARN du complexe ARN-ADN lors de la formation du génome ADN double brin [78-80]. Une spécificité importante de cette enzyme est son manque de fidélité lors de la synthèse des molécules d'ADN : lors de la rétrotranscription, l'absence d'activité exonucléolytique empêche la TI de corriger les mésappariements d'où l'apparition de nombreuses mutations dans le génome viral [81]. Ceci est un moyen très efficace pour le virus d'évoluer (apparition de quasi-espèces) et de développer des résistances aux agents antiviraux en plus d'échapper au système immunitaire.

Suite à la rétrotranscription, le génome à ADN nouvellement synthétisé doit être intégré dans celui de la cellule hôte. Pour cela, le VIH-1 code pour une intégrase IN de 32 kDa [82], contenant trois grands domaines fonctionnels: une région N-terminale contenant un domaine doigt de zinc, une région centrale et enfin une région C-terminale relativement non conservée [82]. L'introduction de mutations dans le domaine N-terminal conduit à l'abolition de la tétramérisation d'IN et conduit à la perte de son activité catalytique [83, 84]. La région centrale est essentielle pour la catalyse de la réaction d'intégration [85]. Enfin, le domaine C-terminal est important pour le clivage de l'extrémité 3' de l'ADN proviral ainsi que dans la réaction d'intégration [86, 87].

env

La glycoprotéine Env joue elle-aussi un rôle majeur dans le cycle viral. Cette protéine est en fait issue du gène biscistronique *env* qui donne naissance au précurseur gp160. Celui-ci est ensuite transloqué et glycosylé dans le réticulum endoplasmique où de nombreux ponts disulfures sont formés [88, 89]. Le précurseur forme un trimère avant d'être dirigé vers l'appareil de Golgi où celui-ci serait clivé par une furine pour donner naissance à la gp120 (SUgp120) et la gp41 (TMgp41) [90-92]. La gp120, correspondant à la partie N-terminale de la gp160, forme la sous-unité de surface d'Env et reste associée à la gp41 par des liaisons non-covalentes. La gp41 quant à elle correspond à la sous-unité transmembranaire. Les hétérodimères gp120-gp41 sont dirigés vers la membrane plasmique pour être incorporés dans les virions en formation. Cette incorporation se ferait via une interaction indirecte et nécessiterait un motif présent dans le domaine cytoplasmique de la gp41 : la substitution ou la délétion de certains résidus au niveau de la queue cytoplasmique de la gp41 ont été montrées comme abolissant l'incorporation de l'Env dans les particules en formation [20, 22, 24, 93-95]. Le facteur cellulaire TIP47 jouerait le rôle de pont moléculaire entre MA et Env pour médier l'incorporation de l'enveloppe dans la particule en formation : le domaine MA et la queue cytoplasmique de la gp41 sont importants pour former ce complexe [25].

2.b. Gènes codant pour des protéines régulatrices

tat

Le gène *tat* (*transactivator of transcription*) est constitué de deux exons : le premier est formé de 72 codons se trouvant entre les gènes *vpr* et *env* alors que le second exon chevauche les gènes *rev* et *env*. Selon la souche virale, ce deuxième exon peut varier en longueur d'où une taille de la protéine Tat allant de 85 à 130 acides aminés. Cette protéine est essentielle au cycle viral puisqu'elle a la capacité de moduler l'expression du génome viral au niveau de la séquence LTR (*Long Terminal Repeat sequence*) en 5' du provirus. Dans les faits, Tat permet d'augmenter le nombre de transcrits viraux en facilitant l'initiation et l'élongation de la transcription des gènes du VIH [96, 97]. Elle a la capacité d'interagir avec une séquence présente dans le LTR en 5', l'élément TAR (*Transactivation Responsive element*), et de recruter des éléments de la machinerie cellulaire dont le complexe p-TEFb (voir section 3.e). Tat, par le recrutement d'histone acétyltransferase (HAT) et de FAT (*Factor acetyltransferase*), permet un remodelage de la chromatine et facilite la transcription virale [98]. Elle a par ailleurs la capacité d'activer le facteur NF-κB en le recrutant en amont de la boîte TATA du génome proviral ([99]; voir section 3.e). Le rôle central de Tat est donc de faciliter l'initiation et l'élongation des transcrits viraux et joue un rôle important dans la formation subséquente de particules virales.

rev

Le gène *rev* (*regulation of expression of viral proteins*) est lui aussi le résultat d'un épissage alternatif. Il est constitué de deux exons : le premier chevauche la partie 3' du premier exon de *tat* et le second chevauche la partie 3' codant pour le domaine transmembranaire du gène *env*. Ce gène code pour une protéine de 116 acides aminés et sa fonction principale est de permettre le transport des ARNm viraux non épissés et mono-épissés du noyau vers le cytoplasme de la cellule infectée [100]. Normalement, la cellule a la capacité de retenir dans le noyau les ARNm jusqu'à leur épissage complet. Ceci est cependant dommageable pour le VIH puisque les ARNm codant pour Gag, Pol, Env, Vpr, Vpu et Vif ne pourraient pas être traduits. Rev confère au VIH-1 la capacité de transporter des ARNm partiellement épissés en liant un motif au niveau de l'ARNm appelé RRE (*Rev Responsive Element*) [101] : ils possèdent alors un signal d'exportation nucléaire grâce à son

domaine riche en leucines qui constitue le signal d'export nucléaire (NES). La présence d'un NES mais aussi d'un NLS permettant à Rev de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme de la cellule infectée [101, 102].

2.c. Gènes codant pour des protéines accessoires

nef

Le gène *nef* (*negative factor*), présent en 3' du gène *env*, code pour une protéine de 206 acides aminés dont la fonction est de faciliter la dégradation du récepteur CD4. Nef exerce une fonction précoce en facilitant l'internalisation du CD4 présent à la surface cellulaire et en le dirigeant vers la voie lysosomale, via la voie d'endocytose clathrine-dépendante [103]. Cette dégradation du CD4 de surface permet de réduire les interactions entre le récepteur et le précurseur Env et donc d'empêcher l'agrégation de particules virales à la surface de la cellule lors du bourgeonnement. De même, la réduction du nombre de CD4 à la surface diminue la surinfection pouvant causer une mort cellulaire précoce (pour une revue, [104, 105]). Nef pourrait en outre diminuer la présence des corécepteurs CXCR4 et CCR5 à la surface des cellules infectées pour limiter la surinfection [106, 107]. Les effets de Nef sur l'infectivité virale et la réplication sont très importants puisque des mutations dans le gène codant pour cette protéine ou son absence peuvent réduire significativement le niveau d'infectivité des particules virales (de 4 à 40 fois moins infectieux) mais aussi la capacité d'infecter de manière productive les cellules environnantes (de 5 à 20 fois) [108, 109]. Nef a par ailleurs la capacité de réguler le nombre de molécules (allèles A et B) du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) mais aussi la quantité de molécules matures du CMH-II présentes à la surface de la cellule, protégeant ainsi les cellules infectées des lymphocytes T cytotoxiques [110-112]. Enfin, Nef peut moduler la signalisation intracellulaire au niveau des cellules T et augmenter l'expression de Fas-Ligand : ceci permet d'induire l'apoptose des cellules immunitaires effectrices infectées ou non et de permettre l'évasion immunitaire [113].

vpu

La protéine Vpu (*viral protein U*), issue de l'ARNm bicistronique codant pour Env, est constituée de 81 acides aminés. L'une des fonctions les mieux connues et la

mieux caractérisée est sa capacité à induire la dégradation des molécules de CD4 nouvellement synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) via la voie ubiquitine-protéasome (pour une revue, [114]). En effet, le récepteur CD4 dans le RE s'agrège aux précurseurs de l'Env ce qui permet à Vpu d'interagir avec le récepteur et de recruter le complexe β -TRCP (*β -Transducin Binding Protein*) pour induire son ubiquitination et sa dégradation [115-117]. Ainsi cette dégradation du CD4 permet comme dans le cas de Nef de limiter la surinfection des cellules ainsi que l'agrégation de particules virales à la surface de la cellule [118]. Elle permet aussi de libérer le précurseur de l'Env qui peut alors transiter vers la membrane plasmique et être incorporé dans les particules virales en formation. Une fonction moins connue de Vpu est son importance au niveau de la relâche de particules virales : l'expression de Vpu favorise la relâche de virions et l'importance de son effet varie selon le type cellulaire [119-127]. Certaines études effectuées dans les cellules HEK293T ont montré que l'effet de Vpu sur la relâche virale serait dépendant de la prolifération cellulaire : l'arrêt du cycle cellulaire par inhibition de contact ou par l'usage de drogues rend les cellules HEK293T sensibles à l'effet de Vpu et facilite la relâche de particules virales en sa présence [128]. La modulation de l'efficacité de relâche par Vpu serait importante pour prévenir l'internalisation de particules virales présentes à la surface de la cellule : Vpu aurait la capacité d'inhiber l'activité d'un facteur de restriction qui interfère avec la relâche efficace des particules virales en les retenant à la surface cellulaire [126, 129].

vif

Le gène *vif* (*viral infectivity factor*) code pour une protéine de 193 acides aminés jouant un rôle dans l'infection de cellules non-permissives dont les cellules lymphocytaires du sang périphérique mais aussi dans l'infectivité globale des particules virales. En effet, Vif facilite la dégradation d'un facteur antiviral APOBEC3G faisant partie des défenses cellulaires innées [130, 131]. Elle induit son élimination via la voie ubiquitine-protéasome et empêche son incorporation dans les particules virales en voie de formation en plus de réguler négativement son expression dans les cellules infectées [132-134]. APOBEC3G (*Apolipoprotein B RNA-editing Enzyme Complex 3G*), suite à son incorporation dans la particule virale, cause la déamination des cytosines au niveau de l'ADN viral lors de la synthèse du brin négatif dans les cellules en cours d'infection. L'activation d'APOBEC3G ferait

suite à l'action de l'activité RNase H de la RT lors de la synthèse de l'ADN viral [135]. L'absence de Vif conduit ainsi à une hypermutation au niveau du génome viral causant une dégradation de l'ADN proviral et empêchant le cycle viral de se poursuivre correctement [136].

vpr/vpx

Codée au niveau de la partie 3' de *vif* et chevauchant *tat* en 5' dans le cas du VIH-1, la protéine Vpr remplit de multiples fonctions au cours du cycle viral. Cette protéine de 96 acides aminés est incorporée à de hauts niveaux dans les virions et est notamment impliquée dans les étapes précoces du cycle d'infection, particulièrement dans l'import nucléaire du complexe de préintégration (PIC) au niveau des cellules quiescentes ou différenciées (pour une revue, [137]). La délétion de Vpr réduit de manière significative la réplication virale dans des cellules différenciées telles que les macrophages [138-142], suggérant que Vpr pourrait surmonter un facteur de restriction prévenant l'import nucléaire efficace du PIC au niveau de ces cellules. L'une des autres fonctions de Vpr est sa capacité d'induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 : elle induit l'activation de la voie de signalisation dépendante d'ATR (*ATM- and Rad3-related protein*) qui est normalement stimulée lors de dommages à l'ADN ou lors de stress répliatif [143-145]. Cet arrêt en phase G2 serait de grande importance pour la transcription virale puisque cet arrêt de cycle augmenterait la production de transcrits viraux [146]. Dans les faits, Vpr favorise l'initiation de la transcription au niveau du LTR proviral en recrutant le coactivateur transcriptionnel p300 et la protéine p21WAF1 [147]. Les travaux récents suggèrent en outre que l'arrêt en phase G2 médié par Vpr pourrait avoir un rôle pro-apoptotique et serait important dans la déplétion des lymphocytes T CD4+ lors de la pathogénèse virale [148]. L'activation de la voie dépendante d'ATR nécessiterait le recrutement de Vpr au niveau de la chromatine et favoriserait l'entrée des cellules infectées dans un processus de mort programmée par altération du processus normal de réplication de l'ADN [143, 149]. Finalement, Vpr pourrait avoir un effet cytotoxique sur les cellules environnantes non infectées [150, 151]: en étant libérée dans le milieu extracellulaire, elle pourrait favoriser l'entrée en apoptose d'un grand nombre de cellules non infectées dont les lymphocytes T CD8+ et les cellules B [152-159].

Dans le cas du VIH-2, certaines des fonctions évoquées précédemment sont en fait partagées entre Vpr et Vpx. Vpx est elle aussi incorporée au niveau de la particule virale à de forts niveaux et interagit via le domaine C-terminal de Gag pour médier son incorporation. Vpx a été montrée comme étant importante pour la réplication du VIH-2 dans les cellules différenciées [160] alors que la protéine Vpr du VIH-2 a conservé les fonctions d'arrêt de cycle [161].

3. Cycle de réplication du VIH-1

Le cycle de réplication du VIH-1 peut se délimiter en deux grandes phases : une phase précoce et une phase tardive. La première comprend les étapes d'adsorption et d'entrée du virus dans la cellule cible, la libération de son génome jusqu'à l'intégration du provirus dans le noyau de la cellule infectée (Figure 3). La seconde phase débute avec l'initiation de la transcription des gènes viraux pour se terminer par le bourgeonnement, la relâche et la maturation de particules virales nouvellement formées (Figure 4).

3.a. Reconnaissance de la cellule cible, adsorption et entrée du VIH-1

Dans les étapes précoces de l'infection, le VIH-1 cible préférentiellement une sous-population de cellules du système immunitaire, les lymphocytes T CD4+. CD4 a été montré comme étant le récepteur primaire auquel le VIH-1 s'attache à la surface de la cellule cible [162]. Dans les faits, Env présent à la surface de la particule virale interagit avec CD4 : cette interaction conduit à des modifications conformationnelles d'Env, lui permettant d'interagir avec un corécepteur (CCR5 ou CXCR4) [163-165] (Figure 3). Ces deux corécepteurs sont en fait des récepteurs de chimiokines et dictent le tropisme du virus : alors que CXCR4 donne au virus un tropisme pour les lymphocytes T, CCR5 facilite le ciblage des macrophages. L'interaction gp120-CD4 puis le recrutement du corécepteur conduisent à l'exposition du peptide de fusion présent dans la partie transmembranaire d'Env (gp41) et à son ancrage dans la membrane plasmique de la cellule cible. Ce mécanisme facilite la fusion des membranes et la libération de la capsid virale dans le cytoplasme de la cellule en voie d'infection (Figure 3). Les étapes suivant l'entrée du virus sont pour le moment mal comprises, particulièrement le processus de libération du génome viral à partir du corps de la capsid viral. Il apparaît cependant que CA est perdu lors de cette étape alors que certaines molécules de MA, NC ainsi que la RT, l'intégrase IN et Vpr

restent associées au génome du VIH-1 pour former le complexe de transcription inverse (RTC) [166]. De manière intéressante, certains primates non-humains ont été montrés comme étant non-permissifs au VIH-1 : un bloc cellulaire agissant au niveau d'étapes post-entrées du virus empêche le VIH-1 de poursuivre son cycle [167]. CA joue un rôle important dans cette restriction [168] et la protéine TRIM5 α (tripartite motif 5-alpha) a été identifiée comme étant le facteur cellulaire interférant avec la production de l'ADN proviral [169]. Cependant, le mécanisme par lequel TRIM5 α est capable de bloquer la poursuite du cycle viral dans les cellules de primates reste peu clair : les dernières évidences suggèrent que TRIM5 α ciblerait les formes cytosoliques de CA issues de l'entrée du VIH-1 dans la cellule, et induirait sa dégradation [170].

3.b. Transcription inverse

L'une des spécificités des rétrovirus est leur capacité à convertir un génome à ARN en une molécule d'ADN double-brin lors des étapes précoces de l'infection virale (Figure 3). Ce processus, catalysé par la RT, nécessite une activité ADN polymérase ARN et ADN dépendants ainsi qu'une activité RNaseH et hélicase qui pour compléter la transcription inverse. Elle débute par la synthèse du brin négatif d'ADN en allant en direction de l'extrémité 5' du génome d'ARN. La RT initie ce processus grâce à un ARNt^{Lys} incorporé lors de la formation de la particule virale qui se lie à la séquence PBS (*Primer Binding Site*) présent près de l'extrémité 5' de l'ARN génomique. L'ARNt^{Lys} sert alors d'amorce. L'hydride ARN-ADN formé est ensuite dégradé grâce à l'activité RNaseH de la RT. Un premier transfert de la matrice a lieu : la portion d'ADN nouvellement synthétisée s'hybride à la région R située à l'extrémité 3' du génome d'ARN (de la même ou d'une autre molécule d'ARN génomique). L'élongation du brin négatif d'ADN se poursuit : l'ARN servant de matrice est au fur et à mesure dégradé par la RT. Seule la séquence PPT (*Polyurine Tract*) riche en purines est conservée. Cette séquence sert d'amorce pour la synthèse de l'extrémité 3' du brin positif d'ADN viral (Rausch 2004). Cette seconde amorce ne se situant pas à l'extrémité du génome viral, un second transfert de brin a lieu. La séquence PBS nouvellement synthétisée s'hybride alors à sa séquence complémentaire sur le brin négatif à l'extrémité 3' du brin négatif d'ADN. La RT complète la synthèse du brin positif d'ADN jusqu'au signal central de terminaison appelé CTS (*central termination sequence*). Une région de 100

nucléotides est présente en duplicata, formant un rabat d'ADN (*DNA flag*) ([171]; Figure 3). Cette séquence jouerait un rôle essentiel dans le transport subséquent du PIC vers le noyau. Cette région serait éliminée par des enzymes cellulaires et l'ADN proviral serait réparé par la machinerie cellulaire. La transcription inverse produit donc une molécule d'ADN présentant à ces deux extrémités des LTR (*Long Terminal Repeats*) formés des régions U3, R et U5 ([172]; Figure 1). Lors de ce processus, un certain nombre de mutations ponctuelles peuvent être introduites du fait de l'absence d'activité exonucléolytique de la RT [173, 174]. Il est généralement admis que le processus de transcription inverse est complété avant l'entrée dans le noyau de la cellule. Ce phénomène de transcription inverse pourrait cependant être initié très précocement dans la particule virale puisque certaines études ont observé une production d'ADN dans les virions extracellulaires [175-178]. De manière intéressante, la conversion du génome viral à ARN en une molécule d'ADN double brin est la cible d'un facteur de restriction cellulaire, APOBEC3G : elle a la capacité, sous la forme LMM (*Low molecular mass*), de bloquer le cycle de réplication du VIH-1 au niveau de la rétrotranscription [179]. La protéine virale Vif n'a aucun effet sur cette forme d'APOBEC3G puisqu'elle n'est présente qu'en faible quantité au début de l'infection. APOBEC3G se retrouverait sous la forme LMM dans les lymphocytes T CD4+ latents et dans les monocytes et rendrait ces cellules non-permissives à l'infection par le VIH-1 [179].

3.c. Import nucléaire du PIC

L'ADN viral synthétisé est transporté du cytoplasme vers le noyau de la cellule sous la forme d'un complexe de préintégration ou PIC (Figure 3). Ce PIC en plus de contenir le génome viral, présente des protéines virales telles que MA, NC, RT, IN et Vpr en plus de protéines cellulaires comme HMG I (*High Mobility Group DNA-binding protein*), les importines α et β , BAF (*Barrier-to-autointegration*) et LEDGF/p75 (*Lens epithelium-derived growth factor* ; se référer à la section 3.d) [26, 28, 180-187]. Le PIC fait 56 nm de diamètre alors que le pore nucléaire n'en fait que 9 nm [187]. En absence de division cellulaire et donc de disparition momentanée de la membrane nucléaire, l'import nucléaire du PIC nécessite un transport actif. Cependant ce mécanisme est pour le moment mal connu. Certaines protéines composant le PIC contiennent un NLS telles que IN, MA et Vpr [26] et le cibleraient vers le pore nucléaire. Ce complexe avancerait le long des microtubules et

s'accumulerait au niveau des centres organisateurs des microtubules MTOC (*Microtubules-organizing centre*) [188-190]; Figure 3) avant de rentrer dans le noyau. En outre, Vpr jouerait un rôle important dans l'entrée du PIC dans le noyau en affectant possiblement l'intégrité de la membrane nucléaire [191]. IN et le rabat d'ADN (*DNA flag*) semblent eux aussi jouer un rôle central dans l'import nucléaire [171].

3.d. Intégration du provirus

Suite au transport du PIC dans le noyau, l'intégrase IN catalyse l'insertion de l'ADN viral double brin au niveau du génome cellulaire [192] (Figure 3). Le processus d'intégration du provirus débute avec l'excision de deux nucléotides aux extrémités 3' de chaque brin d'ADN. Cette étape appelée *3'-end processing* donne naissance à une molécule d'ADN double-brin ayant des extrémités 3' rétrécies. Par la suite, IN clive dans l'ADN chromosomique laissant deux extrémités non appariées de 5 bases. Elle favorise la formation d'un lien covalent entre les extrémités 3' du provirus et les extrémités 5' de l'ADN chromosomique. Des enzymes cellulaires complètent alors le processus en ajoutant les nucléotides manquants (pour revues, [193, 194]). Longtemps considérée comme aléatoire, l'intégration du provirus au niveau du génome cellulaire semble se faire préférentiellement au niveau de gènes cellulaires transcriptionnellement actifs, particulièrement au niveau d'exons [195-198]. Le recrutement du complexe contenant l'ADN viral au site d'intégration se ferait via l'interaction entre IN et LEDGF/p75 (*Lens epithelium-derived growth factor*) qui a la capacité d'interagir avec la chromatine. L'expression d'un mutant de p75 n'ayant plus la capacité d'interagir avec la chromatine empêche le processus d'intégration [199]. Par ailleurs, l'interaction entre IN et p75 inhibe la dégradation rapide de l'intégrase viral par le protéasome 26S [200].

3.e. Expression des gènes viraux

Suite à l'intégration du provirus au niveau du chromosome de l'hôte, celui sert de matrice pour la synthèse des ARN viraux codant pour les différentes protéines virales. L'ARN polymérase II de l'hôte synthétise les ARN viraux et le LTR présent en 5' du génome intégré sert de région promotrice. Celui-ci contient dans le domaine U3 une boîte TATA, d'où est initiée la transcription virale, en plus de nombreux sites de liaison de facteurs de transcriptions cellulaires. Ce processus se termine à la

frontière R-U5 du LTR en 3', conférant aux ARN viraux une queue polyA tout comme les ARNm cellulaires. Trois grandes catégories d'ARN viraux peuvent être identifiées : tout d'abord les ARN non épissés qui codent pour le précurseur Pr55^{Gag} ainsi que Pr160^{Gag-Pol} ou ceux servant d'ARN génomique. Puis on trouve les ARN partiellement épissés qui codent notamment pour les protéines Env, Vif, Vpu et Vpr. Enfin les ARN totalement épissés codant pour Rev, Tat et Nef forment la dernière catégorie.

La transcription basale du LTR proviral est très faible et nécessite la présence du transactivateur Tat [97, 201-203]. En outre, à l'instar de la synthèse des ARNm cellulaires, le processus d'élongation des ARN viraux nécessite la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN pol II. Cette étape essentielle à la transcription efficace du génome viral fait là aussi intervenir la protéine virale Tat [204]. Suite à la liaison à la séquence TAR [205], Tat recrute le complexe p-TEFb constitué de la kinase Cdk9 et de la cycline T1, catalysant la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN pol II [206]. Ce phénomène conduit à la libération de deux facteurs inhibiteurs de l'élongation transcriptionnelle, DSIF et NELF, qui lient normalement la forme hypophosphorylée de l'ARN polymérase II. En outre, Tat favorise la transcription virale par le recrutement de HAT et FAT et le remodelage de la chromatine ainsi que par l'activation du facteur NF- κ B, fixant une région en amont de la séquence TAR [207].

Les premiers transcrits synthétisés sont épissés par la machinerie cellulaire et transportés de manière conventionnelle du noyau vers le cytoplasme. Tat, Rev et Nef sont les premières protéines virales synthétisées. Par la suite, Rev catalyse le transport des ARN non épissés et mono-épissés qui ne peuvent être exportés dans le cytoplasme par la machinerie cellulaire. Dans le noyau, Rev lie la séquence RRE (*Rev Responsive Element*) présent au niveau de la région codante pour Env des ARN non épissés et mono-épissés (Malim 1989). La liaison de Rev au RRE masque son NLS et permet au complexe Rev-ARN d'être transporté dans le cytoplasme via le recrutement de l'exportine Crm1. Les ARN viraux sont traduits par la suite comme les ARN cellulaires à l'exception de l'ARN codant pour Pr160^{Gag-Pol} : un décalage du cadre de lecture intervient lors de la synthèse de ce précurseur grâce à une structure en épingle à cheveux riche en guanines se trouvant au début de la région codant pour

Pol et ralentit le passage du ribosome. Celui-ci recule alors d'un nucléotide (5-10% des cas) et lit le codon UUA en UUU initiant alors la traduction de *pol* [73, 208].

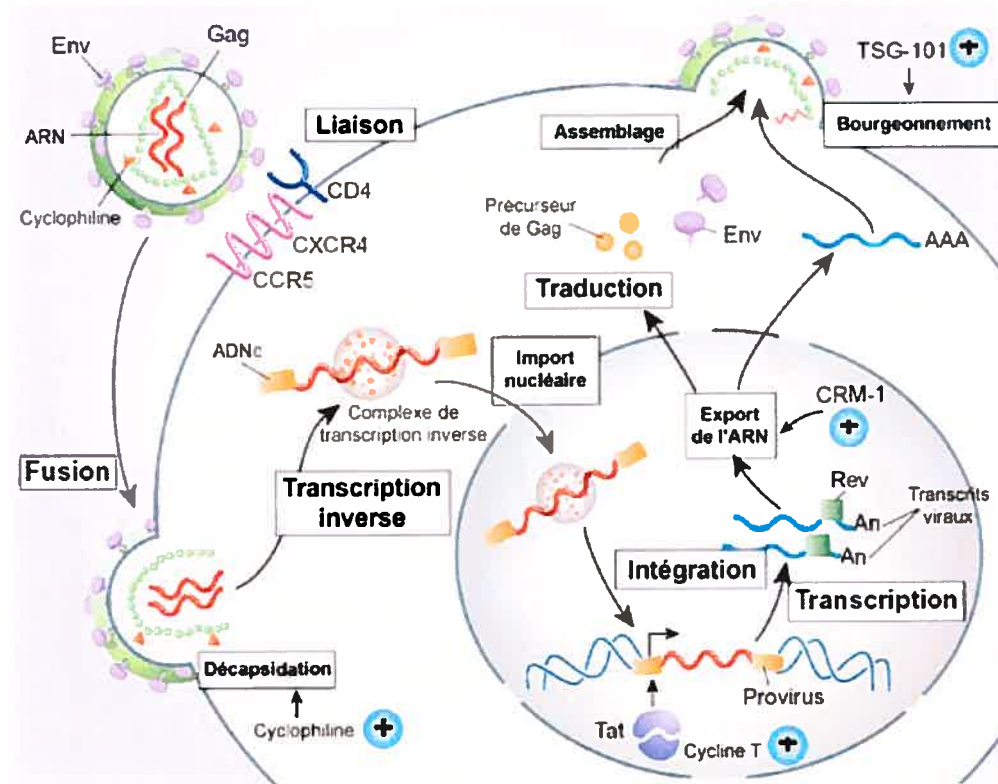


Figure 3. Cycle de réplication du VIH-1 : importance de la phase précoce. La phase précoce d'infection du VIH-1 comprend notamment les étapes de reconnaissance et d'adhésion à la cellule cible, de libération de la particule virale dans le cytoplasme de reverse transcription et de formation du complexe de préintégration. Celui-ci est ensuite importé dans le noyau cellulaire où l'ADN viral est intégré au génome de la cellule cible. (Figure adaptée de [6]). Abréviations: CRM-1 (*Chromosome Region Maintenance 1*).

3.f. Assemblage et formation de la particule virale

L'assemblage et la formation de la particule virale a lieu au niveau d'une bicouche lipidique. Le précurseur Pr55^{Gag} joue un rôle central dans le processus d'assemblage : en effet il contient les déterminants essentiels à l'association aux plateformes d'assemblage, à l'encapsulation de l'ARN viral et de certaines protéines virales, à l'interaction avec Env mais aussi au recrutement de la machinerie cellulaire

nécessaire au bourgeonnement de la particule virale. Suite à la synthèse du précurseur Pr55^{Gag} au niveau de polysomes libres dans le cytosol, Gag s'associe en quelques minutes à une membrane et initie les étapes subséquentes à la formation de la particule virale (Figure 4). Il a notamment été montré que 30 à 50% du Gag associé aux membranes se retrouve dans des domaines résistants aux détergents appelé DRM (*Detergent-Resistant Membrane*) et que la quasi-totalité du Gag est associée aux membranes 30 minutes après sa synthèse [209-212].

Le domaine MA joue un rôle crucial dans l'initiation de l'assemblage de la particule virale et le recrutement du précurseur Pr55^{Gag} aux membranes : en effet la modification co-transcriptionnelle du domaine N-terminale via l'ajout d'un acide myristilé permet l'ancrage du précurseur Gag dans la bicouche lipidique [15-17]. Cet acide gras saturé constitué de 14 carbones facilite l'association aux membranes grâce à des interactions hydrophobiques au niveau de la couche lipidique [19, 213, 214]. Cependant, la présence de ce groupement seul, bien que nécessaire, n'est pas suffisant à la présence de Gag à une membrane [15]. Une région basique au niveau du domaine N-terminal de MA stabilise l'ancrage de Gag à la membrane via des interactions électrostatiques entre les charges négatives des phospholipides membranaires et les charges positives des résidus basiques [18, 19, 215]. Le groupement myristilé est connu pour adopter deux conformations différentes affectant son association aux membranes : une conformation exposée et une conformation séquestrée (pour revues, [215, 216]). On a longtemps cru que l'association de MA aux membranes était régulée par une modification conformationnelle du groupement myristilé et que son exposition dépendait en partie de la multimérisation des précurseurs Pr55^{Gag}. Cependant, les études récentes ont montré que MA myristilée s'associe directement et spécifiquement à un phospholipide présent à la membrane plasmique, le phosphoinositol-(4,5)-bisphosphate (PI(4,5)P₂). Cette interaction induirait une modification conformationnelle du domaine N-terminal de MA et permettrait l'exposition du groupement myristilé et son ancrage dans la membrane où l'assemblage est initié [216-218].

Suite à la stabilisation de Gag au niveau de la bicouche lipidique, les domaines CA et NC induisent la multimérisation de molécules de Gag adjacentes (Figure 4). La région I d'interaction entre molécules de Gag est formée de deux domaines

distincts : une région basique dans NC qui interagit avec l'ARN viral et favorise la multimérisation de Gag et le domaine C-terminal de CA qui contient la région conservée MHR ([51]. L'introduction de mutations dans ces deux régions conduit généralement à un défaut d'assemblage de la particule virale. Alors que l'incorporation de l'ARN viral est important pour la multimérisation des molécules de Gag [60, 219, 220], sa présence n'est pas nécessaire à l'interaction entre Pr160^{Gag-Pol} et les molécules de Gag multimérisées [221]. Par contre NC joue un rôle central dans l'incorporation de Pr160^{Gag-Pol} dans la particule virale puisque la substitution de la nucléocapside au niveau de Gag par un domaine leucine (*leucine zipper*) conduit à une réduction importante de son encapsidation [222]. Env est par la suite incorporée dans la particule virale en formation via le domaine MA de Gag (Figure 4) et la protéine cellulaire, TIP47, jouerait le rôle de pont moléculaire entre Env et MA facilitant son incorporation dans la particule naissante [25].

Les étapes finales de formation et de bourgeonnement de la particule virale nécessitent le domaine L de Gag (Figures 2 et 4) et le recrutement des protéines du complexe ESCRT (pour une revue, [69]). Les interactions entre de Tsg101, AIP1/ALIX et le domaine p6 de Gag induisent la mobilisation de la machinerie nécessaire à l'invagination de la bicouche lipidique et à la formation de la particule virale. Il y a une très grande similarité topologique entre le bourgeonnement de la particule virale dans le milieu extracellulaire et la formation de vésicules dans le domaine luminal des CMV. Le bourgeonnement de la particule virale est initié par le recrutement du complexe ESCRT-I composé de Tsg101, Vps28 et Vps37 : cette étape est un prérequis à la mobilisation du complexe ESCRT-II [223-226]. Cependant l'importance de ce groupement protéique dans le bourgeonnement des particules virales est pour le moment mal comprise. Finalement, les protéines CHMP faisant partie d'ESCRT-III sont recrutées via AIP1 qui a la capacité d'interagir avec les complexes ESCRT-I et III [71, 227, 228, 229]. La déplétion des niveaux intracellulaires de Tsg101 ou la surexpression d'un mutant transdominant négatif de Tsg101, d'AIP1/ALIX ou des protéines CHMP inhibe la relâche de particules virales et conduit à l'apparition de structures virales proches de celles observés dans le cas d'un domaine L de Gag non-fonctionnel [71, 229-231]. En outre, la libération des particules virales nécessite le désassemblage du complexe ESCRT : la protéine Vps4 ATPase, qui est la seule enzyme connue du complexe ESCRT, contrôle la

dissociation du complexe ESCRT-III à la fin du processus d'invagination [71, 229, 232-236]. L'expression de mutants de Vps4 ayant perdu leur capacité de fixer l'ATP ou étant incapables de l'hydrolyser inhibe la relâche de particules virales dans le milieu extracellulaire [227-229]. Ainsi la machinerie endosomale joue un rôle essentiel dans le bourgeonnement et la relâche des particules du VIH-1.

Certaines observations suggèrent en outre que l'ubiquitination pourrait jouer un rôle dans le bourgeonnement et la libération subséquente de particules virales dans le milieu extracellulaire : initialement, il a été montré que le VIH-1 ainsi que d'autres rétrovirus incorporent de hauts niveaux d'ubiquitine au niveau de leur particule virale et Gag présente de nombreux sites de monoubiquitination [237]. La modification ou l'altération du domaine L de Gag affecte directement les niveaux d'ubiquitination de cette protéine [237-239]. Par ailleurs, l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome, qui réduisent les niveaux intracellulaires d'ubiquitines libres, ont été montrés comme induisant une inhibition de la relâche virale du VIH-1 à un stade tardif du bourgeonnement [239, 240]. De manière intéressante, la substitution des résidus lysines de Gag, qui sont des sites de monoubiquitination, au niveau des NC et p2 ou p6 conduit à l'accumulation de particules virales à la membrane plasmique à un stade tardif de bourgeonnement [241]. Le remplacement de toutes les lysines en aval de MA conduit à une réduction importante de la relâche de particules virales [241], suggérant que la monoubiquitination de Gag joue un rôle important dans le bourgeonnement et la libération des virions.

3.g. Maturation et structure finale des virions

La maturation de la particule virale a lieu de manière concomitante à la relâche ou très peu de temps après sa libération dans le milieu extracellulaire (Figure 6). Lors de ce processus, la protéase virale PR clive le précurseur Pr55^{Gag} ainsi que le précurseur Pr160^{Gag-Pol}. Ces différentes étapes conduisent à de profonds réarrangements structuraux de la particule virale : ce clivage séquentiel conduit à l'apparition d'un corps central conique dans lequel NC et l'ARN viral sont condensés.

La particule ainsi formée est constituée de deux molécules d'ARN liées par des ponts hydrogènes et associées aux NC dans la capsid du virion. CA entoure cette structure conique et renferme par ailleurs l'IN et la RT issus du clivage du précurseur

Gag-Pol ainsi que de l'ARN^{lys} et la cyclophiline A [38, 242](Figure 6). Le tout est entouré d'une bicouche lipidique issue du site d'assemblage et du bourgeonnement de la cellule productrice. Ainsi le virion incorpore plusieurs protéines cellulaires dont ICAM-1, LFA-1, les molécules du CMH de classe I et II, CD4, CD45, CD63, CD80 et CD86 [243-246]. MA stabilise la structure en tapissant l'intérieur de la bicouche lipidique. Nef, Vpr et Vif ainsi que la PR et d'autres protéines notamment cellulaires (actine, ubiquitine) se retrouvent au niveau de la particule virale. Le VIH-1 forme des virions d'un diamètre de 126 nm.

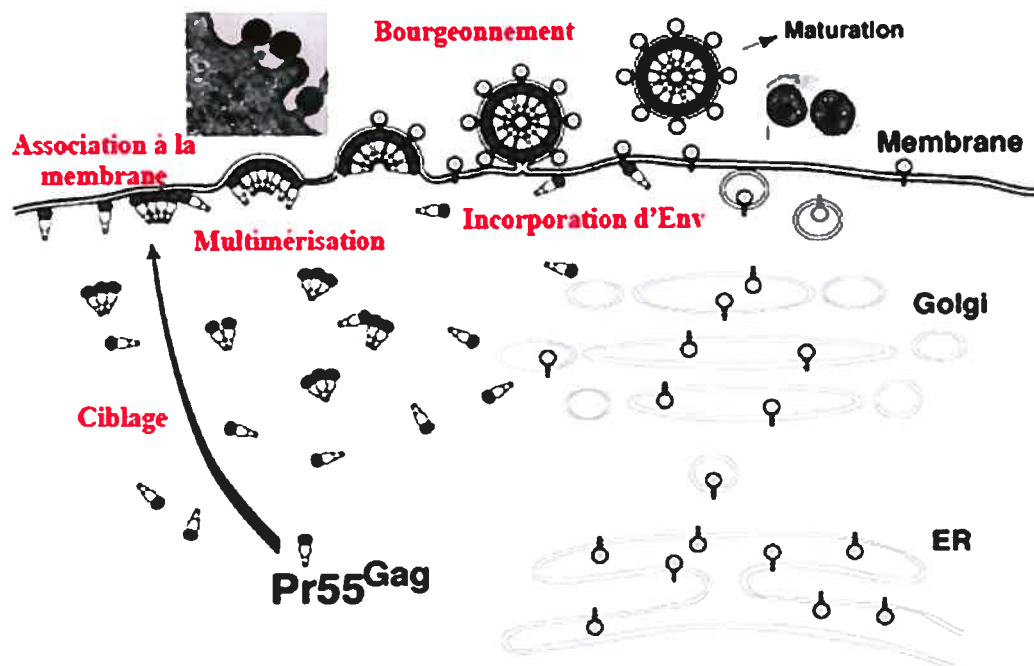


Figure 4. Assemblage et formation de la particule virale du VIH-1. Le précurseur Pr55^{Gag} est rapidement ciblé vers une plate-forme d'assemblage membranaire où il s'associe via son domaine N-terminal à la bicouche lipidique. Les molécules de Gag multimérisent par la suite et incorpore l'ARN viral en plus de protéines virales et cellulaires (Env, Vif, Vpr, APOBEC3G). Le domaine L de Gag recrute les protéines importante pour le bourgeonnement de la particule virale et médie la relâche du virion immature dans le surageant. La protéase virale médie finalement la maturation de la particule virale. (Figure adaptée du site www.retrovirus.info/Freed_figure.html)

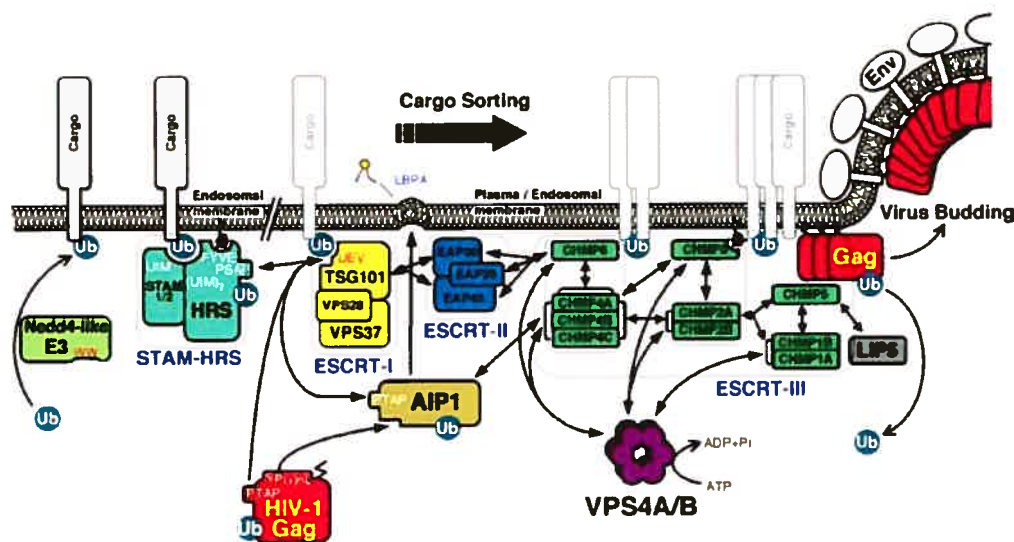


Figure 5. Machinerie cellulaire impliquée dans la formation des vésicules luminales (ESCRT) des CMV et la formation des particules virales. Ce modèle met en évidence les protéines cellulaires de la machinerie ESCRT interagissant avec la protéine Gag du VIH-1 ou intervenant dans la formation des virions du VIH-1 dont AIP1, TSG101 et Vps4A/B. La protéine Gag du VIH-1 présente certains motifs retrouvés chez la protéine cellulaire Hrs connue pour recruter TSG101 et le complexe ESCRT. La protéine cargo représentée dans ce schéma fait particulièrement référence aux protéines transmembranaires retrouvées à la membrane plasmique (i.e récepteurs) et qui sont recyclées dans les CMV suite à la rencontre de leur ligand (Figure adaptée de la revue [69]) Abbréviation : Ub (Ubiquitine).

4. Ciblage et mouvement intracellulaire de la protéine Gag

4.a. Plateformes d'assemblage

L'étude initiale de la localisation intracellulaire de Gag a montré une distribution ponctuée de Gag au niveau de la membrane plasmique : l'absence de marquage uniforme et continue en périphérie des cellules infectées suggère que le ciblage et la formation de particules virales se fait au niveau de domaines discrets et spécifiques de la bicouche lipidique [247-249]. Gag et Env (gp41 et gp160) colocalisent en fait avec des marqueurs de microdomaines de la membrane plasmique appelés radeaux lipidiques (*lipid raft*) : ces structures riches en cholestérol, glycosphingolipides et sphingomyéline se distinguent du reste de la membrane plasmique par une organisation compacte et très rigide [210-212, 250-252]. Ces microdomaines de la membrane plasmique ont la capacité de résister aux détergents à basse température d'où leur nom de DRM (*Detergent-Resistant Membranes*) ([253].

Ils ont été montrés comme étant la voie d'entrée et de sortie de nombreux pathogènes microbiens et viraux dont le virus de la grippe (pour revues, [254-257]). Par ailleurs, ces domaines de la membrane plasmique sont très importants pour la régulation des fonctions cellulaires via la transduction de signaux et les kinases de la famille Src localisent préférentiellement au niveau de ces domaines (pour une revue, [251]). Les virions incorporent de nombreuses molécules associées aux DRM dont le cholestérol, la sphingomyéline, le phosphoéthanolamine et certaines protéines contenant un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI), qui se trouvent au niveau de la surface extérieure des radeaux lipidiques, suggérant fortement que le bourgeonnement des particules virales a lieu au niveau de ses DRM [212, 250]. L'analyse biochimique de ces domaines a montré que Gag s'associe spécifiquement aux DRM : l'ajout sur Gag d'un motif présent au niveau des kinases de la famille Src conduit à une augmentation de son association aux DRM et ceci corrèle avec une production de VLP plus importante [211]. De plus la majorité, voire la quasi-totalité du Gag nouvellement synthétisée se retrouve associée aux DRM [209]. Ces données suggèrent donc fortement que les radeaux lipidiques jouent un rôle important dans la formation et le bourgeonnement de virions. Le cholestérol, élément critique des DRM, est central dans les mécanismes d'assemblage des virions : l'extraction du cholestérol de la membrane plasmique grâce notamment à la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) conduit à l'abolition de la relâche des VLP [212, 258-261]. L'association aux radeaux lipidiques dépendrait des domaines M et I de Gag [262]. D'autres travaux ont mis en avant l'importance du phosphoinositide PI(4,5)P₂ dans la formation de la particule virale [263]: MA interagit directement avec ce phospholipide [217]. Or la forme prédominante de PI(4,5)P₂ retrouvée à la membrane plasmique est constituée d'une chaîne d'acide gras saturé en position 1' et d'une chaîne insaturée en position 2'. L'analyse structurale de l'association entre MA et ce phospholipide conduit à une modification de la structure de PI(4,5)P₂ : seule la chaîne saturée en position 1' reste à l'intérieur de la membrane plasmique alors que la chaîne insaturée en 2' est expulsée de la bicouche lipidique et s'associe à MA [217]. Ainsi les auteurs suggèrent que l'élimination de la chaîne insaturée pourrait favoriser le recrutement du complexe Gag- PI(4,5)P₂ vers les microdomaines lipidiques.

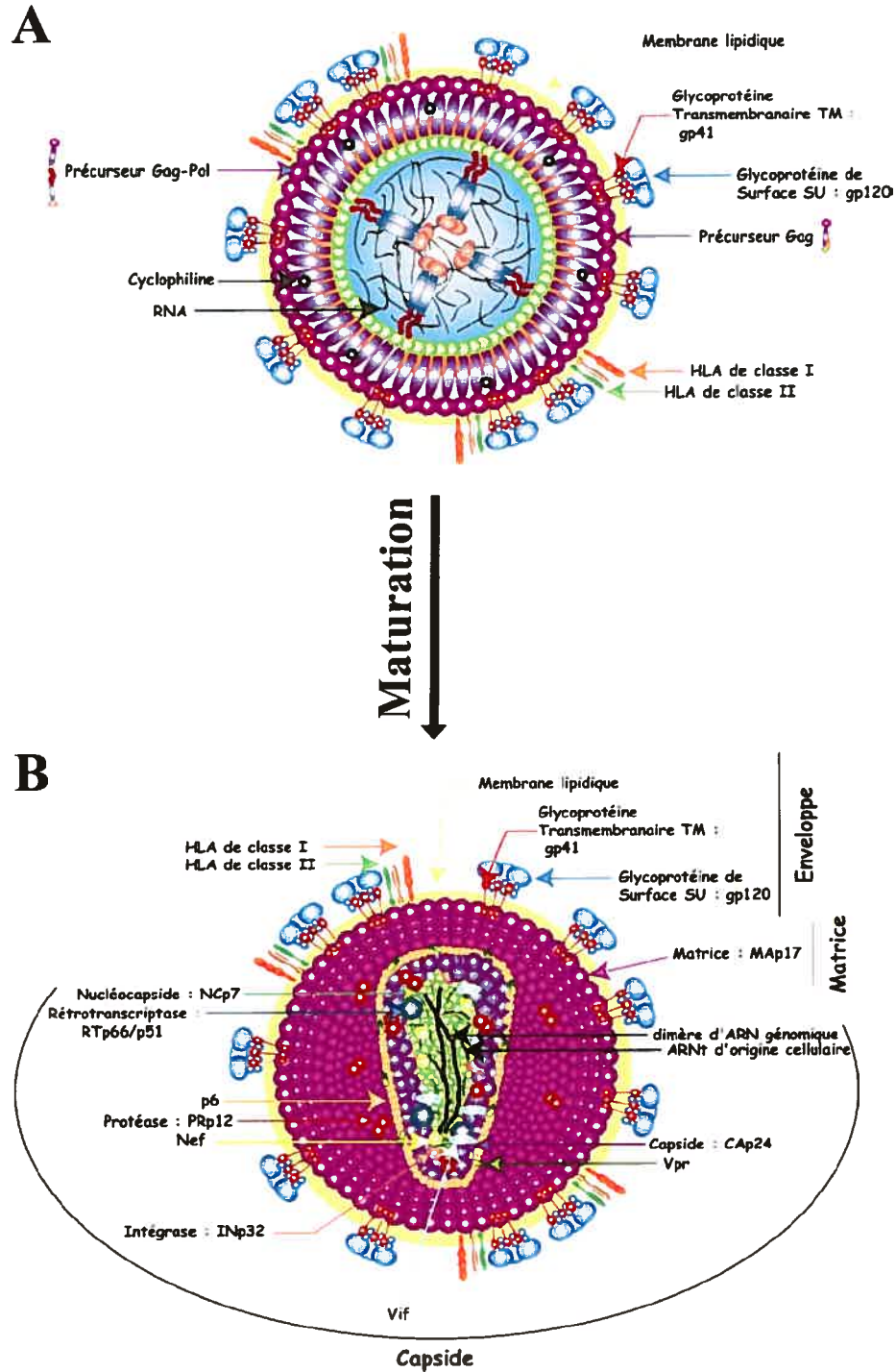


Figure 6. Structure de la particule immature et mature : importance de la protéase virale. (A) Structure de la particule virale immature. (B) Structure de la particule virale mature suite au clivage de Gag par PR (Figure adaptée de la thèse de V. Goldschmidt, 2004)

La caractérisation des radeaux lipidiques a cependant soulevé une certaine controverse, certaines évidences suggérant que les méthodes d'extraction des DRM par gradient de sucrose affecteraient la structure des membranes et créeraient artificiellement ces DRM [264]. Des études récentes suggèrent que le VIH-1 pourrait bourgeonner dans d'autres microdomaines de la membrane plasmique, distincts des DRM. On sait notamment que la particule virale incorpore de hauts niveaux en CD63, une tétraspanine très peu abondante au niveau de la membrane plasmique et ne colocalisant pas avec des marqueurs des radeaux lipidiques [265]. Or, CD63 au niveau de la membrane plasmique se retrouve principalement dans des domaines enrichis en tétraspanines appelés TEM (*Tetraspanin-enriched microdomain*). L'incorporation élevée de CD63 dans le virion suggère que le virus peut bourgeonner au niveau de ces domaines [265-269]. Nydegger *et coll.* ont montré que près de 20 % de la population de Gag présent à la membrane plasmique colocalise avec CD63 et que plus de 40 % de cette même population se retrouve dans des domaines contenant CD9, une autre tétraspanine, au niveau des cellules HeLa et des lymphocytes T. En outre, une proportion significative de Tsg101, en présence du VIH-1, colocalise avec CD63, suggérant ainsi que le VIH-1 peut recruter la machinerie endosomale nécessaire au bourgeonnement des particules virales au niveau de ces TEM [270]. Ces TEM sont impliqués dans de nombreux mécanismes dont l'adhésion cellulaire, la migration, la fusion entre cellules, la costimulation et la transduction de signaux extracellulaires (pour une revue, [271-273]). De manière intéressante, l'organisation des TEM est dépendante du cholestérol bien qu'ils soient un domaine différent des DRM : le traitement à la M β CD conduit à une diminution des interactions entre tétraspanines retrouvés dans les TEM, suggérant un rôle organisationnel du cholestérol au niveau des TEM [274].

Finalement, le modèle basé sur la présence d'une plateforme unique d'assemblage et de bourgeonnement du VIH-1, les radeaux lipidiques, est contesté par plusieurs observations suggérant que le virus aurait usurpé la machinerie cellulaire impliquée dans la formation d'exosomes pour assembler et relâcher ses propres particules (concept du Cheval de Troies ou *Trojan exosome Hypothesis* ; pour une revue [275]). Les similarités morphologiques entre les vésicules intraluminales des CMV et les virions ainsi que les interactions mises en évidence entre Gag et la machinerie ESCRT conduisent à supposer que la production de

particules virales n'est autre qu'un processus dérivé de la formation d'exosomes relâchés par la suite dans le domaine extracellulaire (Figure 6). Les exosomes sont initialement synthétisés au niveau de compartiments intracellulaires appelés CMV (Figure 6). Ces structures peuvent selon les types cellulaires et en présence de la stimulation adéquate fusionner avec la membrane plasmique et libérer dans le domaine extracellulaire leur contenu, relâchant leurs vésicules intraluminales. Ces vésicules, synthétisées chez de nombreuses cellules eucaryotes, peuvent fusionner avec la membrane périphérique des cellules environnantes et sont notamment impliquées dans la différenciation tissulaire, dans l'activation et la stimulation de certaines cellules du système immunitaire (pour une revue, [276]). La composition des membranes limitantes des exosomes et des virions est très proche [277] : les exosomes, tout comme les virions présentent dans les lymphocytes T un enrichissement en CD63 et CD81 au niveau de leur membrane limitante alors qu'ils ne présentent pas de CD45, un marqueur retrouvé principalement à la membrane plasmique. CD63 et CD81 se retrouvant à la membrane plasmique au niveau de microdomaines, Booth *et coll.* proposent que la relâche des virions ait lieu au niveau de domaines *endosome-like* présents au niveau de la membrane plasmique des lymphocytes T et qui sont proches des microdomaines de bourgeonnement présent au niveau des CMV, où a lieu la formation des vésicules intraluminales [277]. Ces microdomaines pourraient s'apparenter aux TEM du fait notamment de la présence de CD63 [270]. Ces microdomaines *endosomes-like* seraient donc être une plateforme alternative d'assemblage et de bourgeonnement des particules virales.

4.b. Localisation intracellulaire différentielle de Gag : importance du type cellulaire

De nombreuses études effectuées dans différents types cellulaires ont mis en avant de profondes disparités dans la distribution intracellulaire de Gag, suggérant que sa localisation pourrait être dépendante du type cellulaire. Initialement, l'analyse par microscopie électronique a mis en évidence la présence de particules naissantes particulièrement au niveau de la membrane plasmique des lymphocytes T [278]. De plus, le précurseur Pr55^{Gag} ainsi que ses produits de maturation présentent une localisation prédominante à la membrane plasmique dans les cellules lymphocytaires ainsi que dans un grand nombre de lignées transformées telles que les cellules HeLa, COS-1 ou HEK293T [247, 279-281]. Ces observations coïncident avec la présence

au niveau de la membrane plasmique des radeaux lipidiques, des TEM ou encore des domaines *endosome-like* en plus de $PI(4,5)P_2$ indispensable au recrutement et à l'initiation de l'assemblage de la particule virale [210, 212, 217, 263, 270, 277]. Cependant, dans un certain nombre de cas, la distribution intracellulaire de Gag semble plus complexe : plusieurs groupes ont notamment pu observer par microscopie à fluorescence que Gag se retrouve dans des compartiments intracellulaires [229, 279, 281]. Dans le cas des cellules erythroleucémiques K562, Gag s'accumule préférentiellement dans ces compartiments intracellulaires. Par contre, dans le cas des cellules monocytaires THP-1, les cellules du mélanome humain Mel JuSo ou encore des cellules HEK293, un phénotype intermédiaire est observé et Gag se retrouve à la fois à la membrane plasmique mais aussi dans des compartiments intracellulaires [279, 281]. Même dans le cas des cellules HEK293T et HeLa où Gag s'accumule préférentiellement à la membrane plasmique, près de 20% de la population totale présente une localisation de Gag dans des compartiments intracellulaires [123, 282, 283].

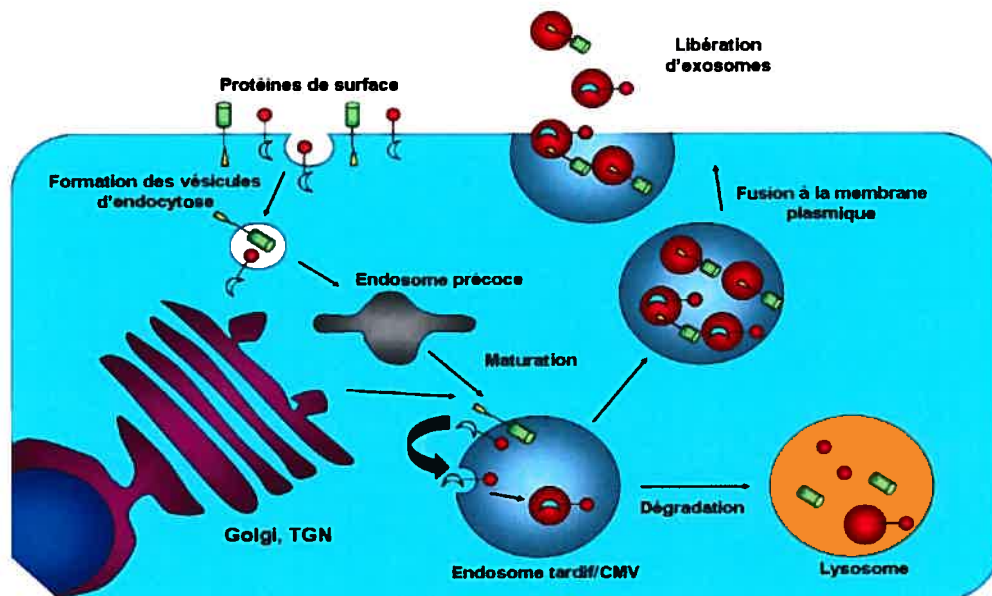


Figure 7. Importance des CMV au niveau cellulaire : voie d'exocytose et de dégradation. Les CMV sont issus du recrutement des vésicules issues de l'endocytose de protéines présentes à la surface de la cellule. Ces compartiments peuvent mûrir et donner des lysosomes où les protéines seront alors dégradées ou ces structures intracellulaires peuvent être recrutées et libérer leur contenu intraluminal.

. De manière plus intéressante encore, l'observation attentive des macrophages et des cellules dendritiques par microscopie électronique, a montré une accumulation très importante de particules virales matures dans des compartiments intracellulaires présentant les marqueurs des CMV tels que les molécules du CMH-II, CD63, Lamp1 et LBPA (*Lysobisphosphatidic acid*), phospholipide présent dans les vésicules intraluminales des CMV [250, 267, 269, 284, 285]. Par ailleurs, des particules en train de bourgeonner au niveau des CMV ont pu être observées par microscopie électronique suggérant que Gag pourrait être directement ciblé vers ces compartiments [267, 269, 284, 286]. L'incorporation préférentielle de marqueurs se retrouvant dans les CMV en grande majorité tel que CD63, les molécules du CMH-II ou encore Lamp-1, suggère que l'acquisition de la couche lipidique entourant le virus pourrait se faire au niveau de ces compartiments cellulaires [267, 269]. En outre, la localisation des microdomaines *endosome-like* d'assemblage du VIH-1 pourrait différer selon les types cellulaires : alors qu'ils se trouveraient majoritairement à la membrane plasmique dans les lymphocytes T, ceux-ci pourraient se trouver préférentiellement dans les CMV au niveau des macrophages [277, 279], d'où une différence importante de la localisation intracellulaire de Gag selon les types cellulaires. Ono et Freed ont finalement montré que certains domaines de MA sont déterminants pour la localisation intracellulaire de Gag : l'altération de ces résidus induit une redistribution de Gag dans les CMV au niveau des cellules HeLa, alors que les macrophages sont insensibles à ces modifications et conservent une localisation majoritaire de Gag dans les CMV ([280] ; voir section 3.d). Le fait que le VIH-1 pirate la machinerie cellulaire impliquée dans la formation de vésicules intraluminales au niveau des CMV, supporte l'idée d'un bourgeonnement direct de Gag dans ces compartiments intracellulaires selon les types cellulaires. Les virus qui se retrouvent dans les CMV au niveau des macrophages mais aussi dans certains cas dans les cellules dendritiques restent infectieux et peuvent toujours être efficacement relâchés [267, 269, 285]. Toutes ces données suggèrent que la localisation intracellulaire de Gag serait dépendante du type cellulaire et que certains compartiments intracellulaires, particulièrement les CMV, pourraient jouer un rôle important dans l'assemblage et la relâche de particules virales. Cette localisation de Gag, dépendante du type cellulaire, pose donc la question des facteurs cellulaires et viraux influençant sa distribution.

4.c. Facteurs cellulaires influençant la distribution intracellulaire de Gag

Cholestérol et PI(4,5)P₂

Comme évoqué précédemment, le cholestérol ainsi que certains phospholipides dont PI(4,5)P₂ sont essentiels à l'initiation de l'assemblage de la particule virale ainsi que la libération de celle-ci dans le milieu extracellulaire. Il a notamment été montré que l'infection par le VIH-1 modifie le ratio phospholipide/cholestérol au niveau de la membrane plasmique suggérant que la distribution en lipide de la membrane limitante est importante pour la propagation du virus [266]. À l'inverse, Lindwasser *et coll.* ont montré que la redistribution du cholestérol de la membrane plasmique vers les CMV, par l'utilisation de la drogue U18666A, induit une forte accumulation de Gag dans ces compartiments intracellulaires au niveau des cellules COS-1 : la relocalisation du cholestérol dans les CMV conduirait à une augmentation de près de 8 fois de l'accumulation de Gag dans ces mêmes compartiments intracellulaires 48h post-transfection sans pour autant affecter la relâche de particules virales [287]. Bien que Jounevet *et coll.* aient par la suite montré que l'utilisation de cette même drogue n'affecte pas la localisation précoce (14h post-transfection) d'une construction Gag-GFP au niveau de la membrane plasmique dans les cellules HEK 293T [288], ces résultats suggèrent que la localisation intracellulaire de Gag à des temps tardifs peut être influencée par la distribution du cholestérol dans la cellule. Gag est en outre connu pour s'accumuler préférentiellement au niveau d'un site d'interaction entre la cellule effectrice infectée et une cellule-cible, favorisant ainsi la propagation rapide du virus par la formation d'une synapse virologique [289-291]. La déplétion du cholestérol à la membrane plasmique des lymphocytes T infectées conduit à une redistribution intracellulaire drastique de Gag : au lieu de se retrouver en majorité au niveau de la zone de contact cellule-cellule, la protéine Gag est dispersée dans toute la cellule [292], suggérant que le cholestérol joue un rôle important dans la formation de la synapse virologique mais dans la distribution et l'accumulation de Gag au niveau de cette région de contact entre cellules.

Par ailleurs l'analyse de la composition lipidique des différentes membranes cellulaires a montré qu'il existe une distribution préférentielle de certains phosphoinositides au niveau de certains compartiments cellulaires : par exemple, PI(4,5)P₂ a été montré comme se trouvant préférentiellement au niveau de la face

cytoplasmique de la membrane plasmique [293-295]. En outre, la synthèse et la distribution intracellulaire de ce phosphoinositide sont hautement régulées et impliquent de nombreux facteurs : par exemple Arf6 a été identifié comme régulant l'activité de la phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase. Or l'expression d'un mutant d'Arf6 dépourvu de son activité GTPase a la capacité de relocaliser PI(4,5)P₂ dans des compartiments endosomaux enrichis en ce phospholipide. Et cette redistribution de PI(4,5)P₂ induit une relocalisation de Gag de la membrane plasmique vers ces compartiments enrichis en PI(4,5)P₂ et à une réduction de la relâche de particules virales [263]. De plus la surexpression d'une polyphosphoinositide 5-phosphatase IV, qui diminue les niveaux de PI(4,5)P₂ de la membrane plasmique, conduit à une redistribution importante de Gag de la membrane plasmique vers les CMV, suggérant que ce phospholipide est important pour la localisation intracellulaire de Gag et corrélant avec les travaux de Saad *et coll.* qui ont montré que MA interagit directement avec PI(4,5)P₂ [217]. La redistribution de PI(4,5)P₂ induit donc une relocalisation de Gag dans des compartiments endosomaux [263].

AP2 et AP3

Env est connu pour interagir avec certains constituants de la machinerie cellulaire de sortie et d'endocytose, dont la protéine AP-2 (*Adaptor Protein 2*) impliquée dans la voie d'endocytose clathrine-dépendante [296, 297]. Or, des travaux récents ont montré que Gag serait elle aussi capable d'interagir avec AP-2 [31]. Un motif YxxΦ au niveau de la jonction MA-CA serait critique pour l'interaction avec AP-2 et sa sous-unité μ2. L'altération de cette interaction conduit à une augmentation de la relâche de particules virales en plus d'affecter la localisation intracellulaire de Gag au niveau des cellules HeLa : en effet une construction Gag-EGFP en présence d'un mutant d'AP-2 incapable d'interagir avec la protéine virale se retrouve préférentiellement au niveau de microdomaines de la membrane plasmique plus importants en taille mais en nombre plus réduits comparés à ceux observés en présence d'AP-2 sauvage [31]. L'interaction entre Gag et AP-2 a donc une incidence sur la localisation intracellulaire de la polyprotéine virale et sur sa capacité à être relâchée efficacement.

Une autre protéine adaptatrice a été montrée comme jouant un rôle dans le trafic de Gag : AP-3 (*Adaptor Protein 3*) est capable d'interagir directement avec le domaine N-terminal de MA (résidus 1 à 19) [30]. L'expression d'un fragment N-terminal d'AP-3 joue le rôle de mutant transdominant négatif de la relâche virale du VIH-1 sans affecter les niveaux intracellulaires de Gag. Inversement la déplétion d'AP-3 dans les cellules HEK 293T et HeLa corrèle avec une inhibition de la relâche virale, suggérant que AP-3 joue un rôle central dans l'assemblage et la libération des particules virales [30]. AP-3 est notamment connu pour diriger la protéine CD63, marqueur des CMV, dans son compartiment cellulaire approprié [298, 299]. De manière très intéressante, l'expression d'un mutant transdominant négatif d'AP-3 induit une modification de la localisation de Gag au niveau intracellulaire : Gag a une distribution cytoplasmique accrue et surtout la polyprotéine virale ne colocalise plus avec CD63, suggérant qu'AP-3 est important pour la localisation de Gag dans les CMV ainsi qu'au niveau de la membrane plasmique. Cette modification de la localisation intracellulaire de Gag ne serait pas liée à une modification du trafic des compartiments endosomaux selon les auteurs [30]. La protéine AP-3 jouerait donc un rôle central dans le ciblage de Gag au niveau du compartiment d'assemblage approprié et l'inhibition de l'interaction entre Gag et AP-3 affecterait sévèrement la localisation intracellulaire de la protéine virale.

POSH

Comme évoqué précédemment, de nombreuses données ont suggéré l'importance de l'ubiquitine dans le ciblage de Gag et l'assemblage de la particule virale (pour une revue, [69]). Par ailleurs, la monoubiquitination est connue pour réguler les phénomènes d'endocytose en plus de jouer un rôle dans le ciblage de protéines du TGN vers les compartiments endosomaux tardifs ou CMV [300-304]. Le TGN est essentiel pour l'incorporation d'Env au niveau de la particule naissante puisque le transport rétrograde d'Env a lieu entre le TGN et la membrane plasmique [25]. Or, Alroy *et coll.* ont identifié une ubiquitine ligase E3 associée au TGN, appelé POSH, et jouant un rôle important dans le mouvement intracellulaire de Gag et la synthèse de particules virales : la déplétion intracellulaire de POSH inhibe la relâche virale au niveau des cellules HeLa [305]. L'effet de cette ubiquitine ligase est indépendant du domaine L de Gag et a lieu à un stade pré-bourgeonnement. La surexpression de POSH dans les cellules H187 conduit à la disparition de Gag du

TGN et à son accumulation à la membrane plasmique [305]. Inversement, la déplétion de POSH dans les cellules H153 résulte en la redistribution de Gag dans des compartiments intracellulaires différents du TGN suggérant que Gag transiterait par le TGN avant de rejoindre la membrane plasmique et que ce transport serait régulé par l'ubiquitine ligase POSH. Cependant, les auteurs ont été dans l'incapacité d'observer une modification de l'ubiquitination de Gag en présence ou absence de POSH, suggérant que POSH régulerait avant tout la sortie de vésicules du TGN vers la membrane plasmique plutôt que l'ubiquitination directe de la protéine virale [305]. Ce transit de Gag dans le TGN suggère qu'un transport concomitant de Gag et d'Env vers la membrane plasmique pourrait avoir lieu. POSH joue donc un rôle important dans le transport de Gag vers le TGN et dans la distribution globale de la protéine virale.

TSG101 et la machinerie cellulaire ESCRT

Il est difficile de dissocier la protéine Tsg101 de son motif d'interaction P(T/S)AP au niveau de Gag. Cependant certaines études se sont principalement focalisées sur ce facteur cellulaire et son importance pour la localisation de Gag au niveau intracellulaire. Goff *et coll.* ont initialement démontré que la surexpression de Tsg101 conduit à une accumulation de Gag dans des compartiments où se trouve Hrs, une protéine connue pour être internalisée au niveau de la membrane plasmique et recyclée au niveau des endosomes [306]. L'interaction entre Gag et Tsg101 est essentielle pour la formation de particules virales puisque la surexpression de Hrs, résultant en la séquestration de Tsg101 et l'abolition des interactions entre Gag et cette protéine cellulaire, conduit à l'inhibition de la relâche virale ([307]; Figure 5 ; pour plus de détails voir aussi la section 4d). En outre, la surexpression de Tsg101 induirait une accumulation de Gag dans les endosomes précoces, observation confirmée par fractionnement cellulaire [306]. Tsg101, à de hauts niveaux intracellulaires, prévient l'association de Gag avec la membrane plasmique et diminue la relâche virale. Finalement, la déplétion de Tsg101 par siRNA affecte la relâche virale en plus de modifier la localisation intracellulaire de Gag : Harila *et coll.* ont montré par fractionnement cellulaire que la déplétion de Tsg101 conduit à une accumulation de Gag à la membrane plasmique en absence de Vpu alors que dans le même contexte la présence de Tsg101 permet l'internalisation du précurseur Pr55^{Gag} dans les membranes internes [129]. Tsg101 tout comme les autres

composants de la machinerie endosomale ESCRT influence la localisation intracellulaire de Gag particulièrement sa présence dans les CMV.

HLA-DR et les molécules du CMH de classe II

Les CMV sont avant tout connus pour être le site d'assemblage des molécules du CMH-II : ces compartiments sont aussi appelés MIIC pour *MHC-II enriched compartments* et sont le site de chargement des peptides antigéniques au niveau de la molécule du CMH-II. Calafat et al. ont montré que l'expression de ces molécules induit la formation de compartiments CD63+/Lamp1+ apparentés aux MIIC au niveau des cellules HEK 293 [308]. De plus, la maturation de ces compartiments nécessite la présence du domaine transmembranaire des chaînes α et β des molécules du CMH-II. L'expression ectopique de HLA-DR, molécule du CMH-II, induit une relocalisation intracellulaire de Gag au niveau des cellules HEK 293T et HeLa : en présence de HLA-DR la majorité des cellules présentent une localisation de Gag ponctuée, colocalisant avec tous les marqueurs des CMV tels que CD63, Lamp1 et le phospholipide spécifique des CMV, LBPA [282]. Dans les faits, l'expression de HLA-DR conduit à une accumulation de produits matures (p24) dans les compartiments endosomaux et à une diminution de 2 à 3 fois de la relâche virale. Par ailleurs, l'effet de HLA-DR sur la relocalisation intracellulaire de Gag est dose-dépendante et cette redistribution de Gag dans les CMV n'a lieu qu'en présence des molécules classiques du CMH-II alors que HLA-DO et HLA-DM, qui sont des molécules non-classiques du CMH-II, n'ont pas la capacité de relocaliser Gag dans les CMV. La présence du CMH-II au niveau des cellules cibles du VIH-1 telles que certains lymphocytes T et surtout les macrophages, tend à supposer que la distribution de Gag et sa localisation intracellulaire pourrait être influencée par la présence de HLA-DR et affectée par les niveaux d'expression des molécules classiques du CMH-II dans ces cellules.

4.d. Facteurs viraux influençant la distribution intracellulaire de Gag

Le domaine MA

Le domaine MA de Gag est indispensable à l'association aux membranes et à la formation subséquente de la particule virale (pour une revue, [12]). L'une des régions critiques de MA est son domaine basique : c'est en fait un déterminant

essentiel pour la localisation de Gag au niveau de la membrane plasmique. Une large délétion de MA résulte en la relocalisation de particules virales au niveau du réticulum endoplasmique et à une forte diminution de la relâche virale et de son infectivité [309, 310]. Bien que n'abrogeant pas la formation de particules virales, l'altération de MA conduit à une relocalisation de Gag sans toutefois savoir si ceci est dû à un ciblage direct vers le RE ou à une redistribution suite au ciblage de Gag vers la membrane plasmique. Ces données suggèrent cependant que Gag a besoin d'un domaine MA intact pour pouvoir initier la formation de la particule virale au niveau de la membrane plasmique et être par la suite relâché dans le milieu extracellulaire. En outre, des délétions plus localisées dans MA peuvent causer les mêmes effets et induire une relocalisation de Gag dans des compartiments intracellulaires [18, 247, 248, 311] : les particules présentes dans ces structures sont cependant bloquées à un stade tardif du bourgeonnement [21]. Ces effets ont par ailleurs été observés au niveau d'autres rétrovirus où l'introduction de mutations dans MA peut causer une modification du ciblage de Gag, par exemple chez le virus de la leucémie murine (MLV) ou encore le virus du sarcome de Rous (RSV) [312-314]. La substitution du domaine tronqué de MA du VIH-1 par le domaine MA du MLV restaure le ciblage de Gag à la membrane plasmique, démontrant que certaines régions du domaine MA sont indispensables à la localisation appropriée de Gag au site d'assemblage [315, 316]. Ono et Freed ont analysé plus précisément les résidus critiques de la relocalisation de MA vers des compartiments intracellulaires : il apparaît que les résidus 17 à 31 de la région basique ainsi que les résidus 84 à 88 de MA jouent un rôle central dans la redistribution de Gag au niveau de vésicules trans/post-Golgi. Des mutants au niveau des résidus 29KE/31KE et 85YG de MA se localisent en majorité dans des compartiments CD63+ [280]. Par ailleurs le mutant 29KE/31KE colocalise partiellement avec LBPA, suggérant que l'altération du domaine basique ou des résidus 84 à 88 de MA induit une redistribution de Gag de la membrane plasmique vers les CMV au niveau des cellules HeLa. Ce phénotype est observable tant pour la forme mature MA que pour le précurseur Pr55^{Gag} suggérant que l'introduction de mutations dans la région basique ou au niveau des résidus 84 à 88 de MA induit un ciblage initial différentiel du précurseur Pr55^{Gag} qui résulte en la formation de particules virales matures au niveau des CMV [280]. De manière très intéressante, les mutants de MA tout comme la souche sauvage, se retrouvent dans des compartiments CD63+ et Rab7+ au niveau des macrophages, cellules où on a

observé précédemment une accumulation de particules matures dans les CMV [269, 285]. Ces données suggèrent que la modification de la région basique ou des résidus 84 à 88 de MA au niveau des macrophages ne résulteraient pas en une redistribution intracellulaire de Gag en comparaison de la souche sauvage puisque Gag serait initialement ciblé dans les CMV dans ce type cellulaire. En d'autre terme, l'altération du domaine MA n'aurait pas d'effet sur la localisation de Gag lorsque celui-ci est ciblé directement dans les CMV dans un contexte normal.

Le motif PTAP et le domaine L

Deux travaux récents ont montré l'importance du motif PTAP et du domaine L de la région p6 dans la localisation intracellulaire de Gag. Goff *et coll.* ont tout d'abord montré que la localisation intracellulaire de Gag dépendait de p6 [306]: en utilisant une technique de fractionnement cellulaire capable de concentrer les membranes plasmique et endosomales (P100), ils ont observé que l'absence du domaine p6 conduit à une diminution voire absence de Gag de la fraction P100. En outre, la délétion du domaine p6 conduit à une accumulation de Gag et de ses produits de maturation au niveau de la fraction enrichie en endosomes précoces (P27) [306]. Les mutants du domaine L ne se retrouvent plus dans des compartiments intracellulaires corrélant avec les observations faites par Neil *et coll.* [123]. Par fractionnement cellulaire, Harila *et coll.* ont montré qu'un mutant de p6 reste majoritairement associé à la membrane plasmique et n'est pas capable d'être internalisé vers des compartiments intracellulaires, d'où son importance pour la localisation de Gag dans des structures intracellulaires [129]. Toutes ces évidences sont sujettes à débat puisque Ono et Freed ont observé au niveau des macrophages une colocalisation du mutant p6 dans des structures CD63+, suggérant que la localisation du mutant p6 de Gag dans des compartiments intracellulaires serait type-cellulaire dépendante [280]. Cependant, les différentes observations faites en absence du domaine p6 ou dans un contexte d'altération des interactions entre ESCRT et Gag (e.g. Tsg101) mettent en avant l'importance des motifs d'interaction avec la machinerie endosomale pour la localisation intracellulaire de Gag.

Vpu et l'efficacité de relâche

Toutes les études mettant en évidence l'importance d'un facteur, qu'il soit viral ou cellulaire, dans la localisation intracellulaire de Gag implique un défaut de relâche

de particules virales dès lors que ce facteur est affecté. Or, la protéine accessoire Vpu est notamment connue pour moduler la relâche virale selon les types cellulaires [120-123, 126, 127, 280]. En absence de Vpu, le VIH-1 s'accumule sous forme de particules virales matures dans des vacuoles intracellulaires ainsi qu'à la membrane plasmique [121, 122]. Deora *et coll.* ont montré qu'une construction codant pour le domaine MA-GFP présente une localisation différentielle en présence ou absence de Vpu : en absence de Vpu, MA-GFP se retrouve majoritairement (92%) dans le cytoplasme des cellules HEK 293T [128]. A l'inverse, lorsque Vpu est exprimée, cette proportion passe à 58 % et le restant des cellules présente une localisation à la membrane plasmique, suggérant que Vpu favoriserait l'association de MA-GFP à la membrane plasmique dans les cellules HEK 293T dans un contexte où ce type cellulaire est sensible à l'effet de Vpu. La quantification par fractionnement cellulaire montre qu'en absence de Vpu, la majorité de Gag se trouve au niveau des fractions enrichies en cytosol alors que l'expression de Vpu en *trans* dans les cellules HEK 293T conduit Gag à se retrouver en majorité dans des fractions enrichies en membrane plasmique [128]. Bien que Handley *et coll.* aient montré par la suite par flotation que l'expression de Vpu dans le contexte des cellules HeLa et du provirus n'affecte pas significativement l'association de Gag aux membranes cellulaires, les auteurs ont tout de même observé une redistribution de Gag en présence de Vpu au niveau périphérique, suggérant que Vpu pourrait influencer la localisation intracellulaire de Gag [317].

Les études les plus récentes effectuées sur cette protéine accessoire et son importance pour la localisation de Gag confirment les observations faites initialement : Harila *et coll.* ont dans un premier temps montré par fractionnement cellulaire que l'absence de Vpu conduit à une relocalisation du précurseur p55^{Gag} initialement présent à la membrane plasmique vers des compartiments intracellulaires [129]. Dans les cellules HeLa, le précurseur p55^{Gag} nouvellement synthétisé est ciblé au niveau de la membrane plasmique. Par la suite, en présence de Vpu, le précurseur s'accumule à la membrane plasmique pour être relâché dans le milieu extracellulaire alors qu'il est redirigé en grande majorité dans des compartiments intracellulaires, en absence de la protéine accessoire, supposément via un processus d'internalisation [129]. Ce mécanisme de redistribution intracellulaire du précurseur p55^{Gag} est dépendant du domaine p6 et de Tsg101, puisque la délétion de la région p6 de Gag

ou la déplétion des niveaux cellulaires de Tsg101 empêchent la relocalisation du précurseur dans des compartiments intracellulaires [129]. Les cellules HeLa sont connues pour être sensibles à Vpu, c'est-à-dire que l'expression de Vpu induit dans ce type cellulaire une importante augmentation de la relâche virale, contrairement aux cellules HOS qui ne présentent pas de différence dans la relâche de virions en présence ou absence de Vpu. Dans ce contexte, Neil *et coll.* ont montré que près de 70 % des cellules HeLa transfectées présentent une accumulation intracellulaire de Gag-CFP en plus d'une localisation au niveau de la membrane plasmique [123]. À l'opposé, seul 5 % des cellules HOS présentent une localisation intracellulaire de Gag-CFP. L'expression en *trans* de Vpu induit une réduction importante du nombre de cellules présentant une accumulation intracellulaire de Gag, passant de 70 % à un peu plus de 10% : la localisation à la membrane plasmique devient le phénotype majoritaire (60%), suggérant que la modulation de l'efficacité de relâche des virions par Vpu affecterait la distribution intracellulaire de Gag-CFP. Son accumulation intracellulaire dans un contexte de défaut de relâche (Vpu-) a lieu dans des compartiments CMV puisque Gag colocalise avec CD63 [123]. Cependant une certaine proportion du Gag-CFP se retrouve aussi au niveau de compartiments CFP-Rab5a+, marqueur des endosomes précoces, suggérant que l'accumulation de Gag dans les CMV serait le résultat d'un processus d'internalisation [123]. L'utilisation de mutants transdominants négatifs de la dynamine (DynK44A) et d'Eps15, a permis de réduire de manière significative l'accumulation intracellulaire de Gag-CFP ainsi que des molécules de Gag issues d'une construction provirale [123], confirmant l'implication d'un processus d'internalisation dans la localisation intracellulaire de Gag. De manière intéressante, les molécules de Gag ciblées initialement au niveau de la membrane plasmique ne pouvant être internalisées suite au blocage de la voie d'endocytose clathrine-dépendante restent associées à la membrane plasmique et ne sont pas relâchées [123]. Un traitement à la subtilisine, une protéase faisant partie de la famille des sérines endoprotéinases, a la capacité de libérer ces particules virales séquestrées au niveau de la membrane plasmique [123]. Cette séquestration semble spécifique aux particules matures puisqu'un mutant au niveau du domaine PTAP de Gag, connu pour s'accumuler à la membrane plasmique n'est pas relâché suite au traitement à la subtilisine [123]. Toutes ces données corrént avec certaines études faites au niveau de différents types cellulaires [123, 126, 129] suggérant qu'un facteur de restriction cellulaire ayant des propriétés adhésives a la capacité de retenir

des particules matures à la surface cellulaire, favorisant l'internalisation de virions et réduisant significativement la relâche de ces particules virales. Vpu serait capable de surmonter ce bloc cellulaire tardif par un mécanisme dépendant des voies endocytaires [127]. Ainsi de nombreuses études ont montré que l'altération de l'efficacité de la relâche virale via l'action de la protéine accessoire Vpu, a la capacité d'induire une redistribution intracellulaire de Gag : Vpu empêche l'internalisation des molécules de Gag présent à la membrane plasmique vers des compartiments intracellulaires apparentés aux CMV.

Env

Les cellules épithéliales sont connues pour présenter deux domaines de la membrane plasmique fonctionnels et distincts que sont les domaines apical et basolatéral [318, 319]. Or, selon le type de virus enveloppé, le bourgeonnement de la particule viral a lieu soit au niveau apical soit au niveau basolatéral : les rétrovirus notamment sont connus pour être relâchés au niveau du domaine basolatéral [320-323] alors que les paramyxovirus ainsi que les orthomyxovirus bourgeonnent préférentiellement au niveau apical (pour une revue, [324]). En absence d'autres constituants viraux, Env est dirigée selon les virus soit au niveau apical ou basolatéral et la localisation d'Env corrèle avec le site d'assemblage du virus dans un contexte normal, suggérant qu'Env influencerait le choix du site d'assemblage et le bon recrutement de Gag au niveau du domaine de bourgeonnement. Dans le cas du VIH-1, Env est dirigée vers le domaine basolatéral en l'absence d'autres constituants viraux [321]. Lorsqu'Env n'est pas présent, Lodge *et coll.* ont montré qu'autant de formes matures de Gag sont relâchées du coté apical que du coté basolatéral. Par contre dès lors que Env est présente, plus de 95 % du total de p24 relâchée se retrouve au niveau basolatéral [325]. Par ailleurs, l'introduction du précurseur gp160 d'Env à des doses croissantes permet de restaurer la relâche de particules virales au niveau basolatéral démontrant bien que l'ajout d'Env en *cis* ou en *trans* influence le site de bourgeonnement et de relâche des particules virales dans le cas du VIH-1 dans un contexte de cellules polarisées [325]. Env joue un rôle similaire dans les lymphocytes T qui présentent eux-aussi une distribution polarisée de Gag, préférentiellement au niveau de la zone de contact entre cellules [326, 327] : l'absence de la glycoprotéine virale conduit à la disparition de la polarisation de Gag dans les lymphocytes T et à sa redistribution non-préférentielle à la membrane

plasmique [328]. De même, la déplétion du cholestérol présent à la membrane plasmique, empêche la détection d'Env dans la cellule et conduit à la redistribution de Gag dans le cytoplasme [292]. Le domaine de ciblage d'Env vers l'un des domaines de la membrane plasmique se situerait dans le domaine intracytoplasmique de la sous-unité gp41 d'Env [325, 328]. Par ailleurs, la délétion ou la substitution de résidus dans le domaine MA de Gag conduit à une perte de l'incorporation d'Env dans la particule virale ainsi qu'une redistribution de Gag de manière non-polarisée dans les cellules épithéliales [23, 325] : le domaine MA jouerait donc un rôle dans le recrutement de Gag par Env au côté basolatéral. On sait maintenant que la glycoprotéine de l'enveloppe nouvellement synthétisée transite du RE vers la membrane plasmique où elle est rapidement internalisée via un motif d'interaction avec AP-2 et redirigée vers le TGN par l'interaction avec TIP41 qui médie son transport rétrograde des endosomes vers le TGN [25]. Env doit transiter par les CMV pour atteindre son site final d'incorporation et pourrait donc favoriser le recrutement de Gag vers ces compartiments intracellulaires. Ces études démontrent en conclusion l'importance d'Env dans le ciblage de la protéine Gag vers le site d'assemblage et de bourgeonnement particulièrement dans les cellules épithéliales polarisées, suggérant qu'Env pourrait influencer la localisation intracellulaire de Gag.

4.e. Études précédentes et modèles proposés de ciblage et de trafic de la protéine Gag

La localisation différentielle de Gag selon le type cellulaire remet en question le dogme d'un ciblage initial unique du précurseur Pr55^{Gag} à la membrane plasmique suivi du bourgeonnement de la particule virale à la membrane périphérique. Cette différence phénotypique dans la localisation intracellulaire de Gag repose donc la question du recrutement initial de Gag et du site d'assemblage des particules virales. Deux grands modèles de ciblage et de trafic de la protéine Gag ont été postulés (Figure 7 et 8).

Les CMV : intermédiaires dans l'assemblage et le bourgeonnement de la particule virale

En plus de données statiques montrant une accumulation intracellulaire de Gag, l'adaptation de certaines techniques a permis de suivre en temps réel le mouvement de cette protéine virale et d'identifier sa voie de trafic et le site initial de formation

des particules virales. Deux études complémentaires ont mis en évidence le rôle central des CMV dans le ciblage de Gag et la relâche des particules virales. D'un côté, une construction couplant Gag à une tétracystéine biarsénique (TC) a été utilisée [329]: l'utilisation de dérivés fluorescents réagissant avec le groupement TC (FIAsH et ReAsH) permet de visualiser les molécules de Gag nouvellement synthétisées et leur mouvement dans la cellule. Dans les cellules HeLa, Gag se retrouve dans des structures périnucléaires une heure après le traitement avec le ReAsH. Ces structures augmentent en nombre au cours du temps pour finalement observer une colocalisation des molécules de Gag nouvellement synthétisées avec celles déjà présentes en périphérie de la membrane plasmique. L'utilisation d'une construction Gag-GFP confirme ces données au niveau des cellules COS-1 et des cellules Jurkat T traitées à la cycloheximide pour permettre l'accumulation des transcrits viraux et bloquer la synthèse de Gag [329]: suite à l'élimination de l'inhibiteur, Gag-GFP se retrouve tout d'abord au niveau du cytoplasme puis s'accumule dans des structures périnucléaires qui se dispersent au cours du temps à travers toute la cellule avant de se concentrer à la périphérie de la membrane plasmique. La colocalisation entre CD63 et Gag-GFP augmente au cours du temps, suggérant que Gag transite à un certain moment par les CMV. Dans les cellules COS-1, HeLa et Jurkat T, les molécules de Gag nouvellement synthétisées transiteraient dans un premier temps via des compartiments périnucléaires avant de se retrouver dans les CMV pour être redirigé vers la membrane plasmique où les particules virales formées sont relâchées. Les CMV joueraient le rôle d'intermédiaire dans le trafic de Gag, le bourgeonnement et la relâche de particules virales. Ces observations qualitatives sont renforcées par des données biochimiques: l'analyse du mouvement de Gag par fractionnement cellulaire couplé à un marquage radioactif et une chasse montre que les molécules nouvellement synthétisées qui sont majoritairement dans le cytoplasme au début du marquage se retrouvent rapidement et de manière significative dans des fractions enrichies en petites vésicules et en CMV (notés SV et LE respectivement) mais aussi de manière plus réduite dans la fraction enrichie en membrane plasmique au niveau des cellules HEK293T et des lymphocytes T chroniquement infectés MOLT [283]. Trois heures après le marquage, la quasi-totalité des molécules de Gag se retrouvent dans le milieu extracellulaire alors que la majorité du Gag restant dans la cellule est présent sous forme mature et s'accumule dans la fraction enrichie en CMV. Ces données suggèrent donc que le VIH-1 dans les

cellules HEK293T et les cellules MOLT s'assemblerait à la fois au niveau de la membrane plasmique mais surtout dans les CMV, confirmant l'importance de ce compartiment intracellulaire dans le ciblage et la formation de la particule virale. De manière intéressante, l'augmentation intracellulaire des concentrations en Ca^{2+} , connue pour induire le recrutement des CMV vers la membrane plasmique et la libération d'exosomes, stimule la relâche de particules virales [283, 329]. Ces deux études mettent en évidence le rôle central des CMV dans l'assemblage des particules virales et le ciblage initial de Gag confirmant les observations de Dong *et coll.*, montrant que l'interaction entre Gag et AP-3 est importante pour le recrutement de la protéine virale vers les CMV. Le précurseur Pr55^{Gag} serait donc initialement recruté dans les CMV ou des compartiments apparentés (Figure 7). Par la suite, selon les types cellulaires, leur capacité à induire constitutivement l'exocytose des CMV et la présence ou non d'un stimulus permettant la mobilisation des compartiments, les molécules de Gag s'accumuleraient dans des structures intracellulaires (e.g. macrophages) ou seraient transportées rapidement vers la membrane plasmique (lymphocytes T, cellules HeLa, HEK293T ou Cos-1) (pour une revue, [215]) où elles bourgeonneraient et seraient relâchées. Ce concept est conforté par le fait que le VIH-1 pirate des facteurs importants dans la formation des CMV en plus d'incorporer de nombreuses molécules présentes dans les CMV (CD63, CMH-II, Lamp1) au niveau de son enveloppe lipidique [267, 269, 277, 279].

La membrane plasmique : site principal d'assemblage de la particule virale

Plusieurs travaux remettent en question l'importance des CMV dans le ciblage initial de Gag et la formation des particules virales [123, 129]. Par ailleurs, certaines observations faites notamment en microscopie à fluorescence grâce à une construction Gag-TC (évoqué précédemment) ne corroborent pas les données de Perlman et Resh. En effet, l'utilisation de dérivés fluorescents a montré que Gag est directement ciblé à la membrane plasmique suite à sa synthèse dans le cytoplasme dans les cellules HeLa [281]. De manière intéressante, la localisation rapide de Gag à la membrane plasmique a lieu dans des domaines spécifiques : Rudner *et coll.* ont cependant été dans l'incapacité de visualiser Gag-TC dans des compartiments intracellulaires [281], suggérant que les molécules de Gag nouvellement synthétisées sont de manière prédominante ciblées directement vers la membrane plasmique et relâchées par la suite dans le milieu extracellulaire. En outre les études effectuées sur

le rôle de Vpu et son importance dans la localisation intracellulaire de Gag ont montré que l'accumulation de Gag dans les CMV serait avant tout le résultat d'un processus d'internalisation de particules matures ou du précurseur Pr55^{Gag} de la membrane plasmique : dans un système cellulaire sensible ou non à Vpu, Gag-CFP/GFP est précocement et majoritairement ciblé au niveau de la membrane plasmique [123, 288]. En absence de Vpu, les molécules de Gag se retrouvent rapidement dans des compartiments intracellulaires apparentés aux CMV. Dans un contexte où Vpu est présent ou n'a pas d'effets sur la relâche virale, l'accumulation de Gag dans ces compartiments intracellulaires est plus lente et moins drastique [123, 288]. Gag colocalise dans une certaine mesure avec un marqueur des endosomes précoces, suggérant que Gag n'est pas reciblé vers les CMV mais davantage internalisé de la membrane plasmique vers ces compartiments intracellulaires. En présence de Vpu, la proportion de cellules présentant une localisation intracellulaire de Gag passe de 60% à moins de 15% de la population totale transfectée, impliquant que l'augmentation de la relâche virale grâce à Vpu préviendrait l'accumulation de particules virales dans les CMV.

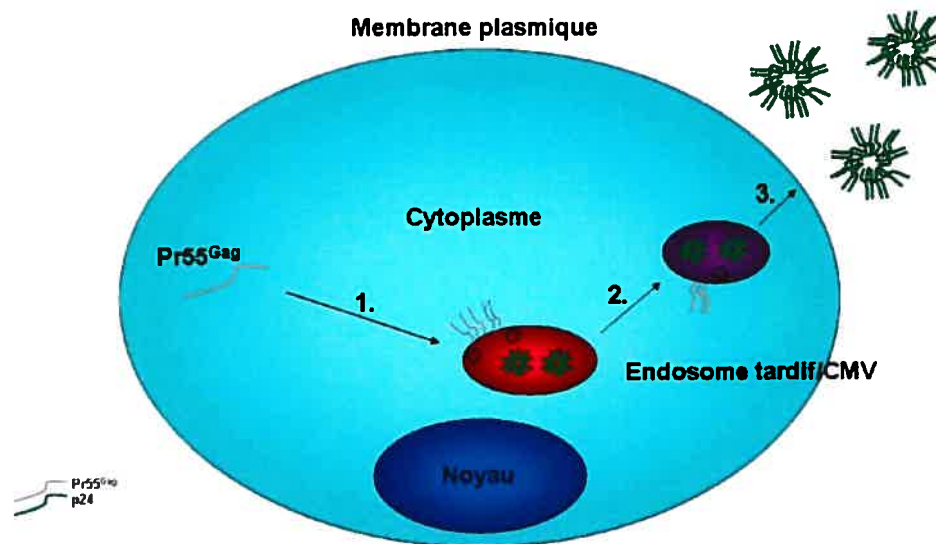


Figure 8. Les CMV, intermédiaire dans l'assemblage et la formation des particules virales. Dans ce modèle, le précurseur Pr55^{Gag} est initialiaement ciblé dans les CMV (1.), où il forme des particules matures (p24). Ce compartiment intracellulaire est recruté vers la membrane plasmique constitutivement ou suite à une stimulation (2.) et fusionne avec la membrane limitante pour libérer son contenu intraluminal dans le milieu extracellulaire (3.).

L'utilisation de mutants transdominants négatifs bloquant les voies endocytaires (DynK44A, Eps15 TD) montrent par ailleurs que la localisation dans les CMV est inhibée et que Gag s'accumule à la membrane plasmique, suggérant fortement que le Gag retrouvé dans les CMV serait le résultat d'un processus d'endocytose [123, 288]. La séparation efficace de la membrane plasmique des membranes internes a permis d'analyser de manière biochimique le trafic de Gag dans le contexte de Vpu [129]. Ainsi, le précurseur Pr55^{Gag} nouvellement synthétisé est initialement ciblé vers la membrane plasmique où il s'accumule (Figure 8). Par la suite, dans les cellules HeLa, si Vpu est absent, le précurseur est rapidement relocalisé dans les membranes internes où il s'accumule, tandis que l'expression de Vpu empêche Gag de se retrouver dans des compartiments intracellulaires. La localisation de Gag dans les CMV requiert un assemblage complet de la particule virale puisqu'un mutant PTAP ou l'absence de Tsg101 inhibe cette accumulation intracellulaire [123, 129, 229]. Finalement, l'altération de la motilité des CMV dans les cellules HEK293T et les macrophages par inhibition de la polymérisation des microtubules, constituants indispensables aux mouvements des structures intracellulaires vers la membrane plasmique, ou par redistribution du cholestérol, ne conduit pas à une diminution de la relâche virale [288]. Ces traitements n'affectent pas la distribution de Gag au niveau de la membrane plasmique, suggérant que le ciblage de Gag vers la membrane plasmique et la relâche de particules virales ne dépend pas de la motilité des CMV. De plus, la relocalisation de Gag dans les CMV par substitution du domaine MA avec des motifs connus de ciblage vers ces compartiments intracellulaires conduit Gag à s'accumuler dans les CMV sous forme de virions et à ne plus être relâché dans le milieu extracellulaire, impliquant qu'une protéine ciblée directement vers les CMV ne pourrait pas être relâchée, tout du moins dans les cellules HEK 293T et les macrophages en absence de stimulation [288]. De manière intéressante, l'accumulation intracellulaire de virions observée dans les macrophages serait le résultat d'un processus de phagocytose puisque l'inhibition de la polymérisation du cytosquelette d'actine connue pour son implication dans ce processus conduit à une abolition de la localisation de Gag dans les CMV [288]. Cependant, certaines études récentes ont montré par microscopie électronique que ces compartiments intracellulaires seraient des invaginations de la membrane plasmique au niveau des macrophages : les particules virales formées au niveau de la

membrane plasmique s'accumuleraient au niveau de ces structures de la membrane limitante [397, 398]. La membrane plasmique serait donc le site principal d'assemblage des particules virales. Gag serait majoritairement et précocement ciblé vers la membrane limitante de la cellule pour être directement relâché dans le milieu extracellulaire. En outre la localisation de Gag dans les CMV serait le résultat d'un processus d'endocytose/phagocytose [123, 288]. Dans le cas des macrophages, cette accumulation intracellulaire de particules virales serait le résultat d'invaginations de la membrane plasmique [397, 398]. Globalement, ces données sont corroborées par le fait que Tsg101 colocalise avec Gag au niveau de la membrane plasmique, suggérant que la machinerie ESCRT peut être directement recrutée au niveau de la membrane limitante de la cellule [270].

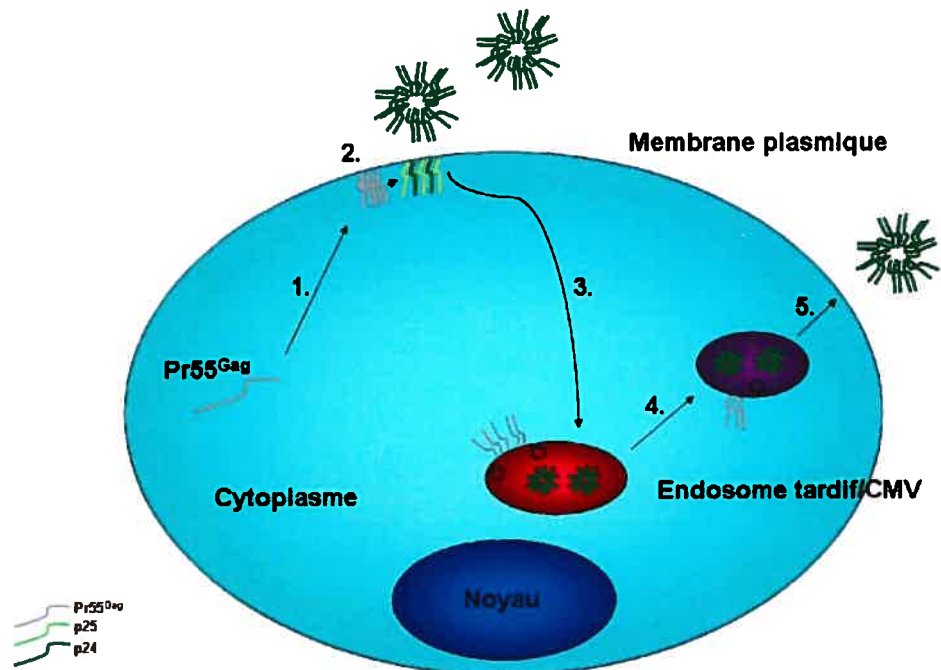


Figure 9. La membrane plasmique, site préférentiel d'assemblage et de libération des particules virales. Dans ce modèle, le précurseur Pr55^{Gag} est initialement ciblé à la membrane plasmique (1.), où il forme des particules matures qui sont relâchées dans le milieu intracellulaire (2.). Selon l'efficacité de libération des virions, une proportion significative de particules virales restées attachées à la membrane plasmique peut être internalisée vers les CMV (3.). Ces compartiments pourraient par la suite être recrutés à la membrane plasmique par stimulation (4.) pour relâcher leur contenu intraluminal (5.).

5. Les différents processus d'internalisation cellulaires

Les voies d'internalisation cellulaires sont connues pour jouer un rôle central dans l'infection de la cellule hôte et la pathogenèse de nombreux virus. Des études récentes suggèrent en outre que les processus d'internalisation cellulaires seraient directement impliqués dans le trafic de la protéine Gag dans les cellules infectées et le transport de particules virales vers les cellules cibles.

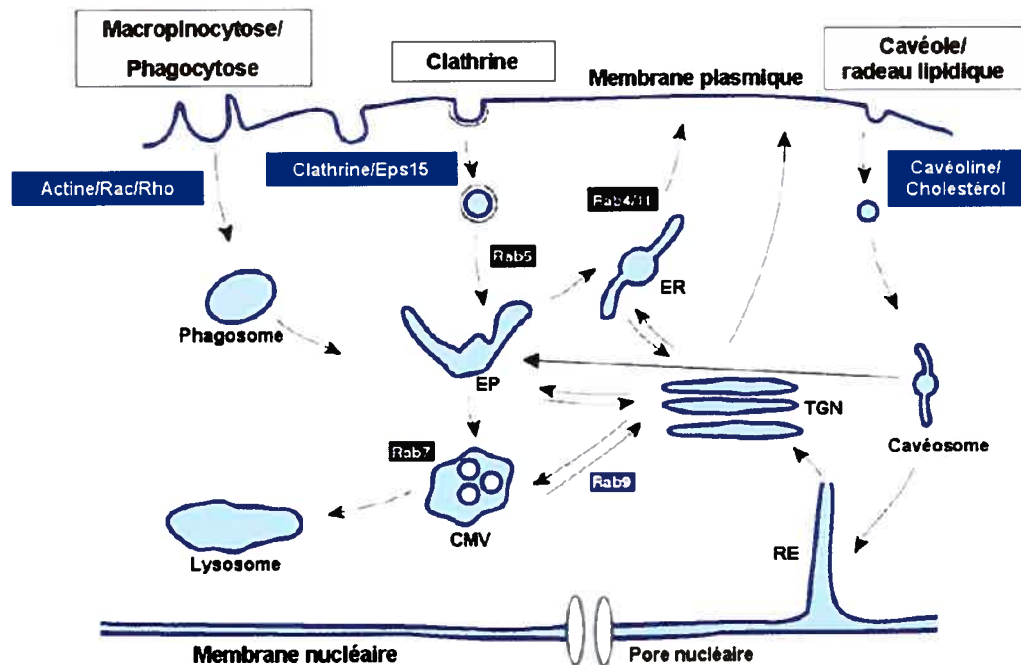


Figure 10. Les voies majeures d'endocytoses cellulaires. (Figure adaptée de [330])

5.a. Clathrine et voie d'endocytose clathrine-dépendante

La clathrine est cruciale dans un certain nombre de processus d'invagination de la membrane plasmique [330-332]. Constituée de trois chaînes lourdes associées l'une à l'autre par leur domaine C-terminal, la clathrine forme une structure reconnaissable appelée *triskèle*. Bien qu'aucune affinité entre la clathrine et certains constituants de la membrane plasmique n'ait pu être montrée, de nombreuses données suggèrent que son recrutement au site de formation de l'invagination se fait via l'utilisation de protéines notamment adaptatrices. L'une des plus connue est la

protéine AP-2 qui est aussi impliquée dans l'internalisation de Gag et Env : cet hétéromère constitué de quatre sous-unités serait initialement recruté à la membrane plasmique, créant un site d'initiation de la polymérisation de la clathrine et induisant la formation de puits entourés de clathrines (CCP ou *clathrin-coated pits*) [31, 296, 331-334]. La reconnaissance par AP-2 des protéines à internaliser se fait via un motif exposé dans le cytoplasme présent sous la forme NPxY chez les membres de la famille du récepteur des LDL (*low density lipoprotein*) ou sous la forme YxxΦ notamment au niveau d'Env ou de Gag. AP-2 pourrait par ailleurs interagir avec un motif dileucine et induire l'internalisation des protéines présentant cette séquence peptidique (pour une revue, [335]). L'un des récepteurs les mieux connus pour être internalisé par cette voie endocytaire est le récepteur de la transferrine : il contient en fait un motif hydrophobique YxxΦ et fait partie des récepteurs internalisés de manière constitutive même en absence de son ligand [336]. L'internalisation de la transferrine est l'une des méthodes utilisées pour vérifier si la voie d'endocytose clathrine-dépendante est fonctionnelle. Dans le cas des récepteurs couplés à la protéine G, les β-arrestines joueraient le rôle de protéines adaptatrices entre le domaine cytosolique des récepteurs et le complexe AP-2-clathrine (pour une revue, [337]). De manière très intéressante, le recrutement d'AP-2 à la surface interne de la membrane plasmique se ferait par interaction avec le phospholipide PI(4,5)P₂ [338], impliqué notamment dans le recrutement de Gag via son domaine MA [216, 217, 263] et n'aurait lieu que dans des domaines distincts de la membrane plasmique appelé *hot spot* [339]. Certaines drogues dont la chlorpromazine ont la capacité de relocaliser AP-2 et la clathrine dans des compartiments intracellulaires, conduisant à l'inhibition de la voie endocytaire clathrine-dépendante [340]. L'invagination de la membrane plasmique est un processus nécessitant de l'énergie : une GTPase est requise pour la fission membranaire et la formation de la vésicule. Celle-ci, appelée dynamine, est centrale dans la formation des CCP puisque l'expression d'une forme de la dynamine incapable de lier ou d'hydrolyser le GTP inhibe la formation de ces vésicules [341]. Le mutant transdominant négatif le plus connu est la dynamine K44A qui a perdu son activité GTPase : sa surexpression conduit à la formation à la membrane plasmique de puits de clathrines bloqués au stade de fission de la bicouche lipidique [342, 343]. La formation des CCP requiert par ailleurs de nombreuses autres protéines auxiliaires : l'une des plus importantes est Eps15 qui joue un rôle dans les étapes précoces de la formation des CCP. Cette protéine interagit de manière

constitutive avec l'epsine et AP-2 : l'interaction avec la protéine adaptatrice a lieu au niveau de son domaine C-terminal et la surexpression d'un mutant d'Eps15 tronqué au niveau de sa région N-terminale (Eps Δ 95/295) a la capacité d'inhiber les processus d'endocytose clathrine-dépendante [336]. D'autres protéines dont AP180 peuvent stimuler la formation des CCP : l'interaction entre Eps15 et AP180 favorise les activités d'assemblage des puits de clathrine par AP180. La voie d'endocytose clathrine-dépendante représente à elle seule de 30 à 50 % des phénomènes d'internalisation cellulaires.

5.b. Cavéoles et radeaux lipidiques

Les cavéoles ont été initialement isolés du fait de leur forme typique. Leur détection serait en fait type-cellulaire dépendant puisqu'elles se retrouvent en grande quantité à la surface de nombreuses cellules endothéliales mais sont difficiles à observer au niveau des lymphocytes T, du fait de la formation de complexes de haut poids moléculaire et de leur insolubilité vis-à-vis de certains détergents [344-346]. L'identification de la protéine cavéoline-1 a permis de mieux caractériser cette voie d'endocytose [347, 348]: la surexpression transitoire de cette protéine dans les lymphocytes T conduit à l'apparition des structures typiques observées à la surface des cellules endothéliales [349], prouvant que la cavéoline-1 joue un rôle central dans la formation des cavéoles. Par ailleurs, la cavéoline-1 a la capacité de se lier au cholestérol et certains acides gras [350, 351] et l'enrichissement en sphingolipides et en cholestérol des cavéoles leur confère les propriétés des radeaux lipidiques ou DRM. Les dernières études suggèrent qu'à l'état basal, les cavéoles sont des structures peu dynamiques et qu'elles n'induisent pas de phénomène d'endocytose de manière constitutive. Cependant, la présence de la dynamine et des protéines de fusion SNARE au niveau des cavéoles montrent qu'elles possèdent toute la machinerie nécessaire pour se séparer de la membrane plasmique et fusionner avec des compartiments intracellulaires (pour une revue, [352]). Il a notamment été montré que la protéine syntaxine 6, faisant partie de la famille des SNARE, est impliquée dans le transport de la cavéoline-1 vers la membrane plasmique [353]. De plus, la formation des cavéosomes nécessiterait non seulement le recrutement de la dynamine mais aussi un réarrangement du cytosquelette d'actine et l'activation d'une cascade de signalisation tyrosine kinase Il puisque l'utilisation de la genistein, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase, ou encore la cytochalasine D qui

dépolymérise l'actine, conduit à l'inhibition de la voie d'endocytose cavéoline-dépendante [354]. Certains virus dont SV40 (*Simian Virus 40*) ont la capacité d'induire l'internalisation des cavéoles et d'utiliser cette voie pour infecter la cellule cible [355, 356]. De plus, certaines toxines bactériennes dont la toxine du choléra (CTX) sont incorporées dans les cellules via la voie des cavéoles [357]. Or, de nombreuses drogues affectant la localisation du cholestérol ont la capacité d'inhiber cette voie d'endocytose : la filipin, qui séquestre le cholestérol de la membrane plasmique, ou encore la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD), qui induit une déplétion du cholestérol de la membrane cellulaire limitante, ont été montrées comme affectant principalement cette voie d'internalisation via la déstructuration des cavéoles [348, 357, 358]. En outre ces drogues sont connues pour affecter l'intégrité des radeaux lipidiques et dans le cas du VIH-1 de réduire voire abolir la relâche virale [212]. Bien qu'il ne soit pas encore très clair si les cavéoles et les radeaux lipidiques sont deux domaines d'internalisation distincts ou non, les travaux récents suggèrent que les cavéoles seraient en fait des sous-domaines des radeaux lipidiques et qu'ils partageraient de nombreuses propriétés biochimiques et fonctionnelles (pour une revue, [254]). De manière intéressante, le domaine TMgp41 d'Env a été montré comme interagissant avec la cavéoline-1, suggérant que cette interaction pourrait jouer un rôle dans les phénomènes d'endocytose du VIH-1 [344, 359]. L'agglomération des particules virales à la membrane plasmique des lymphocytes T conduit à un regroupement important de la cavéoline-1 au niveau de ces sites, suggérant que les particules relâchées ou en voie d'être relâchées se retrouvent au niveau de microdomaines de la membrane plasmique riches en cavéoline-1 [344]. Toutes ces données suggèrent que les cavéoles et plus généralement les radeaux lipidiques pourraient jouer un rôle dans la localisation intracellulaire de Gag.

5.c. Macropinocytose et Phagocytose

La macropinocytose, découverte initialement chez les macrophages, a longtemps été considérée comme une voie endocytaire mineure. Elle aurait cependant un rôle central dans l'initiation de la réponse immunitaire [360]. Elle permet en fait l'internalisation d'une grande quantité de soluté extracellulaire et ressemble au processus de phagocytose. Au contraire de la micropinocytose qui est constitutive et continue dans toutes les cellules, ce processus d'internalisation se limite à certains types cellulaires et nécessite un contexte spécifique pour être activé.

Seules les cellules dendritiques immatures présentent une macropinocytose constitutive [361]. La macropinocytose est un moyen pour les cellules présentatrices d'antigènes telles que les macrophages et les cellules dendritiques de surveiller le milieu extracellulaire et d'internaliser des antigènes présents dans l'environnement pour les présenter par la suite aux cellules du système immunitaire (pour une revue, [362]). L'activation de la macropinocytose requiert la présence de facteurs de croissance ou de facteurs mitogènes; elle semble par ailleurs contrôler par la production du phospholipide $PI(4,5)P_2$, via Arf6, facteur de régulation de la synthèse de ce phospholipide [363]. Peu de choses sont cependant connues sur les éléments cellulaires impliqués dans cette voie d'internalisation de fluide.

La macropinocytose ressemble dans son mécanisme à la phagocytose : ce processus très rapide nécessite une grande quantité d'énergie et le phagosome créé subit par la suite une maturation nécessitant l'association au cytosquelette d'actine et aux microtubules ([364]. Un signal d'initiation provenant en général de l'interaction d'un ligand avec un récepteur présent à la surface de la cellule induit ce processus d'internalisation. En général, la phagocytose est initiée via le recrutement des récepteurs au domaine Fc des immunoglobulines notamment des classes G et E ou via le récepteur liant la protéine C3 du complément (C3R) [365]. Finalement, au niveau des macrophages se trouve le récepteur SR-A (*scavenger receptor*) qui a la capacité de lier le lipopolysaccharide (LPS) présent en grande quantité à la surface de certaines bactéries. L'activation de la phagocytose induit la polymérisation d'un réseau d'actine au niveau du site de contact et la formation de pseudopodes qui entourent le substrat à phagocyter (pour une revue, [366]). Tout au long de ce processus, le cytosquelette d'actine subit des réarrangements drastiques permettant la fusion des protrusions et l'incorporation dans la cellule du phagosome. C'est pourquoi, l'inhibition de la polymérisation de l'actine via l'utilisation de la cytochalasine D, a la capacité de bloquer le processus de phagocytose [367]. L'activation de ce processus d'internalisation nécessite par ailleurs l'activation des voies de signalisation intracellulaires et en particulier la phospho-inositide-3-kinase (PI3K) : celle-ci serait importante pour l'allongement des pseudopodes et la fermeture des phagosomes [368, 369]. En outre une autre phosphokinase, la phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, qui est notamment régulé par Arf6, évoqué précédemment, serait impliquée dans la régulation de la phagocytose : son

produit PI(4,5)P₂ se retrouve en grande quantité au niveau du site d'initiation de la phagocytose et favoriserait ce processus [370]. La phagocytose a un rôle central dans la surveillance du milieu extracellulaire et la présentation d'antigènes aux cellules du système immunitaire, particulièrement les cellules T et B : la dégradation des substrats internalisés au niveau de compartiments acides appelés phagolysosomes va permettre la création de peptides qui seront par la suite présentés via les molécules du CMH-II. Certaines données suggèrent cependant que les peptides issus des phagosomes pourraient aussi être présentés via les molécules du CMH-I par un processus appelé *cross-presentation*. Contrairement aux voies d'endocytoses clathrine- ou cavéoline- dépendante, dont la fonction biologique est avant tout le recyclage de certains domaines de la membrane plasmique et de certains récepteurs ou la dégradation de certains facteurs, la phagocytose a pour but premier la fragmentation de certains substrats présent dans le milieu extracellulaire et la présentation peptidique afin de surveiller l'environnement et activer ou non le système immunitaire.

6. Problématique et objectifs du projet

La polyprotéine Pr55^{Gag} du VIH-1 joue un rôle central dans l'assemblage et dans la formation de la particule virale : son expression seul, sans autre constituants viraux, est nécessaire et suffisante à la constitution de particules semblables aux virions appelés VLP. La formation des virions implique une série d'évènements allant de l'association de Gag au site de bourgeonnement, l'incorporation du génome viral, la multimérisation des molécules de Gag et Gag-Pol ainsi que la libération de la particule immature dans le milieu extracellulaire, subissant par la suite une étape de maturation médiée par la protéase virale.

L'initiation de la formation de la particule virale nécessite le recrutement de Gag à une membrane. Cependant, le choix du site membranaire d'initiation de l'assemblage des virions est devenu un sujet de controverse suite à l'observation de différences type-cellulaires importantes dans la localisation intracellulaire de Gag. Initialement, le VIH-1 était considéré comme s'assemblant principalement à la membrane plasmique des lymphocytes T ainsi que de nombreuses cellules de lignées tumorales (HeLa, HEK293T, COS-1). Or, au niveau des macrophages, Gag s'accumule dans des compartiments intracellulaires qui présentent tous les marqueurs

des CMV tels que CD63, les molécules du CMH-II, Lamp1 et le phospholipide LBPA. Par ailleurs, Gag a été montré comme interagissant avec plusieurs protéines de la machinerie cellulaire ESCRT, impliquée dans la formation des vésicules intraluminales des CMV. Et il apparaît que, topologiquement, la formation de ces vésicules ressemble de manière surprenante aux étapes de bourgeonnement des virions, suggérant que le VIH-1 aurait usurpé ce mécanisme cellulaire pour former et libérer ses particules virales. Ainsi, Gag pourrait être ciblé directement dans les CMV où les particules virales s'assembleraient avant d'être libérées dans le milieu extracellulaire par fusion de ses compartiments intracellulaires avec la membrane plasmique, copiant le mécanisme de libération des exosomes. Ce modèle proposerait donc que les CMV joueraient le rôle d'intermédiaire dans l'assemblage et la formation de la particule virale. Ce modèle ne réconcilie cependant pas certaines observations faites dans un contexte où l'efficacité de relâche était affectée ou encore via l'utilisation d'une construction Gag-GFP qui montre une accumulation initiale de Gag au niveau de la membrane plasmique dans les cellules HEK293T ainsi que dans les macrophages.

Le choix du site d'ancrage initial du précurseur Pr55^{Gag} et son trafic subséquent dans la cellule sont ainsi mal connus. Le but de notre projet était donc **d'analyser le ciblage et le trafic de la protéine Gag** dans un modèle cellulaire présentant une localisation de la protéine virale à la fois à la membrane plasmique mais aussi dans les CMV (i.e. HEK 293T). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à suivre le mouvement de la protéine Gag nouvellement synthétisée dans les cellules HEK293T pour identifier le site initial de ciblage du précurseur Pr55^{Gag} et son trafic subséquent pour atteindre une distribution finale établie. Pour ce faire, notre premier objectif a été **d'adapter et de caractériser une méthode de fractionnement cellulaire** nous permettant de séparer efficacement la membrane plasmique des CMV [371]. Par la suite, nous avons étudié **le mouvement de la protéine Gag nouvellement synthétisée** en couplant notre séparation subcellulaire à des expériences de marquage métabolique et de chasse. Nos données montrant un ciblage initial de Gag vers la membrane plasmique et un phénomène d'internalisation de Gag de la membrane périphérique vers les CMV, nous avons voulu **identifier le mécanisme d'internalisation impliquée dans la localisation de Gag** dans ces compartiments intracellulaires par l'utilisation de drogues bloquant la voie clathrine-dépendante (e.g.

chlorpromazine) ou affectant le cholestérol situé à la membrane plasmique (filipin, M β CD). Enfin nous nous sommes intéressés à étudier **l'importance de l'efficacité de relâche et de la multimérisation de Gag dans la localisation** et l'accumulation de particules virales dans les CMV. Cette étude nous a donc permis de mieux comprendre le mouvement intracellulaire de la protéine Gag, de déterminer le site initial d'assemblage de la particule virale et d'identifier certains facteurs viraux et cellulaires influençant la distribution intracellulaire du VIH-1.

Deuxième partie : Article et résultats complémentaires

1. Article

Déclaration de l'étudiant :

Le manuscrit ayant pour titre *Productive HIV-1 assembly takes place at the plasma membrane* a été soumis au journal *Journal of Virology* et présente les principaux résultats obtenus lors de ma maîtrise. Ce manuscrit a été accepté pour publication dans ce même journal. J'ai participé de manière essentielle à la conception des expériences présentées dans cet article sous la supervision du Dr Éric A. Cohen et d'Andrés Finzi. AF et moi-même ont contribué également à la réalisation des expériences incluses dans cet article. Les données ont été analysées par EAC, AF et moi-même. Enfin, EAC, AF et moi-même ont participé à la rédaction de l'article. Globalement, ma contribution aux travaux inclus dans cet article ainsi que des étapes subséquentes a été essentielle et déterminante.

**PRODUCTIVE HIV-1 ASSEMBLY TAKES PLACE AT THE
PLASMA MEMBRANE**

**Andrés Finzi¹, Alexandre Orthwein¹, Johanne Mercier¹ and Éric A.
Cohen^{1,2,*}**

¹Laboratory of Human Retrovirology, Institut de Recherches Cliniques de Montréal,

²Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal,
Quebec, Canada.

*Corresponding author: Mailing address: Laboratory of Human Retrovirology,
Institut de Recherches Cliniques de Montréal (IRCM), 110, Avenue des Pins Ouest,
Montreal, Quebec, Canada H2W 1R7. Phone: (514) 987-5804; Fax: (514) 987-5691;

E-mail: [REDACTED]

Running Title: Analysis of HIV-1 Gag trafficking

Manuscript information: 42 pages, 6 Figures, 3 Supplemental Figures.

Word and character counts: abstract = 169 words; word count for the text = 6752.

Key words: HIV-1, Gag trafficking, plasma membrane, late endosomes/
multivesicular bodies, viral assembly, endocytosis

ABSTRACT

Gag proteins are necessary and sufficient to direct HIV-1 particle assembly and budding. Recent evidence suggests that Gag targeting to late endosomal/multivesicular bodies compartments (LE/MVB) occurs prior to viral particle budding at the plasma membrane (PM). However, the route that Gag follows before reaching its steady-state destinations still remains a subject of debate. Using a sub-cellular fractionation method that separates PM from LE/MVB combined to pulse-chase labeling, we analyzed Gag trafficking in HIV-1 producing HEK 293T cells. Our results reveal that the majority of newly synthesized Gag is primarily targeted to the PM. While PM-targeted Gag was efficiently released, a significant fraction of the remaining cell surface-associated Gag was subsequently internalized to LE/MVB where it accumulated, thus accounting for the majority of LE/MVB-associated Gag. Importantly, this process was found to be cholesterol-dependent since it was sensitive to the sterol-binding drugs filipin and methyl- β -cyclodextrin. These results point towards the PM as being the primary site of productive HIV-1 assembly in cells that also support Gag accumulation in intracellular compartments.

INTRODUCTION

Production of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) particles involves a series of coordinated events that includes targeting of viral structural proteins at a membrane assembly site, incorporation of the RNA genome, clustering of Gag/Gag-Pol molecules and subsequent release of immature virions, which undergo a protease-mediated maturation process to become fully infectious. While the envelope glycoproteins (Env) and the *pol*-encoded enzymes (the protease, PR; the reverse transcriptase, RT and the integrase, IN) are required for the production of infectious particles, expression of Gag polyprotein (Pr55^{Gag}) alone is necessary and sufficient for the assembly and release of non-infectious virus-like particles (VLP) (16). Pr55^{Gag} is constituted of four structural components that are cleaved by the viral protease concomitant to the budding process, to generate the mature virion-associated Gag products: matrix (MA or p17), capsid (CA or p24), nucleocapsid (NC or p7) and p6, as well as two spacer peptides SP1 and SP2 (for a review see (14, 16)). Three functional domains within Gag, capable of mediating the formation and release of VLP have been identified (for a review see (14, 16)): M, the membrane-binding domain, which consists of a N-terminal myristylic acid group and a highly basic domain in MA, allows the precursor to associate to a membrane assembly and budding site following its synthesis on cytosolic polysomes; I, the interaction domain, promotes Gag-Gag multimerization and consists of the region spanning the C-terminus domain of CA and the N-terminus domain of NC; L, the late domain, is responsible for the pinching-off of nascent particles from cellular membranes during the release step. The L domain through its highly conserved PTAP and YPLTSL late motifs located in p6 recruits Tsg101, AIP1 and other components of the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT), which are normally responsible for directing the formation of intraluminal vesicles within multivesicular bodies (MVB) (for a review see (31) and (3)).

It has long been considered that HIV-1 Gag precursors assemble and bud from the plasma membrane (PM) in T lymphocytes as well as in most transformed cell lines such as HEK 293T, HeLa and T cell lines (7, 31). However, recent reports have challenged this notion mainly because in these cells, a significant proportion of Gag was also found to localize to intracellular compartments that express late endosome (LE) or multivesicular bodies (MVB) markers (10, 19, 46, 54).

Furthermore, this internal localization of Gag was particularly pronounced in macrophages where very large numbers of viral particles are found to accumulate within LE/MVB compartments (34, 41, 45, 48). However, the molecular mechanisms that control cell surface versus LE/MVB accumulation of Pr55^{Gag} and consequently, the choice of the viral assembly and budding site are still poorly understood. One key specific aspect that remains to be clarified is the route that Pr55^{Gag} follows to reach its PM or LE/MVB steady-state location. Interestingly, two models are emerging from recent studies to explain this dual steady-state Gag localization in different cell types. One model proposes that Pr55^{Gag} is first inserted into endosomal membranes and then, depending on how the process of LE/MVB-mediated exocytosis is regulated in specific cell types, either retained (macrophages) or further transported to the PM (eg: T lymphocytes, HeLa, HEK 293T) (10, 19, 28, 37, 45, 46, 48, 49, 54). In this model, LE/MVB compartments represent early intermediates where assembly and budding can take place. In contrast, the other model postulates that newly synthesized Pr55^{Gag} is first targeted to the PM where viral assembly and release occur; non-released Gag products are subsequently internalized towards LE/MVB (20, 22, 32) (51) in a process that is sensitive to endocytosis inhibitors (22, 32).

To distinguish between these two models, we adapted a sub-cellular fractionation method that efficiently separates the PM from LE/MVB. This method coupled to pulse-chase labeling and immunoprecipitation analysis allowed a dynamic and quantitative monitoring of newly synthesized Gag trafficking in HIV-1 provirus-transfected HEK 293T cells. Our results reveal that the majority of newly synthesized Pr55^{Gag} is targeted to the PM. Importantly however, a significant fraction of PM-associated Gag products was found to be internalized over time to LE/MVB by means of endocytosis. This process was not affected by chlorpromazine, an inhibitor of clathrin-dependent endocytosis, but was efficiently blocked by filipin and methyl- β -cyclodextrin (M β CD), two endocytosis inhibitors known to affect PM-associated cholesterol. Taken together, our data identify the PM as being the primary site of productive HIV-1 assembly and release in cells that also support Gag accumulation into intracellular compartments.

MATERIALS AND METHODS

Cells and plasmids. HEK 293T cells were maintained as described (26). The HIV-1 molecular clone HxBc2 (25), HxBc2 Myr- (G2A mutation in MA) (43), the bicistronic pBud-DR construct (12) and the SVCMV CD4 expression plasmid (26) were previously described. The HxBc2 PR- Env - provirus was constructed by replacing the Sall/BamHI fragment of HxBc2 PR- (17) by the Sall/BamHI of HxBc2 Env- (5).

Antibodies. The following antibodies were used: L243 (IgG_{2a}), a mouse monoclonal antibody that binds a specific HLA-DR α conformational determinant dependent on the correct conformation of the alpha/beta heterodimer (44), mouse monoclonal anti-HLA-DR beta chain XD5 Ab (47), anti-CD4 (OKT4) (catalog no. CRL-8002) and anti-p24 (catalog no. HB-9725) monoclonal Abs were isolated from supernatants of cultured hybridoma cells obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA); rabbit anti-p24 polyclonal antibody (catalog no. 4250; NIH AIDS Reference and Reagent Program); mouse anti-Lamp1 (H5G11, IgG₁; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); mouse anti-CD63 (H5C6, IgG₁; Hybridoma Bank, NICHD, University of Iowa, IA, USA) and anti-Na⁺-K⁺ ATPase (M7-PB-E9; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada).

Transfections and metabolic labeling. Transfections were performed as described (61); experiments were done 48 h post-transfection. For pulse-chase experiments, transfectants were metabolically labeled with 1mCi/mL [³⁵S] methionine-cysteine ([³⁵S] Protein Labeling mix, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) in DMEM lacking methionine and cysteine and supplemented with 5% dialyzed FBS for 10 min and chased for different time intervals in DMEM containing excess of unlabelled methionine and cysteine. When indicated, chlorpromazine (10 μ g/ml), filipin (4 μ g/ml) or M β CD, (8 mM) were added during the starving period (30 min) and maintained throughout the chase. All drugs were purchased from Sigma-Aldrich.

Sub-cellular fractionation, immunoprecipitation, enzymatic assay and western blotting. Sub-cellular fractionation was performed as described (53). Briefly, 5 millions HEK 293T cells were harvested in 250 μ l of homogenization buffer (0.25 M sucrose, 78 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 8.4 mM CaCl₂, 10 mM EGTA, 50 mM HEPES-NaOH pH 7.0, containing a cocktail of protease inhibitors, Roche, Mississauga, ON,

Canada) and lysed during 60 sec using a pellet pestle with a cordless motor (Kontes, Vineland, NJ, USA). Homogenates were centrifuged at 1000 g for 5 min to pellet nuclei and any cell debris. Post-nuclear supernatant (PNS) was loaded onto a 5-20% linear Optiprep gradient according to manufacturer instructions (Application sheet S23, Axis-Shield, Norton, MA, USA) and spun at 150 000 g at 4°C for 20 h using a SW41 ultracentrifuge rotor (Beckman, Mississauga, ON, Canada). Fourteen fractions (800 µl) were collected from the top of the gradient and lysed with 200 µl of 5X RIPA.DOC (700 mM NaCl, 40 mM Na₂HPO₄, 10 mM NaH₂PO₄, 5% NP40, 2.5% sodium deoxycholate, 0.25% sodium dodecyl sulfate (SDS)) containing a cocktail of protease inhibitors. Immunoprecipitations were performed on each fraction as follows: fractions were pre-cleared with the corresponding normal serum for 2 h at 4°C before being immunoprecipitated for 3 h at 4°C with a monoclonal anti-p24 Ab or a polyclonal anti-p24 serum as described previously (61). For denaturing conditions, each fraction was denatured as described (40) before immunoprecipitation with a polyclonal anti-p24 serum. Analysis of released viral particles was performed on tissue culture supernatant that were cleared by low-speed centrifugation (10 min; 400 g) and passed through a 0.45-µm-pore-size filter (Costar, Cambridge, MA, USA). Viral particles were pelleted from the filtrate by ultracentrifugation through a 20% (wt/v) sucrose cushion in PBS (120 min at 130 000 g, 4°C), lysed in 1X RIPA.DOC buffer containing a cocktail of protease inhibitors and immunoprecipitated as described above. Immunocomplexes were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed by autoradiography. Quantitation of radioactive Gag-related bands in each fraction was performed using a PhosphoImager equipped with the ImageQuant software 5.0.

Enzymatic assays performed to identify Alkaline Phosphatase -containing fractions were performed as follows: 25 µl of each fraction was mixed with 15 µl of 4 mM 4-methylumbelliferyl phosphate (Sigma-Aldrich) dissolved in a citrate buffer (50 mM citric acid, 70 mM Na₂HPO₄ pH4.5). After 2 h of incubation at 37°C, the reaction was stopped by using 50 µl of Glycine Buffer (Glycine 100 mM pH10.4, 10 mM EDTA, 2% Triton X-100). Samples were excited at 355 nm and read at 460 nm on a multiplate reader (Wallac Victor, Wallac Oy, Turku, Finland). Finally, the presence of Na⁺-K⁺ ATPase, CD63 and Lamp1 in each fraction was determined by western blot as previously described (26). For HLA-DR detection, each fraction was

immunoprecipitated with the L243 conformational Ab before being detected by western blotting using the anti-HLA-DR β chain XD5 Ab.

Cell surface biotinylation, biotinylated-transferrin and cell surface CD4. Forty-eight hours post-transfection cells were washed three times with ice-cold PBS and then labeled in PBS containing 480 $\mu\text{g/ml}$ of sulfo-NHS-SS-Biotin (Pierce, Rockford, IL, USA) for 30 minutes at 0°C . Cells were then washed with cold PBS-Tris 50 mM to quench the remaining biotinylation reagent. For biotinylated-transferrin, cells were incubated 15 min at 0°C with human biotin-transferrin (25 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma-Aldrich). Cells were then washed twice with cold PBS. For both experiments, cells were then mechanically lysed as described above and the PNS was subjected to sub-cellular fractionation. Of note, due to the high density of fractions 10-14, we could not perform dot-blot analysis for cell surface biotinylation. Therefore, biotinylated cell surface proteins were loaded on SDS-PAGE (12.5%) and allowed to enter the gel by short migration. Fractions were subsequently analyzed by western blot using a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Amersham, Baie d'Urfe, QC, Canada). For the analysis of cell surface biotinylation in drug-treated cells, drugs were added for 30 min at 37°C in DMEM before subjecting cells to the procedure described above (drugs were present throughout the experiment). For cell surface CD4 analysis, HEK 293T cells were cotransfected with the HxBc2 proviral construct and SVCMV CD4, a plasmid encoding CD4. Forty-eight hours later cells were washed with ice-cold PBS and then labeled with anti-CD4 (OKT4) Ab resuspended in PBS for 30 min at 0°C to mark cell surface CD4. Cells were washed twice with cold PBS prior to mechanical lysis and fractionation as previously described. Cell surface-bound OKT4 was revealed by western blot using a goat anti-mouse Ab coupled to the peroxidase (Amersham), as described (26).

Electron microscopy. After sub-cellular fractionation, fractions 2-3, 6-7 and 13-14 were fixed 1 h at 4°C with 2.5% glutaraldehyde, 0.1 M cacodylate pH 7.3. Fixed fractions were subsequently precipitated for 15 min at 40 000 g in a F-20/micro rotor (Sorvall, Burlington, ON, Canada). Fractions pellets were washed 3 times with 0.1 M cacodylate pH 7.3 before incubation in 1% OsO₄ in cacodylate buffer for 45 min at 21°C . Pellets were dehydrated in alcohol series before embedding and polymerization in Durcupan resin (Sigma-Aldrich). Thin sectioning was done with an ultramicrotome system (Reichert-jung ultracut E, Rochester, NY, USA) and the

sections were placed on nickel 200mESH grids (Canemco, Lakefield, QC, Canada). Cells were stained with 1% uranyl acetate in 70% ethanol and lead citrate. For immunogold staining, samples were processed as described (30). Polyclonal anti-p24 Ab staining was followed by incubation with a goat anti-rabbit serum coupled to 12 or 18 nm gold beads (Jackson laboratories, Bar Harbor, ME, USA). The grids were examined on a JEOL JEM-1200 EX transmission electron microscope (New Jersey, NY, USA).

Assay for membrane binding. Flotation assay was performed as described (43). Briefly, PNS was prepared as described above and fractionated in a discontinuous sucrose flotation assay layered with 83, 65 and 10% sucrose. Fourteen fractions (800 μ l) were collected from the top of the gradient and lysed with 200 μ l of 5X RIPA.DOC containing a cocktail of protease inhibitors. Fractions were subsequently immunoprecipitated with a monoclonal anti-p24 Ab. Signal obtained in fractions 4-7, corresponding to the interface (membranes) and 11-14 (cytosol) were evaluated by quantifying Gag-related bands in each fraction using a PhosphoImager equipped with the ImageQuant software 5.0.

Cholera-toxin and Transferrin Uptake. Cells were treated for 30 min with chlorpromazine (10 μ g/ml), filipin (4 μ g/ml) or M β CD (8mM) at 37°C (drugs were maintained throughout the experiment), subsequently washed with PBS and incubated for 30 min at 0°C with either Tfr or ChTx β Alexa-488 conjugates (Molecular Probes, Burlington, ON, Canada) in PBS. Cells were then washed with cold PBS and then incubated at 37°C for 10 min to allow Tfr or ChTx β internalization. Cytospin, paraformaldehyde fixation, nuclei staining and mounting were performed as previously described (12). Cells were examined by conventional epifluorescence micrographs on a Zeiss Cell Observer system (Zeiss, Toronto, ON, Canada) equipped with an Axiovert 200 M microscope and a Zeiss AxioCam ultra high resolution monochrome digital camera, using the 100X oil lens. Images were digitally deconvoluted with the AxioVision 4.4 software using the Nearest Neighbor deconvolution method.

RESULTS

Characterization of a sub-cellular fractionation method that separates PM from LE/MVB

It is now well established that HIV-1 Gag localizes at steady-state both at the PM and in LE/MVB in several established human cell lines, including HEK 293T cells, which have been used as model systems to study Gag trafficking as well as HIV-1 particle assembly and release (10, 12, 19, 36, 54). To gain insights into this dual Gag localization (PM vs LE/MVB), we have adapted a previously described method that was based on a 5 to 20 % continuous iodixanol (Optiprep) gradient (53). Of note, all the characterization described below was performed on HxBc2 provirus-transfected HEK 293T cells that were lysed mechanically in an osmotic buffer 48 h post-transfection. Post-nuclear supernatant (PNS) was fractionated by iodixanol gradient after high speed and prolonged centrifugation periods (see Materials and Methods). Fourteen fractions were collected from the top of the gradient and analyzed for the presence of different endogenous and exogenous cellular markers. In an effort to localize where PM migrated into the gradient, we biotinylated exposed cell surface-associated proteins; the majority of the biotin-labeled proteins were found in light density fractions, identifying them as PM-associated (mostly fractions 3-6). Similarly, biotin-conjugated transferrin was also incubated with HEK 293T cells at 0°C to label the PM and gave similar results; biotin-conjugated transferrin (Tfr) was exclusively found in light density fractions (mostly fractions 3-6) (Fig. 1 A). Furthermore, when cells were co-transfected with a CD4 expression plasmid and incubated at 0°C to block endocytosis of the receptor bound to an anti-CD4 antibody, cell surface CD4 was also exclusively found in light density fractions (fractions 3-6) (Fig. 1 A). Similarly, Na⁺-K⁺ ATPase, a known PM marker (29), was also primarily found in light density fractions (fractions 2-6, data not shown). Finally, an enzymatic assay was performed on each fraction to detect the presence of alkaline phosphatase, an enzyme previously shown to be PM-associated (13). As expected, alkaline phosphatase activity was mainly found in light density fractions (Fig. 1 A; 80% of the total enzymatic signal was associated with light density fractions 1-6). We next examined LE/MVB migration into the optiprep gradient by western blotting using antibodies directed against late endosomal markers. CD63 was found in high density fractions (fractions 13-14) but

also in PM-enriched fractions (fractions 3-7, Fig. 1 B). Interestingly, as recently described by Janvier and Bonifacino (21), significant fractions of CD63 localize at the PM and traffic through the cell surface before reaching late endosomes, thus explaining its presence in light density fractions. We then evaluated the migration of HLA-DR, another marker that was previously shown to accumulate into LE/MVB via the PM (11). When cells were co-transfected with an HLA-DR expressor, it fractionated in high density fractions (fractions 13-14) but also in light density fractions (fractions 2-6) (Fig. 1 B) most likely reflecting its previously described cell surface localization (11). Finally, the endosomal/lysosomal marker Lamp1 was predominantly found in high density fractions (fractions 13-14) and to a lesser extent between fractions 4 and 6 (Fig. 1 B), likely representing its previously reported PM localization (21). Altogether, these data suggested that the majority of LE/MVB migrated to high density fractions whereas light density fractions were enriched in PM. To further obtain direct evidence that these fractions were indeed PM or LE/MVB-enriched, we performed transmission electron microscopy (EM) analysis of light and high density fractions. Briefly, provirus transfected HEK 293T cells were mechanically lysed 48 h post-transfection and the PNS was fractionated as described above. Fractions 2-3, 6-7 and 13-14 were ultracentrifuged and the resulting pellets were processed for conventional EM. As expected, light density fractions were highly enriched in filamentous structures reminiscent of the PM (Fig. 1 C a). Interestingly, these filaments presented small (50-100 nm) invaginations that were similar in shape and diameter to previously described caveolae (1, 58). Interestingly, when fractions 6-7 were analyzed by EM we observed again a clear enrichment of filamentous structures reminiscent of the PM (Fig. 1 C b); however, in contrast to fractions 2-3, these structures were devoid of caveolae-like structures, thus suggesting that two distinct PM subpopulations appear to be separated by the fractionation procedure. Importantly, the fact that no LE/MVB structures were observed in these fractions after extensive analysis suggested that detection of markers such as CD63, Lamp1 and HLA-DR in these fractions (Fig. 1 B) most probably reflected the reported association of these proteins with the PM during their trafficking. Finally, when we performed EM analysis on high density fractions (fractions 13-14) we observed a clear enrichment of multivesicular (Fig. 1 C c) and multilamellar (Fig. 1 C d) structures. Taken together, these biochemical and electron microscopy data provide strong evidence indicating that this modified sub-cellular

fractionation method efficiently separates PM from LE/MVB: light density fractions were found to be enriched in PM whereas high density fractions were devoid of PM markers but enriched in multivesicular and multilamellar structures.

Steady-state HIV-1 Gag distribution following sub-cellular fractionation

Since we were able to separate PM from LE/MVB, we next addressed how HIV-1 Gag fractionated into the gradient. HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus and fractionated 48 h later as described above. Interestingly, at steady-state, two Gag populations were observed (Fig. 2 A); Pr55^{Gag} and its cleavage products p41, p25 and p24 were primarily detected in PM-enriched fractions at the top of the gradient (mainly fractions 2-6) and to a lesser extent in fractions enriched in LE/MVB markers at the bottom of the gradient (fractions 13-14) (Fig. 2 A). Interestingly, we observed that different processed forms of Gag were present in fractions associated with different sub-cellular compartments (PM vs. LE/MVB). Indeed, CA-p2 (p25) was primarily detected in PM-enriched fractions whereas a marked accumulation of the fully processed CA (p24) form of Gag was principally found in fractions associated to LE/MVB markers at the bottom of the gradient (Fig. 2 A and B, bottom panels). To ensure that high density fractions-associated Gag signal was membrane-associated and indeed did not result from sedimentation of cytosolic Gag complexes, we subjected PNS from provirus-transfected HEK 293T cells to membrane permeabilization with a non-ionic detergent (NP-40), known to permeabilize membrane vesicles and to solubilize membrane-associated proteins. Similar treatments were recently used to demonstrate the association of HIV-1 Gag to different cellular membranes (19, 59). As expected, after this treatment Gag signal was absent from high density fractions and was entirely detected in light density fractions, which in addition to PM markers were associated with the cytosolic marker actin (fractions 2-6; data not shown), thus indicating that Gag located at the bottom of the gradient was detergent-sensitive and as such likely to be membrane-associated (Fig. S1 A in the supplemental material). These findings were also supported by results obtained in experiments that used a provirus encoding a myristic acid (Myr)-defective Gag mutant (G2A mutation in MA) that is strongly impaired in membrane-association (Fig. S2 B in the supplemental material). As

expected, no Myr-defective Gag was detected in high density fractions (Fig. S1 B in the supplemental material). Taken together, these results demonstrate that Gag products associated with high density fractions are membrane associated. To obtain additional evidence that LE/MVB-containing virus migrate at the bottom of the gradient, we analyzed the distribution of Gag products and RT activity at steady-state in presence or absence of human leukocyte antigen DR (HLA-DR) (Fig. 2) since we recently reported that HLA-DR expression in human cell lines such as HEK 293T or HeLa cells induced accumulation of Gag and HIV-1 particles into LE/MVB (12). As expected, the data of figure 2 A and B clearly revealed an enhancement of mature Gag products accumulation in high density fractions in HLA-DR+ as compared to -DR- samples upon shorter exposure of western blots (2.5 fold increase) (bottom panels). In addition, HLA-DR expression also resulted in increased reverse transcriptase (RT) activity accumulation in high density fractions where approximately two-fold more RT activity was observed in presence of HLA-DR (Fig. 2 C). These results provide strong evidence that virus-containing LE/MVB were indeed enriched in high density fractions (fractions 13-14).

Finally, to ensure that PM or LE/MVB-associated Gag signals were not the result of co-fractionation between Gag products and the different enriched structures, we performed immunogold staining of CA on pelleted material from fractions 2-3, 6-7 and 13-14 using a polyclonal anti-p24 antibody and analyzed CA staining on sub-cellular structures by EM. Interestingly, the filamentous structures depicted in Fig. 1 C stained positive for CA (Fig. 3 A). In fact, CA staining was observed on discrete patches of the PM, probably reflecting assembling structures (Fig. 3 A, see arrows). Similar CA staining was previously observed in pellets of purified detergent resistant membranes (DRM) isolated from Gag-expressing BSC-40 cells (9). Furthermore, analogous CA-enriched patches were also observed in fractions 6-7 (Fig. 3 B). Finally, when high density fractions (fractions 13-14) were processed for conventional EM analysis, we observed LE/MVB compartments containing structures reminiscent of fully mature viruses (Fig. 3 C, see arrows), in agreement with the strong accumulation of fully mature Gag (p24) detected in fractions 13-14 by western blotting (Fig. 2 A). Importantly, immunogold analysis of the same fractions using a polyclonal anti-p24 Ab confirmed that these structures were associated with viral particles (Fig. 3 D). Of note, fractions 2-3, 6-7 and 13-14

isolated from mock-transfected cells remained completely unlabeled by this technique, thus indicating that CA labeling in fractions obtained from provirus-transfected cells was specific (data not shown).

Sub-cellular trafficking of HIV-1 Gag

To analyze the movement of newly synthesized Pr55^{Gag} and its cleavage products between the PM and LE/MVB, we combined our sub-cellular fractionation method to pulse-chase labeling and immunoprecipitation analysis. Briefly, HEK 293T cells were transfected with the HIV-1 HxBc2 provirus; 48 h later, cells were metabolically labeled with [³⁵S] methionine-cysteine for 10 min and chased for various time intervals prior to cell lysis and sub-cellular fractionation by optiprep gradient centrifugation. Gag-related products in optiprep fractions were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 antibody. Fig. 4 A clearly shows that after 10 min of labeling (time 0 h), Gag and its cleavage products were primarily detected in fractions associated with PM markers and to a lower extent with fractions enriched with LE/MVB markers (fractions 1-6 and 13-14, respectively), suggesting that some Gag was concomitantly targeted to the PM and LE/MVB. Even though more Gag cleavage products were detected in PM-associated fractions at time 0 h (Fig. 4 A), the kinetic of Pr55^{Gag} processing, calculated as the decrease of Pr55^{Gag} signal over time, was identical between PM- and LE/MVB-enriched fractions (data not shown), suggesting that the sub-cellular compartment where Gag accumulates does not appear to influence its processing. Throughout the 5 h of chase a progressive decrease of PM-associated Gag and Gag cleavage products was observed, and correlated with the progressive increase of progeny virus released extracellularly, as shown by the levels of mature p24 detected in the supernatant (Fig. 4 B). In contrast, Gag cleavage products accumulated into high density fractions over the 5 h of chase (Fig. 4 A), thus suggesting that virus-containing LE/MVB were not efficiently transported towards the PM, at least in our experimental conditions in HEK 293T cells. Importantly, by 2 h of chase we started detecting an important accumulation of mature Gag (p24) products into high density fractions (Fig. 4 A) that was unlikely to result from Pr55^{Gag} processing in these fractions (compare Pr55^{Gag} and p41^{Gag} processing over time in fractions 13 and 14).

Rather, it appeared to reflect internalization of mature and/or assembling viral particles from the PM towards LE/MVB. In fact, after 2 h of chase, the sub-cellular location of Gag and its cleavage products was very similar to that observed at steady-state (compare Fig. 2 A and Fig. 4 A at time 2 h) with more CA-p2 (p25) in PM-enriched fractions compared to a clear accumulation of CA (p24) in LE/MVB-enriched fractions. Importantly, similar results were obtained with polyclonal anti-p24 antibodies as well as in conditions where proteins were denatured by boiling before immunoprecipitation as described (40), thus indicating that the detection method was not biased towards some Gag species or Gag assembling structures because of lack of access to antigenic epitopes (data not shown). Finally, to confirm that the majority of Gag products detected in each fraction were indeed membrane-associated we performed membrane flotation analysis. We found that after 10 min of pulse-labeling more than 60% of Gag products were indeed membrane-associated compared to less than 20% when the Myr-defective Gag counterpart was analyzed (Fig. S2 A and B in the supplemental material). By 2 h of chase, close to 80% of Gag was detected in association with the membrane fraction (Fig. S2 C in the supplemental material). Overall, these results suggest that newly synthesized Gag is primarily targeted to the PM where assembly and release occur; a significant fraction of the remaining PM-associated Gag products appears to be subsequently internalized towards LE/MVB where it accumulates, thus accounting for the majority of LE/MVB-associated Gag products detected at steady-state.

Effect of endocytosis inhibitors on HIV-1 Gag trafficking

To confirm that the accumulation of mature Gag products into high density fractions detected at 2 h reflected an endocytosis process from the PM towards LE/MVB, we thought to block two main routes of endocytosis. First, we used chlorpromazine, a drug known to prevent clathrin-coated pit formation at the PM (60). Even though chlorpromazine efficiently blocked clathrin-dependent endocytosis but not caveolae-dependent internalization, as measured by transferrin (Tfr) and cholera toxin β subunit (ChTx β) uptake (Fig. 5 A and B, respectively), the accumulation of mature Gag products in high density fractions at 2 h chase was not affected (Fig. 5 C). Indeed, quantification of the relative amounts of Pr55^{Gag} at time

0 h or quantification of mature Gag products (p25/p24) detected in PM- and LE/MVB-associated fractions at time 2 h remained identical to those obtained in untreated cells (Fig. 5 D and E), thus suggesting that Gag internalization from PM might be clathrin-independent in HEK 293T cells.

Since clathrin lattices seemed not to be required for Gag internalization, we blocked another major route of endocytosis by using sterol-binding drugs such as filipin and M β CD. These drugs interfere with caveolae or raft-dependent endocytosis by sequestering (filipin) or depleting (M β CD) cholesterol, an essential component of caveolae and lipid rafts (33, 42, 50). Filipin and M β CD efficiently blocked the uptake of ChTx β , which was previously shown to be internalized by a cholesterol-dependent process (23) (Fig. 6 B). Surprisingly, in addition to blocking ChTx β internalization, filipin efficiently blocked Tfr uptake in our experimental conditions (Fig. 6 A). Although it is very commonly reported that cholesterol is required only for cholesterol-dependent uptake mechanisms such as caveolae and lipid raft-mediated endocytosis, there is evidence for cholesterol requirement also in clathrin-mediated endocytosis (56). Interestingly, under these conditions where clathrin and caveolae/raft-dependent endocytosis were affected, we detected a significant decrease of Gag products internalization to LE/MVB-enriched fractions (Fig. 6 C). Indeed, p25/p24 Gag products accumulation in these fractions was reduced from 40% to 14%, as calculated by quantifying the relative amounts of mature Gag products detected in PM- and LE/MVB-associated fractions after 2 h of chase in control- and filipin-treated cells (Fig. 6 F). Furthermore, M β CD treatment also significantly decreased mature Gag products accumulation in LE/MVB-enriched fractions at 2 h of chase (Fig. 6 D); the decrease was similar to that obtained after filipin treatment, passing from 40% to 19% (Fig. 6 F). Importantly however, in contrast to filipin, M β CD did not affect Tfr uptake (Fig. 6 A), thus suggesting that clathrin-dependent endocytosis appeared not involved in Gag-related products internalization from PM to LE/MVB. Moreover, filipin and M β CD treatment reduced significantly the Pr55^{Gag} signal detected in high density fractions at time 0 h (Fig. 6 C and D, upper panels). Indeed, total Pr55^{Gag} signal decreased from 44% to 15% in LE/MVB-associated fractions (Fig. 6 E), thus arguing also for a rapid internalization of Pr55^{Gag} from the PM to LE/MVB. Nonetheless, the residual Pr55^{Gag} detected in high density fractions of filipin- or M β CD- treated cells as well as

the fact that targeting of Pr55^{Gag} was detected in LE/MVB-associated fractions in conditions where the labeling period was decreased to only 5 min (data not shown) suggest a possible but minor direct targeting of Gag precursor to LE/MVB.

Finally, to ensure that the phenotypes obtained with chlorpromazine or with the sterol-binding drugs were not due to any non-specific effect on Gag association to membranes as recently proposed (39), we performed membrane flotation analysis of drug-treated cells. As presented in Fig. S3 in the supplemental material we did not affect in any ways Gag ability to associate with membranes after 2 h of chase, when the internalization process was at its peak. These results suggested that the potent reduction of Gag internalization induced by sterol-binding drugs might result from their inhibition of cholesterol-dependent uptake mechanisms. Taken together, these results suggest that the majority of newly synthesized Gag is primarily targeted to the PM; some newly synthesized Gag might be directly targeted to LE/MVB but represent a minor fraction of total Gag. Furthermore, the majority of mature Gag products present in LE/MVB after 2 h of chase results from an internalization process that is cholesterol-dependent.

DISCUSSION

The precise sub-cellular membrane site where HIV-1 assembly is initiated has recently been the subject of intense debates. While some studies indicate that internal endosomal compartments, notably LE/MVB, represent early intermediates where Gag is first targeted prior to budding at the PM (10, 19, 28, 37, 45, 46, 48, 49, 54), more recent studies support a model where Gag-mediated assembly mainly occurs at the PM with accumulation of Gag and viral particles in LE/MVB resulting from an internalization process from the cell surface (20, 22, 32, 51). One aspect that has complicated interpretation of the data is that initially, most studies evaluated Gag localization at steady-state by electron or fluorescence microscopy (10, 28, 36, 37, 45, 48, 54) the observation that Gag or viral particles accumulated into LE/MVB did not absolutely mean that the precursor was first targeted or assembled at this location nor did it provide any information about the route that Gag follows before reaching its steady-state sub-cellular destination. Furthermore, several studies analyzed Gag localization or trafficking using codon-optimized Rev-independent Gag constructs (10, 28, 36, 46, 51, 54) and/or Gag constructs encoding Gag proteins that were C-terminally fused to different tags (EGFP, ECFP, tetracysteine) (10, 22, 28, 32, 36, 46, 51, 54). However, several lines of evidence suggest that the trafficking and sub-cellular localization of C-terminally-tagged Gag molecules (20, 51) or Gag expressed from mRNA that do not engage the physiological Rev-dependent viral RNA nuclear export pathway (2, 57) may differ from those of native Gag expressed from a provirus. In order to analyze the trafficking of native Gag molecules in HIV-1-producing cells, we adapted a sub-cellular fractionation procedure that efficiently separates PM from LE/MVB and analyzed quantitatively the movement of Gag over time using pulse-chase labeling analysis. Importantly, these studies were performed in HEK 293T cells, an immortalized cell line that displays Gag steady-state localization at the PM and LE/MVB and that was indeed used in some studies from which aroused the concept that HIV-1 assembly may be initiated in late endosomes (10, 18, 54).

One critical component of our analysis was efficient separation of PM from LE/MVB. Several lines of evidence suggest that the sub-cellular fractionation method that we have adapted does indeed do that. First, biochemical analysis of PM- and LE/MVB-associated markers revealed that they segregated in different fractions

(Fig. 1 A and B). Second, electron microscopic analysis of gradient fractions revealed an enrichment of structures that are reminiscent of PM or LE/MVB in distinct fractions (Fig 1 C); importantly these sub-cellular structures were found to be associated with HIV-1 Gag products since they were specifically immunostained with anti-p24 antibodies (Fig. 3). Third, expression of HLA-DR, which is reported to induce a two-to-three-fold Gag relocation from PM to LE/MVB as evaluated by fluorescence microscopy (12), led to a similar increase of mature Gag-products and RT activity in LE/MVB-enriched fractions (Fig. 2). Furthermore, our separation method was also able to detect Vpu-mediated modulation of Gag accumulation into LE/MVB-associated fractions in HEK 293T cells cultured in confluent growth conditions (8) (data not shown), in agreement with previous studies that reported increased Gag accumulation into intracellular compartments in the absence of Vpu (20, 32). Altogether, these results indicated that this sub-cellular fractionation method was sensitive enough to detect changes in the steady-state cellular location of Gag at the level of a whole population of HIV-1 producing cells.

By combining this sub-cellular fractionation procedure to short pulse-chase labeling analysis, we provide here strong evidence indicating that the majority of newly synthesized Gag is primarily targeted to the PM where most of productive viral particle assembly occurred. Only a minor fraction of newly synthesized Pr55^{Gag} was apparently directly targeted to LE/MVB (Fig. 4 and 6). In agreement with recent reports (20, 22, 32), we found that over time a significant proportion of cell surface-associated Gag products were subsequently internalized from the PM to late endosomal compartments, thus accounting for the majority of LE/MVB-associated Gag and viral particles that were previously observed at steady-state using fluorescence microscopy and electron microscopy analysis. The internalization of Gag products from the PM towards LE/MVB appeared to occur very quickly after the 10 minutes of metabolic labeling and peaked after two-hours of chase (Fig. 4 and 6), thus underlining the need to use very short labeling approach to follow dynamically newly synthesized Gag trafficking.

Our data indicates that endocytosis of PM-associated Gag products in HEK 293T cells is sensitive to sterol-binding drugs. Sequestration or depletion of cell surface cholesterol by treatment with filipin or M β CD, respectively, was found to drastically reduce endocytosis of Gag products (Fig. 6). These sterol-binding drugs

have been previously used to inhibit endocytosis via caveolae selectively (55), thus raising the possibility that PM-associated Gag products are internalized to LE/MVB, at least in HEK 293 T cells, by a cholesterol-dependent uptake mechanism that involves caveolae or more generally lipid rafts. Cholesterol is a critical component of lipid rafts involved in caveolae formation (6). When cholesterol is sequestered or extracted from the PM, lipid rafts are disrupted. A large number of studies have implicated cholesterol and sphingolipids-enriched membrane rafts in HIV-1 particle formation, production and infectivity (27, 29, 35, 38). Furthermore, cholesterol depletion was recently reported to decrease the mobility of Gag in living cells, a process that is likely to play a major role in promoting intra-molecular interactions necessary for viral assembly and release (15). Given the important role of cholesterol-enriched membrane microdomains in viral particle assembly and release, we cannot entirely rule-out that the effect of sterol-binding drugs on Gag internalization may be indirect rather than direct, especially if the endosomal accumulation of Gag results from internalization of fully assembled virions tethered at the cell surface, as recently suggested by Neil and coworkers (32). Even though under our working conditions, filipin and M β CD did not affect Gag ability to associate with membranes (Fig. S3 in the supplemental material), we cannot rule-out the possibility that other steps leading to efficient viral particle production were not affected. In contrast to sterol-binding drugs, chlorpromazine, a drug that affects clathrin-mediated endocytosis did not have any effect on PM-associated Gag products internalization to LE/MVB (Fig. 5). These results differ from those reported by Jouvenet and colleagues (22), which indicated that Gag internalization from the PM involved clathrin-mediated endocytosis. Indeed, under their experimental conditions, expression of transdominant negative forms of EPS 15, which inhibits clathrin-mediated endocytosis, reduced endosomal accumulation of Gag-GFP fusion proteins. This discrepancy is perhaps related to the form of Gag (tagged Gag vs native Gag) being analyzed and/or the expression context that is used (codon-optimized Gag expressor vs proviral construct). Interestingly, recent data from Suomalainen and colleagues that are based on a fractionation procedure reveals that internalization of unprocessed Pr55^{gag} expressed from a proviral construct is cholesterol-dependent (inhibited by filipin) but not affected by siRNA-mediated silencing of clathrin heavy chain (Suomalainen personal communication). Nevertheless, in a physiological context the mechanism and rate of internalization of

Gag and viral particles from the PM is likely to be dictated in a large part by the predominant mechanism of PM internalization, which essentially occurs in all cell types via endocytic or phagocytic mechanisms. These mechanisms of internalization will vary with cell types as indeed recently shown with primary macrophages; in this cell type, Gag was also found to first accumulate and assemble at the PM, but a proportion was subsequently internalized by a phagocytic process (22).

Finally, in our experimental conditions we were unable to detect a movement of Gag-containing LE/MVB to the PM (Fig. 4), in agreement with a recent report that found that pharmacological inhibitors (nocodazole and U18666A) that arrest late endosomal motility have no effect on accumulation of Gag at the PM, or on extracellular particle release. Furthermore, this same study did not detect any viral release when viral assembly was rationally targeted to late endosomes (22). While these findings suggest that HIV particles accumulating in LE/MVB do not significantly contribute to the overall virus released extracellularly from HEK 293T cells, it does not preclude that in other cell types such as macrophages or dendritic cells and under some physiological stimulus, eg: antigen presentation or calcium influx, which induce endosome fusion with the cell surface, virus internalized in LE/MVB is eventually released in the extracellular milieu or transmitted upon contact between cells during formation of an immunological synapse. Indeed, it was previously reported that virus accumulating intracellularly in macrophages remains infectious (24, 52) and can efficiently be transmitted to T cells for extended periods of time (52). More recently, under conditions mimicking antigen recognition by interacting T cells, dendritic cells were shown to transmit captured virions from internal compartments. However, this so-called process of *trans*-infection was limited to few captured virions and did not appear to be the predominant mode of transmission (4). Clearly, more studies are needed to better understand the role of virus accumulating in internal endosomal compartments especially in physiological relevant cells and conditions.

Overall, the results presented herein are difficult to reconcile with data supporting a model where HIV-1 Gag targets LE/MVB prior to budding at PM. Rather, our findings suggest that the majority of Gag is first targeted to the PM where productive assembly occurs. Accumulation of Gag and viral particles in LE/MVB is largely the result of endocytosis of Gag from the cell surface.

Importantly, Gag and virus internalized in LE/MVB are not constitutively transported to the PM to be released in the extracellular milieu. These results imply that the overall steady-state cellular localization of Gag and viral particles in different cell types will indeed be governed by the rate by which HIV particles are assembled and released at the cell surface as well as by the inherent ability of different cell types to internalize membrane from the cell surface.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Vallée for expert technical assistance in EM analysis. The polyclonal anti-p24 Ab was obtained through the NIH AIDS Research Reference and Reagent Program. AF and AO are recipients of studentships from a Canadian Institute of Health Research (CIHR) strategic training program in cancer research and the IRCM foundation, respectively. EAC is recipient of the Canada Research Chair in Human Retrovirology. This work was supported by grants from CIHR and the Fonds de la Recherche en Santé du Québec to EAC.

REFERENCES

1. **Abedinpour, P., and B. Jergil.** 2003. Isolation of a caveolae-enriched fraction from rat lung by affinity partitioning and sucrose gradient centrifugation. *Anal Biochem* **313**:1-8.
2. **Beriault, V., J. F. Clement, K. Levesque, C. Lebel, X. Yong, B. Chabot, E. A. Cohen, A. W. Cochrane, W. F. Rigby, and A. J. Mouland.** 2004. A late role for the association of hnRNP A2 with the HIV-1 hnRNP A2 response elements in genomic RNA, Gag, and Vpr localization. *J Biol Chem* **279**:44141-53.
3. **Bieniasz, P. D.** 2006. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology* **344**:55-63.
4. **Cavrois, M., J. Neidleman, J. F. Kreisberg, and W. C. Greene.** 2007. In Vitro Derived Dendritic Cells trans-Infect CD4 T Cells Primarily with Surface-Bound HIV-1 Virions. *PLoS Pathog* **3**:e4.
5. **Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, Y. Jalinoos, J. Proulx, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1990. Identification of HIV-1 vpr product and function. *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**:11-8.
6. **Crane, J. M., and L. K. Tamm.** 2004. Role of cholesterol in the formation and nature of lipid rafts in planar and spherical model membranes. *Biophys J* **86**:2965-79.
7. **Demirov, D. G., and E. O. Freed.** 2004. Retrovirus budding. *Virus Res* **106**:87-102.
8. **Deora, A., and 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**:6714-8.
9. **Ding, L., A. Derdowski, J. J. Wang, and P. Spearman.** 2003. Independent segregation of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein complexes and lipid rafts. *J Virol* **77**:1916-26.
10. **Dong, X., H. Li, A. Derdowski, L. Ding, A. Burnett, X. Chen, T. R. Peters, T. S. Dermody, E. Woodruff, J. J. Wang, and P. Spearman.** 2005. AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell* **120**:663-74.

11. **Dugast, M., H. Toussaint, C. Dousset, and P. Benaroch.** 2005. AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *J Biol Chem* **280**:19656-64.
12. **Finzi, A., A. Brunet, Y. Xiao, J. Thibodeau, and E. A. Cohen.** 2006. Major histocompatibility complex class II molecules promote human immunodeficiency virus type 1 assembly and budding to late endosomal/multivesicular body compartments. *J Virol* **80**:9789-97.
13. **Ford, A. W., and P. J. Dawson.** 1994. Effect of type of container, storage temperature and humidity on the biological activity of freeze-dried alkaline phosphatase. *Biologicals* **22**:191-7.
14. **Freed, E. O.** 1998. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**:1-15.
15. **Gomez, C. Y., and T. J. Hope.** 2006. Mobility of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag in living cells. *J Virol* **80**:8796-806.
16. **Gottlinger, H. G.** 2001. The HIV-1 assembly machine. *Aids* **15 Suppl 5**:S13-20.
17. **Gottlinger, H. G., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5781-5.
18. **Gould, S. J., A. M. Booth, and J. E. Hildreth.** 2003. The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:10592-7.
19. **Grigorov, B., F. Arcanger, P. Roingeard, J. L. Darlix, and D. Muriaux.** 2006. Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines. *J Mol Biol* **359**:848-62.
20. **Harila, K., I. Prior, M. Sjoberg, A. Salminen, J. Hinkula, and M. Suomalainen.** 2006. Vpu and Tsg101 regulate intracellular targeting of the human immunodeficiency virus type 1 core protein precursor Pr55gag. *J Virol* **80**:3765-72.
21. **Janvier, K., and J. S. Bonifacino.** 2005. Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Mol Biol Cell* **16**:4231-42.
22. **Jouvenet, N., S. J. Neil, C. Bess, M. C. Johnson, C. A. Virgen, S. M. Simon, and P. D. Bieniasz.** 2006. Plasma Membrane Is the Site of Productive HIV-1 Particle Assembly. *PLoS Biol* **4**:e435.

23. **Kirkham, M., and R. G. Parton.** 2005. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta* **1745**:273-86.
24. **Kramer, B., A. Pelchen-Matthews, M. Deneka, E. Garcia, V. Piguet, and M. Marsh.** 2005. HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells. *Blood Cells Mol Dis* **35**:136-42.
25. **Lavallee, C., and E. A. Cohen.** 1993. HIV-1 HxBc2 strain encodes a truncated vpr gene product of 78 amino acids. *J Acquir Immune Defic Syndr* **6**:529-30.
26. **Levesque, K., Y. S. Zhao, and E. A. Cohen.** 2003. Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. *J Biol Chem* **278**:28346-53.
27. **Liao, Z., D. R. Graham, and J. E. Hildreth.** 2003. Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**:675-87.
28. **Lindwasser, O. W., and M. D. Resh.** 2004. Human immunodeficiency virus type 1 Gag contains a dileucine-like motif that regulates association with multivesicular bodies. *J Virol* **78**:6013-23.
29. **Lindwasser, O. W., and M. D. Resh.** 2001. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J Virol* **75**:7913-24.
30. **Micheva, K. D., A. Vallee, C. Beaulieu, I. M. Herman, and N. Leclerc.** 1998. beta-Actin is confined to structures having high capacity of remodelling in developing and adult rat cerebellum. *Eur J Neurosci* **10**:3785-98.
31. **Morita, E., and W. I. Sundquist.** 2004. Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**:395-425.
32. **Neil, S. J., S. W. Eastman, N. Jouvenet, and P. D. Bieniasz.** 2006. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog* **2**:e39.
33. **Neufeld, E. B., A. M. Cooney, J. Pitha, E. A. Dawidowicz, N. K. Dwyer, P. G. Pentchev, and E. J. Blanchette-Mackie.** 1996. Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol Chem* **271**:21604-13.

34. **Nguyen, D. G., A. Booth, S. J. Gould, and J. E. Hildreth.** 2003. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem* **278**:52347-54.
35. **Nguyen, D. H., and J. E. Hildreth.** 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* **74**:3264-72.
36. **Nydegger, S., M. Foti, A. Derdowski, P. Spearman, and M. Thali.** 2003. HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* **4**:902-10.
37. **Ono, A., and E. O. Freed.** 2004. Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol* **78**:1552-63.
38. **Ono, A., and E. O. Freed.** 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:13925-30.
39. **Ono, A., A. A. Waheed, and E. O. Freed.** 2006. Depletion of cellular cholesterol inhibits membrane binding and higher-order multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag. *Virology*.
40. **Ono, A., A. A. Waheed, A. Joshi, and E. O. Freed.** 2005. Association of human immunodeficiency virus type 1 gag with membrane does not require highly basic sequences in the nucleocapsid: use of a novel Gag multimerization assay. *J Virol* **79**:14131-40.
41. **Orenstein, J. M., M. S. Meltzer, T. Phipps, and H. E. Gendelman.** 1988. Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. *J Virol* **62**:2578-86.
42. **Orlandi, P. A., and P. H. Fishman.** 1998. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol* **141**:905-15.
43. **Paillart, J. C., and H. G. Gottlinger.** 1999. Opposing effects of human immunodeficiency virus type 1 matrix mutations support a myristyl switch model of gag membrane targeting. *J Virol* **73**:2604-12.
44. **Panina-Bordignon, P., X. T. Fu, A. Lanzavecchia, and R. W. Karr.** 1992. Identification of HLA-DR alpha chain residues critical for binding of the toxic shock syndrome toxin superantigen. *J Exp Med* **176**:1779-84.

45. **Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, and M. Marsh.** 2003. Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* **162**:443-55.
46. **Perlman, M., and M. D. Resh.** 2006. Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag. *Traffic* **7**:731-45.
47. **Radka, S. F., C. E. Machamer, and P. Cresswell.** 1984. Analysis of monoclonal antibodies reactive with human class II beta chains by two-dimensional electrophoresis and Western blotting. *Hum Immunol* **10**:177-86.
48. **Raposo, G., M. Moore, D. Innes, R. Leijendekker, A. Leigh-Brown, P. Benaroch, and H. Geuze.** 2002. Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* **3**:718-29.
49. **Resh, M. D.** 2005. Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles. *AIDS Rev* **7**:84-91.
50. **Rothberg, K. G., J. E. Heuser, W. C. Donzell, Y. S. Ying, J. R. Glenney, and R. G. Anderson.** 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68**:673-82.
51. **Rudner, L., S. Nydegger, L. V. Coren, K. Nagashima, M. Thali, and D. E. Ott.** 2005. Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling. *J Virol* **79**:4055-65.
52. **Sharova, N., C. Swingler, M. Sharkey, and M. Stevenson.** 2005. Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans. *Embo J*.
53. **Sheff, D. R., E. A. Daro, M. Hull, and I. Mellman.** 1999. The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions. *J Cell Biol* **145**:123-39.
54. **Sherer, N. M., M. J. Lehmann, L. F. Jimenez-Soto, A. Ingmundson, S. M. Horner, G. Cicchetti, P. G. Allen, M. Pypaert, J. M. Cunningham, and W. Mothes.** 2003. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* **4**:785-801.
55. **Sieczkarski, S. B., and G. R. Whittaker.** 2002. Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol* **83**:1535-45.
56. **Subtil, A., I. Gaidarov, K. Kobylarz, M. A. Lampson, J. H. Keen, and T. E. McGraw.** 1999. Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:6775-80.

57. **Swanson, C. M., B. A. Puffer, K. M. Ahmad, R. W. Doms, and M. H. Malim.** 2004. Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly. *Embo J* **23**:2632-40.
58. **Thorn, H., K. G. Stenkula, M. Karlsson, U. Ortegren, F. H. Nystrom, J. Gustavsson, and P. Stralfors.** 2003. Cell surface orifices of caveolae and localization of caveolin to the necks of caveolae in adipocytes. *Mol Biol Cell* **14**:3967-76.
59. **Tritel, M., and M. D. Resh.** 2000. Kinetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 assembly reveals the presence of sequential intermediates. *J Virol* **74**:5845-55.
60. **Wang, L. H., K. G. Rothberg, and R. G. Anderson.** 1993. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* **123**:1107-17.
61. **Yao, X. J., R. A. Subramanian, N. Rougeau, F. Boisvert, D. Bergeron, and E. A. Cohen.** 1995. Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J Virol* **69**:7032-44.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. PM separation from LE/MVB after iodixanol gradient-based sub-cellular fractionation. HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus and mechanically homogenized 48 h later. PNS production and sub-cellular fractionation were performed as described in Materials and Methods. (A) Plasma membrane location into the gradient. Cells were cell-surface biotinylated or incubated with biotinylated-transferrin at 0°C. Alternatively, cells were cotransfected with a CD4 expressor and cell surface CD4 was labeled with an anti-CD4 Ab at 0°C. Biotinylated cell surface protein, biotinylated transferrin (Tfr) and cell surface CD4 were analyzed in each fraction by western blotting as described in Materials and Methods. Finally, the presence of Alkaline Phosphatase was evaluated by incubating each fraction with its specific substrate as described in Materials and Methods. (B) LE/MVB markers migration was analyzed by western blotting using specific anti-CD63 and Lamp1 Abs or by immunoprecipitation/western blotting using HLA-DR Abs. Data shown in A and B are representative of at least 2 independent experiments. (C) Fractions 2-3, 6-7 and 13-14 were pooled, fixed, ultracentrifuged and processed for conventional electronic microscopy. PM structures were highly enriched in fractions 2-3 (a) and 6-7 (b). Fractions 13-14 were highly enriched in multivesicular bodies (c) and multilamellar structures (d). Scale bars represent (a) 200 nm, (b-d) 100 nm. Data shown are representative of at least two independent experiments.

Fig. 2. HIV-1 Gag steady-state distribution after sub-cellular fractionation.

HEK 293T cells were co-transfected with the HxBc2 provirus together with either HLA-DR or empty vector and mechanically homogenized 48 h later. PNS was processed as described in Materials and Methods. Fourteen fractions were collected from the top of the gradient and Gag and its cleavage products were analyzed by western blotting using a monoclonal anti-p24 antibody. (A) Steady-state Gag distribution after sub-cellular fractionation. (B) Steady-state distribution of Gag upon HLA-DR expression. Lower panels represent lower exposure of the mature (p25/p24) Gag products. Data shown are representative of at least two independent experiments. (C) Fractions 1-6 (PM) and 13-14 (LE/MVB) were pooled and assessed for reverse transcriptase (RT) activity. RT activity was arbitrarily settled at 100% in

control (HLA-DR-negative) samples. Data shown are means \pm standard deviations of two independent experiments.

Fig. 3. Ultrastructural analysis of HIV-1 Gag association with different sub-cellular compartments. HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus together with an HLA-DR expressor and mechanically homogenized 48 h later. PNS production and sub-cellular fractionation were performed as described in Materials and Methods. Fourteen fractions were collected from the top of the gradients; fractions 2-3, 6-7 and 13-14 were pooled, fixed, ultracentrifuged and observed by conventional transmission electron microscopy (C) or processed for immunogold staining with a rabbit polyclonal anti-p24 Ab followed by incubation with a goat anti-rabbit serum coupled to 18 (A-B) or 12 (D) nm gold beads. Filamentous structures staining positive for p24 were exclusively observed in fractions 2-3 (A) and 6-7 (B). Fractions 13-14 were enriched in HIV-1 particles-containing LE/MVB (C) as indicated by a positive p24 staining (D). Empty arrows indicate budding virus whereas solid arrows indicate mature virus. Scale bars represent 100 nm. Data shown are representative of at least two independent experiments.

Fig. 4. Sub-cellular trafficking of HIV-1 Gag

(A) HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus. Two days after transfection, cells were metabolically labeled with [³⁵S]Met-Cys for 10 min and chased for various times prior to cell lysis and sub-cellular fractionation by optiprep gradient centrifugation as described in Materials and Methods. Fourteen fractions were collected from the top of the gradient and Gag-related products in each fraction were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 Ab. (B) Viral release during the pulse-chase analysis. Virion lysates were immunoprecipitated as for panel A. Data shown are representative of five independent experiments.

Fig. 5. Chlorpromazine, an inhibitor of clathrin-dependent endocytosis does not affect HIV-1 Gag trafficking in HEK 293 T cells. HEK 293T cells were transfected

with the HxBc2 provirus. Two days after transfection cells were pre-treated with chlorpromazine (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 min before incubation for another 30 min at 0°C with (A) Tfr or (B) ChTx β Alexa-488 conjugates. Tfr or ChTx β internalization was allowed for 10 min at 37°C . Chlorpromazine was maintained throughout the experiment before samples were analyzed by immunofluorescence microscopy (bar, 10 μm) as described in Materials and Methods. Data shown are representative of two independent experiments. (C) In parallel, cells were metabolically labeled with [^{35}S]Met-Cys for 10 min and chased for 2 h in presence of chlorpromazine prior to cell lysis and sub-cellular fractionation by optiprep gradient centrifugation. Gag-related products in optiprep fractions were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 Ab for each collected fraction. (D) Quantification of the relative amount of Pr55^{Gag} detected in PM- and MVB-associated fractions (1-6 and 13-14, respectively) at time 0 h of chase. (E) Quantification of the relative amounts of mature Gag products (p25/p24) detected in PM or MVB-associated fractions at time 2 h of chase. Gag-related signals were quantified using a PhosphoImager equipped with the ImageQuant software 5.0. Data shown are means \pm standard deviations of 5 (control) and 2 (chlorpromazine) independent experiments.

Fig. 6. Effect of cholesterol-binding drugs on HIV-1 Gag trafficking in HEK 293T cells.

HEK 293T cells were transfected with the HxBc2 provirus. Two days after transfection cells were pre-treated with filipin (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or M β CD (8 mM) for 30 min before incubation for another 30 min at 0°C with (A) Tfr or (B) ChTx β Alexa-488 conjugates. Tfr or ChTx β internalization was allowed for 10 min at 37°C . Endocytosis inhibitors were maintained throughout the experiment. Samples were subsequently analyzed by immunofluorescence microscopy (bar, 10 μm) as described in Materials and Methods. Data shown are representative of two independent experiments. In parallel, cells were metabolically labeled with [^{35}S]Met-Cys for 10 min and chased for 2 h in presence of (C) filipin or (D) M β CD prior to cell lysis and sub-cellular fractionation by optiprep gradient centrifugation. Gag-related products in optiprep fractions were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 Ab for each collected fraction. (E) Quantification of

the relative amounts of Pr55^{Gag} detected in PM- and MVB-associated fractions (1-6 and 13-14, respectively) at time 0 h of chase. (F) Quantification of the relative amounts of mature Gag products (p25/p24) detected in PM or MVB-associated fractions at time 2 h of chase. Gag-related signals were quantified as described in the legend of Fig. 5. Data shown are means \pm standard deviations of 5 (control), 3 (filipin) and 2 (M β CD) independent experiments.

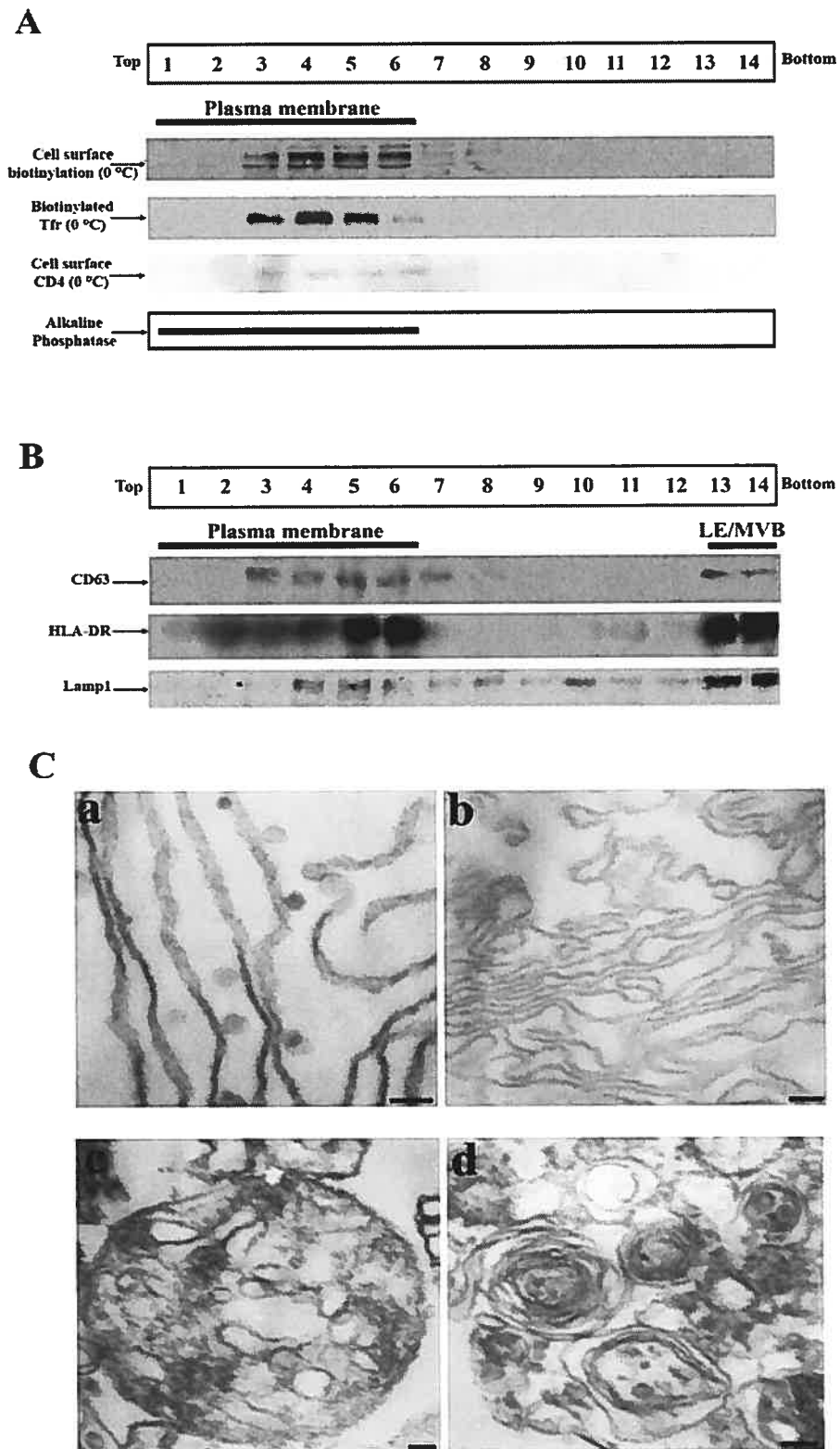


Figure 1. PM separation from LE/MVB after iodixanol gradient-based sub-cellular fractionation.

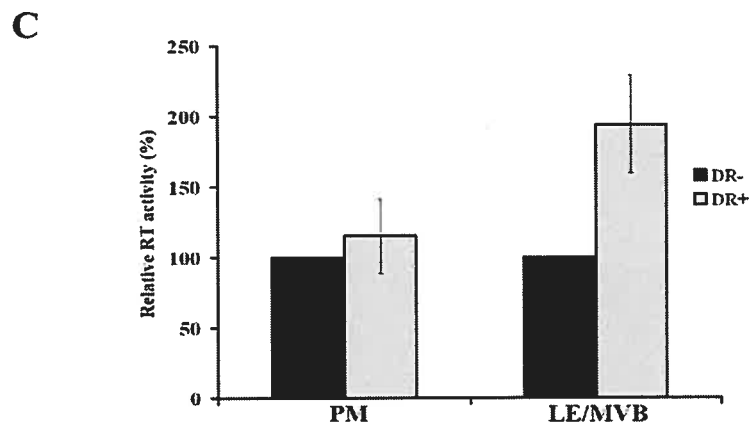
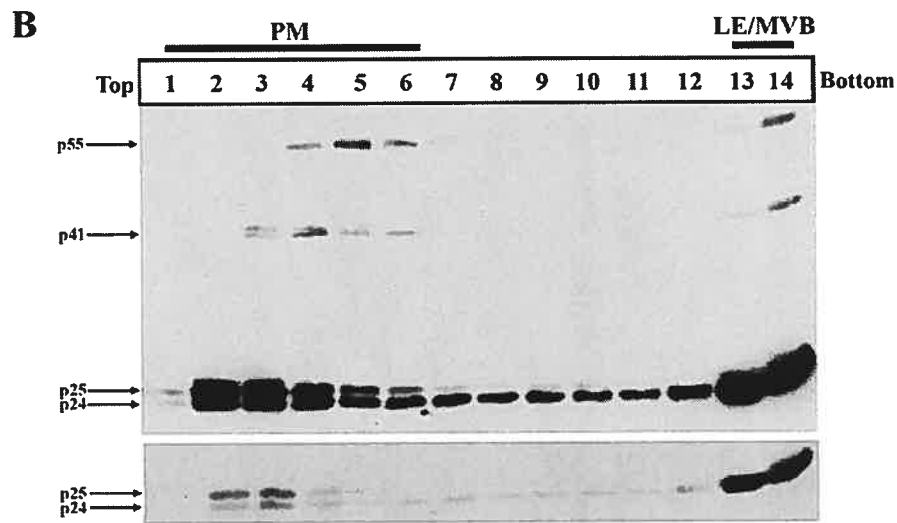
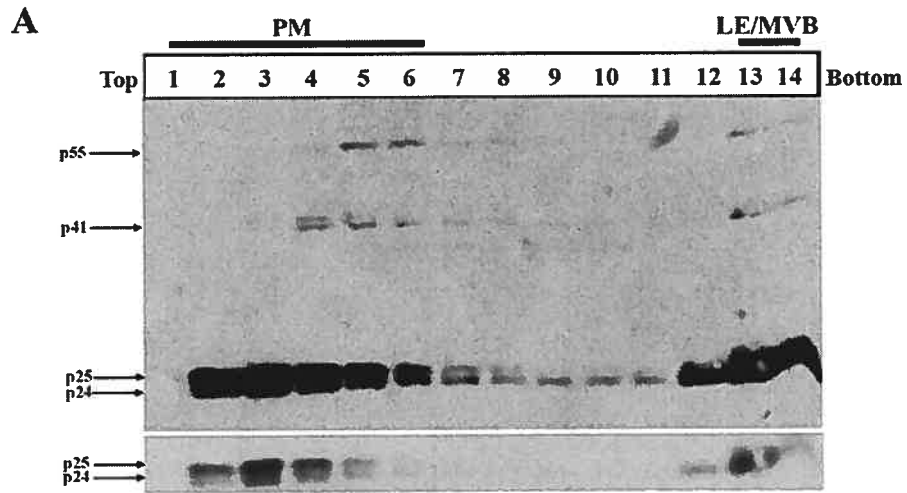


Figure 2. HIV-1 Gag steady-state distribution after sub-cellular fractionation.

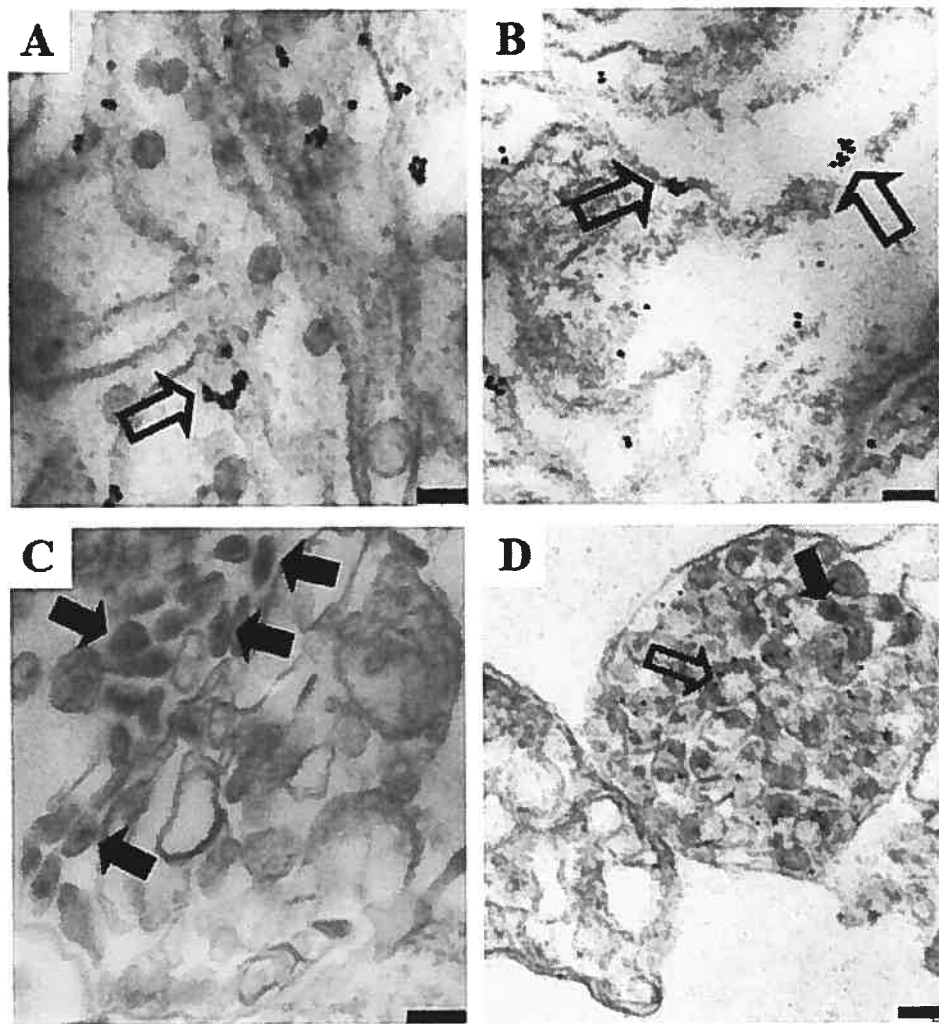


Figure 3. Ultrastructural analysis of HIV-1 Gag association with different sub-cellular compartments.

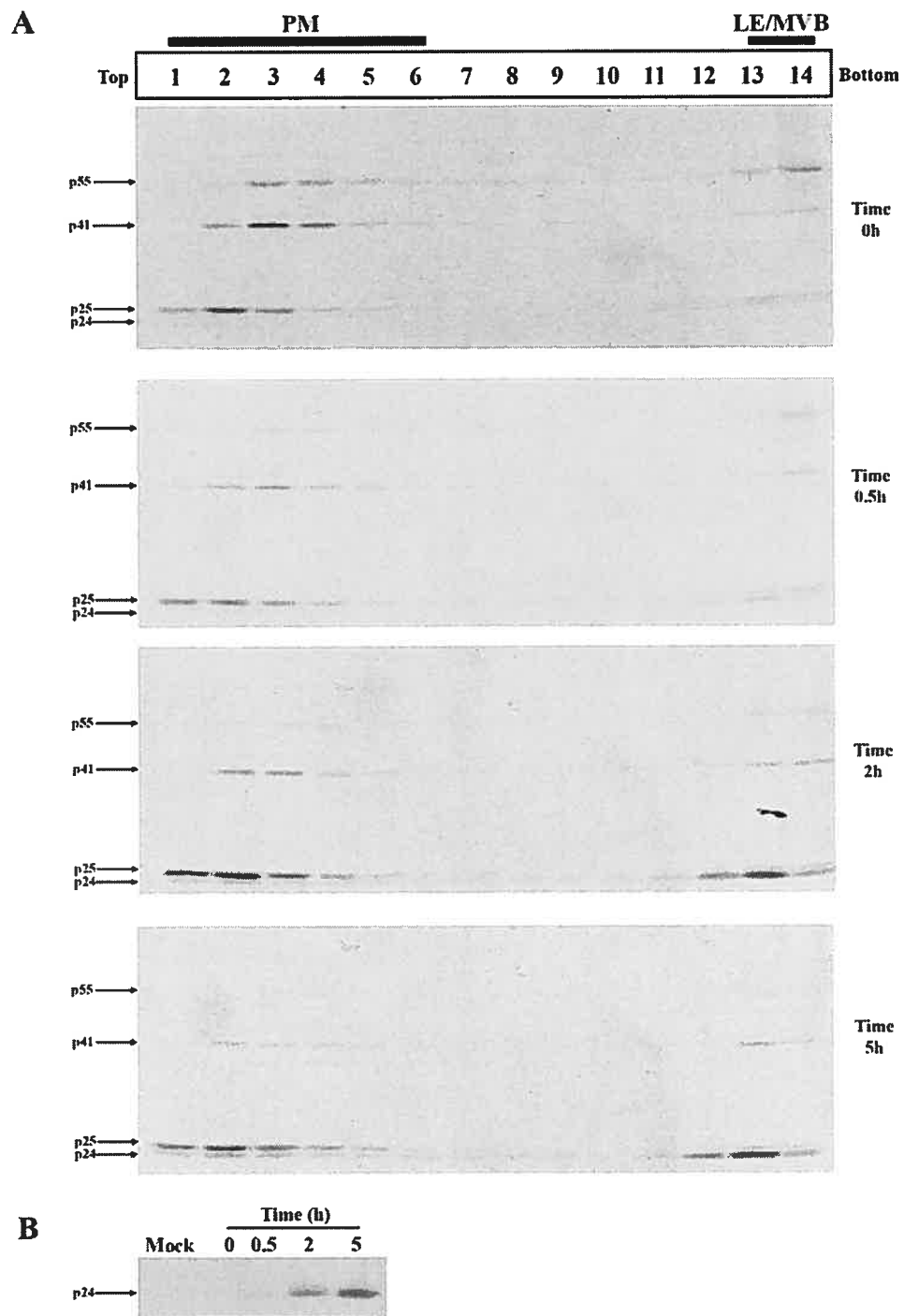


Figure 4. Sub-cellular trafficking of HIV-1 Gag.

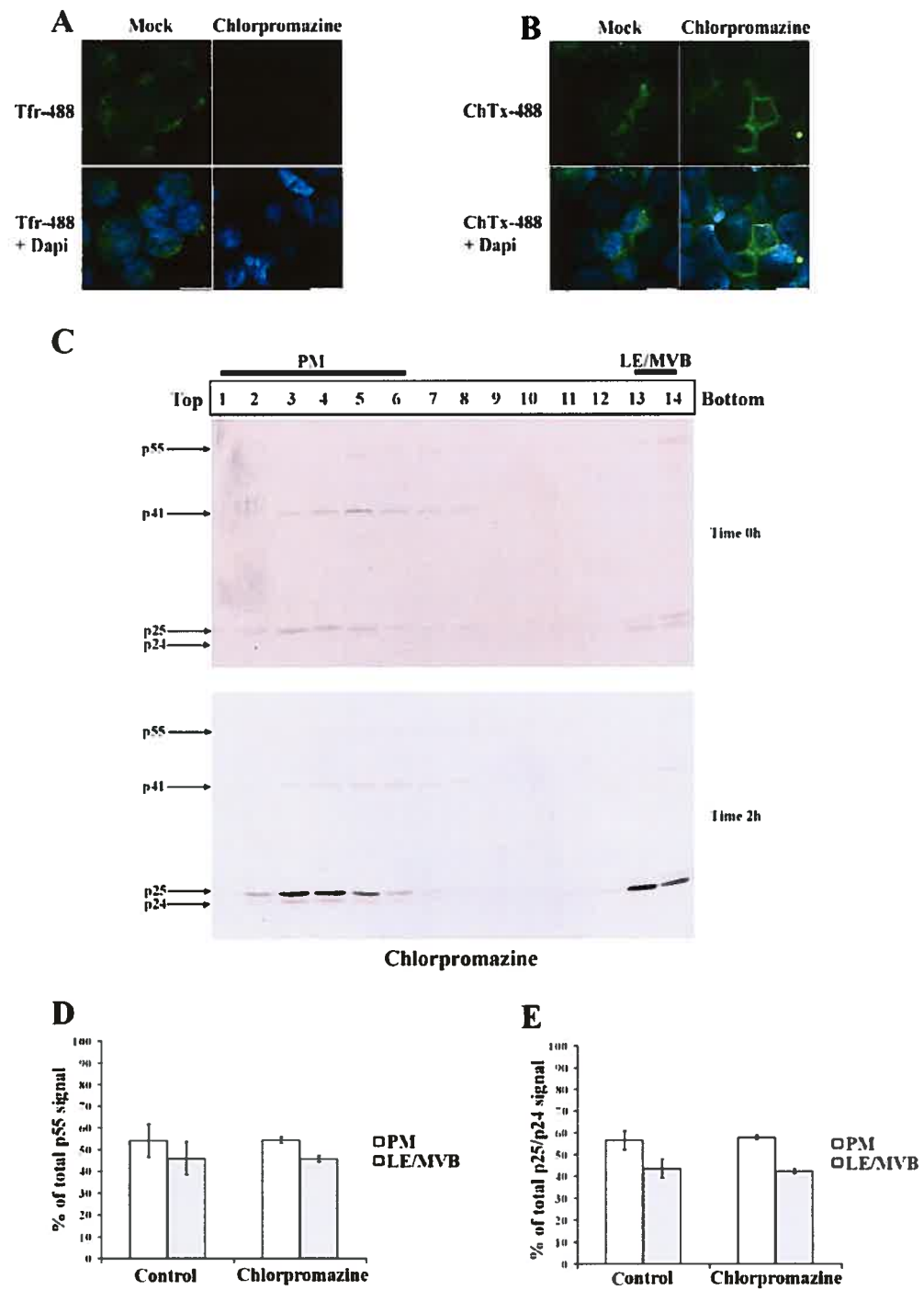


Figure 5. Chlorpromazine, an inhibitor of clathrin-dependent endocytosis does not affect HIV-1 Gag trafficking in HEK 293 T cells.

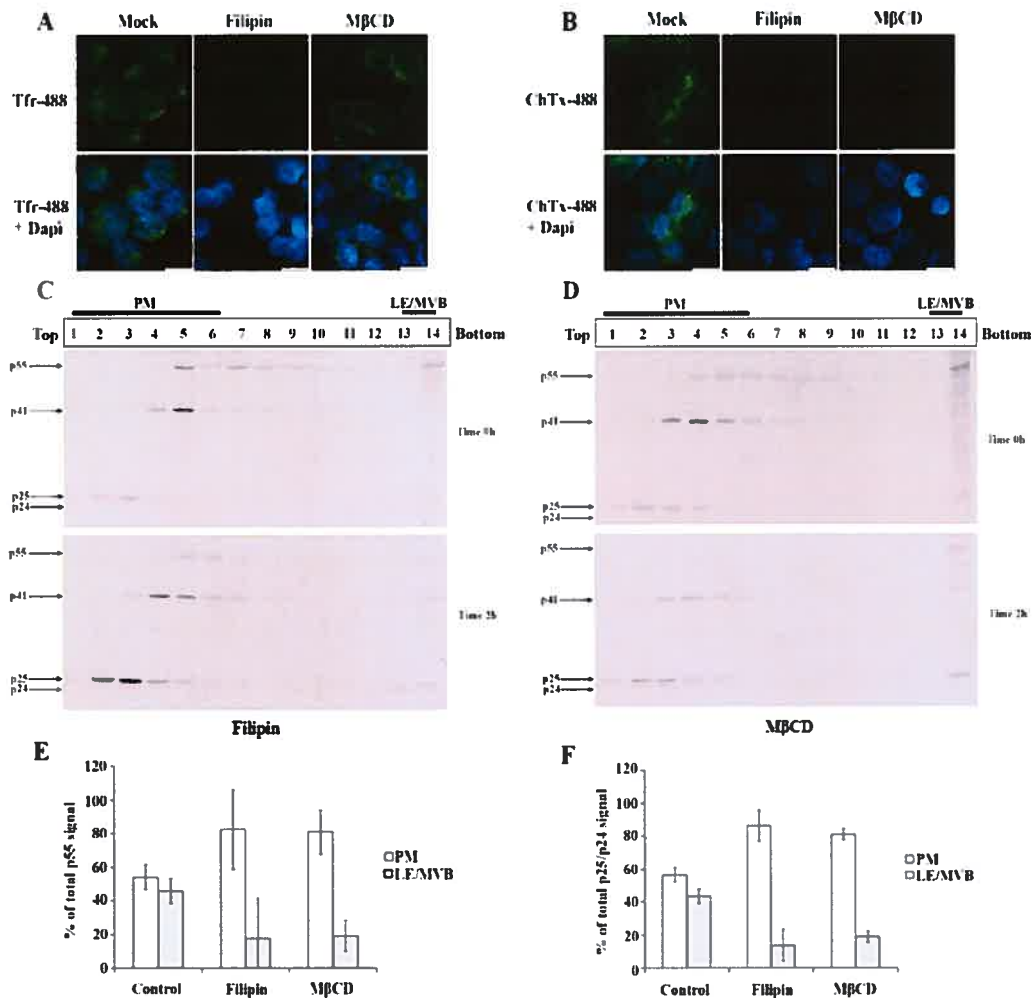


Figure 6. Effect of cholesterol-binding drugs on HIV-1 Gag trafficking in HEK 293T cells.

Supporting information

Cells and plasmids. HEK 293T cells were maintained as described (4). The HIV-1 molecular clone HxBc2 (3) and HxBc2 Myr- (G2A mutation in MA) (5) were previously described. The HxBc2 PR-Env- provirus was constructed by replacing the Sall/BamHI fragment of HxBc2 PR- (2) by the Sall/BamHI of HxBc2 Env- (1).

Transfections, metabolic labeling and immunoprecipitations. Transfections were performed as described (6); experiments were done 48 h post-transfection. For pulse-chase experiments, transfectants were metabolically labeled with 1mCi/mL [³⁵S] methionine-cysteine ([³⁵S] Protein Labeling mix, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA) in DMEM lacking methionine and cysteine and supplemented with 5% dialyzed FBS for 10 min and chased for different time intervals in DMEM containing excess of unlabelled methionine and cysteine. When indicated, chlorpromazine (10 µg/ml), filipin (4 µg/ml) or MβCD, (8 mM) were added during the starving period (30 min) and maintained throughout the chase. All drugs were purchased from Sigma-Aldrich.

Immunoprecipitations were performed on each fraction as follows: fractions were pre-cleared with the corresponding normal serum for 2 h at 4°C before being immunoprecipitated for 3 h at 4°C with a monoclonal anti-p24 Ab or a polyclonal anti-p24 serum as described previously (6). Immunocomplexes were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and analyzed by autoradiography. Quantitation of radioactive Gag-related bands in each fraction was performed using a PhosphoImager equipped with the ImageQuant software 5.0.

Assay for membrane binding.

Briefly, 5 millions HEK 293T cells were harvested in 250 µl of homogenization buffer (0.25 M sucrose, 78 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 8.4 mM CaCl₂, 10 mM EGTA, 50 mM Hepes-NaOH pH 7.0, containing a cocktail of protease inhibitors, Roche, Mississauga, ON, Canada) and lysed during 60 sec using a pellet pestle with a cordless motor (Kontes, Vineland, NJ, USA). Homogenates were centrifuged at

1000 g for 5 min to pellet nuclei and any cell debris. The post-nuclear supernatant was fractionated in a discontinuous sucrose flotation assay layered with 83, 65 and 10% sucrose, as described (5). Fourteen fractions (800 μ l) were collected from the top of the gradient and lysed with 200 μ l of 5X RIPA.DOC (700 mM NaCl, 40 mM Na_2HPO_4 , 10 mM NaH_2PO_4 , 5% NP40, 2.5% sodium deoxycholate, 0.25% sodium dodecyl sulfate (SDS)) containing a cocktail of protease inhibitors. Fractions were subsequently immunoprecipitated with a monoclonal anti-p24 Ab. Signal obtained in fractions 4-7, corresponding to the interface (membranes) and 11-14 (cytosol) were evaluated by quantifying Gag-related bands in each fraction using a PhosphoImager equipped with the ImageQuant software 5.0.

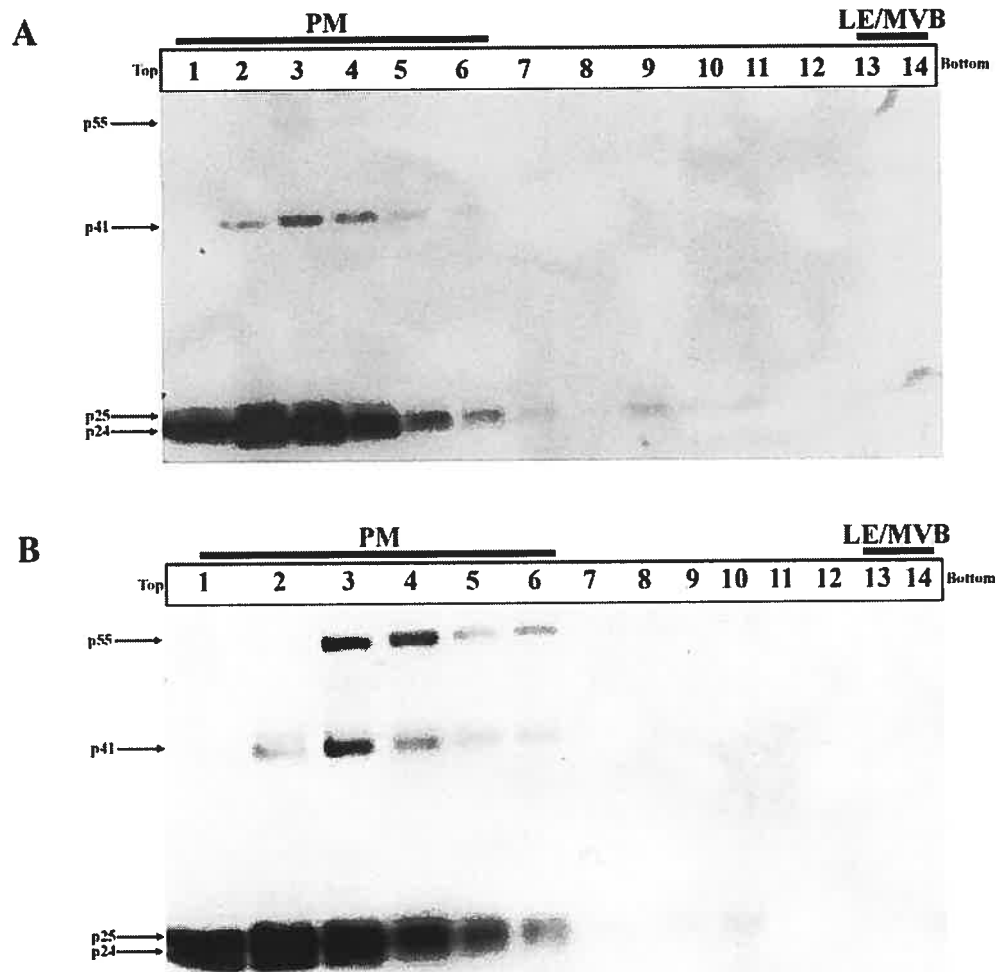
Supplemental Fig. 1. HIV-1 Gag detected in high density fractions is membrane-associated. HEK 293T cells were transfected with either WT (A) or Myr- (G2A mutation in MA) HxBc2 proviruses (B). Cells were mechanically homogenized 48 h later. PNS was normally processed in presence (A) or absence (B) of 1% NP40 for 30 min at 37°C. Gag-related products were analyzed by western blotting using a monoclonal anti-p24 antibody.

Supplemental Fig. 2. HIV-1 Gag membrane association. HEK 293T cells were transfected with either WT (A and C) or Myr- (G2A mutation in MA) (B) HxBc2 proviruses. Two days after transfection, cells were metabolically labeled with [³⁵S]Met-Cys for 10 min and chased for 0 (A and B) or 2 h (C) prior to cell lysis and flotation in a discontinuous sucrose (83, 65 and 10%) flotation assay, as described (5). Fourteen fractions were collected from the top of the gradient and Gag-related products were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 Ab. Quantification of the relative amount of Gag-related products (Pr55^{gag}, p41, p25 and p24) found at the interface of the 10-65% sucrose layer (membranes, M) and in high density fractions (cytosol, C) was performed using a PhosphoImager equipped with ImageQuant software 5.0.

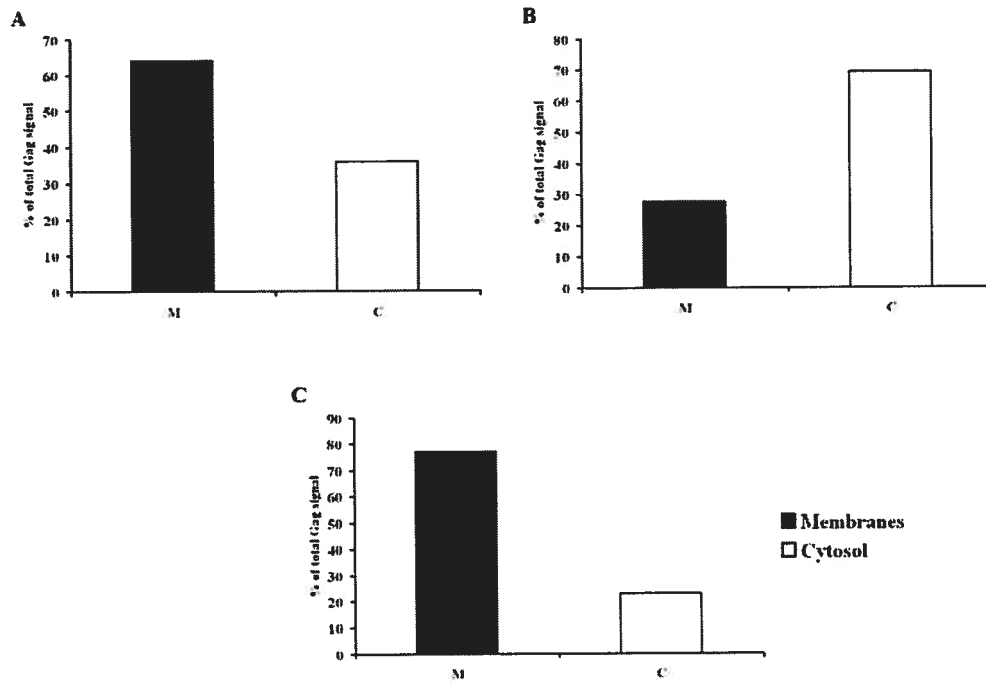
Supplemental Fig. 3. HIV-1 Gag membrane association in presence of endocytosis inhibitors. HEK 293T cells were transfected with the protease defective HxBc2 PR-Env- provirus. Two days after transfection cells were pre-treated with chlorpromazine (10 µg/ml), filipin (4 µg/ml) or MβCD (8 mM) for 30 min, subsequently metabolically labeled with [³⁵S]Met-Cys for 10 min and chased for 2 h, in the presence of the drugs, prior to cell lysis and flotation onto a discontinuous sucrose gradient as described in Materials and Methods. Fourteen fractions were collected from the top of the gradient and Gag-related products were detected by immunoprecipitation using a monoclonal anti-p24 Ab (A). (B) Quantification of the relative amounts of Pr55^{gag} in the interface of the 10-65% sucrose layer (membranes, M) and in high density fractions (cytosol, C) was performed using a PhosphoImager equipped with ImageQuant software 5.0. Data shown are means ± standard deviations of 2 independent experiments.

References

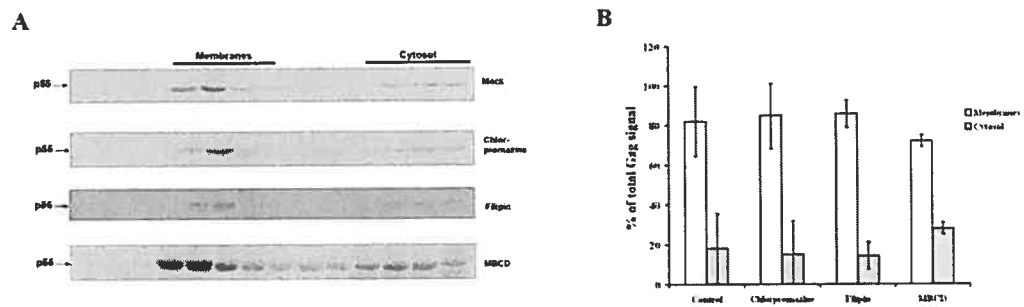
1. **Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, Y. Jalinoos, J. Proulx, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1990. Identification of HIV-1 vpr product and function. *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**:11-8.
2. **Gottlinger, H. G., J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1989. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5781-5.
3. **Lavallee, C., and E. A. Cohen.** 1993. HIV-1 HxBc2 strain encodes a truncated vpr gene product of 78 amino acids. *J Acquir Immune Defic Syndr* **6**:529-30.
4. **Levesque, K., Y. S. Zhao, and E. A. Cohen.** 2003. Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. *J Biol Chem* **278**:28346-53.
5. **Paillart, J. C., and H. G. Gottlinger.** 1999. Opposing effects of human immunodeficiency virus type 1 matrix mutations support a myristyl switch model of gag membrane targeting. *J Virol* **73**:2604-12.
6. **Yao, X. J., R. A. Subramanian, N. Rougeau, F. Boisvert, D. Bergeron, and E. A. Cohen.** 1995. Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation. *J Virol* **69**:7032-44.



Supplemental figure 1. HIV-1 Gag detected in high density fractions is membrane-associated.



Supplemental figure 2. HIV-1 Gag membrane association.



Supplemental figure 3. HIV-1 Gag membrane association in presence of endocytosis inhibitors.

2. Résultats complémentaires

2.a. Importance de l'efficacité de relâche : rôle de la protéine Vpu

Il est maintenant bien établi que la protéine accessoire Vpu facilite la relâche virale et cet effet est type cellulaire dépendant : elle a la capacité de réduire de manière significative la localisation de Gag dans des compartiments intracellulaires [123, 129]. De plus, la capacité de Vpu à favoriser la relâche de particules virales dépendrait de la confluence des cellules et de la capacité des cellules à poursuivre le cycle cellulaire : Deora et coll. ont notamment montré que le niveau de confluence des cellules HEK293T favorise ou non leur sensibilité à Vpu. À confluence, l'expression en *trans* de Vpu permet d'augmenter la relâche de Gag de plus de 5 fois alors qu'aucun effet n'est observable lorsque les cellules sont à sous-confluence ([128]; Orthwein non publié). Il était donc intéressant d'utiliser ce système pour vérifier la capacité de Vpu à induire une redistribution intracellulaire de Gag. Les cellules HEK293T ont été cultivées de telle manière à ce que l'analyse de la localisation de Gag soit faite dans des conditions confluence/sous-confluence : ces cellules ont par la suite été transfectées avec le provirus HxBH10 Vpu+ ou Vpu- et soumises au fractionnement cellulaire 48 post-transfection. Comme évoqué précédemment, la sous-confluence rend les cellules HEK293T insensibles à Vpu. En effet, la distribution intracellulaire de Gag est identique au niveau des fractions enrichies en membrane plasmique (PM ; fraction 1-6) et en CMV (LE/MVB ; fractions 13-14) en présence ou en absence de la protéine accessoire (Figure 1A). Dans un contexte où Vpu n'a pas d'effet sur l'efficacité de relâche, la distribution intracellulaire de Gag n'est pas affectée par l'expression de la protéine Vpu. Par contre, les cellules à confluence présentent une distribution de Gag intracellulaire typique selon que Vpu soit exprimé ou non : en absence de Vpu, Gag se trouve à la fois au niveau des fractions enrichies en membrane plasmique (1-6) mais aussi au niveau des CMV (13-14), reflétant la distribution de Gag observées dans des cellules insensibles à Vpu (Figure 1A). L'expression de Vpu conduit à une diminution significative de la quantité de produits matures p25/p24 dans les fractions 13-14 mais plus encore à la disparition presque totale des formes matures de Gag au niveau de la membrane plasmique (Figure 1B), corrélant avec une augmentation de plus de 3 fois de la relâche de particules matures dans le surnageant (Figure 2). Seul le précurseur Pr55^{Gag} et la p41 se retrouvent au niveau des fractions de faible densité (1-6) (Figure 1B). Bien qu'il ait été montré qu'en absence de la protéase virale, Vpu est capable de

favoriser la relâche du précurseur Pr55Gag sous forme de VLP [121], plusieurs études ont mis en évidence que l'effet de Vpu sur la relâche virale a lieu majoritairement et principalement au niveau des formes matures de Gag (p25/p24) en présence de PR et que les niveaux intracellulaires de Pr55Gag dans un contexte sauvage n'étaient pas significativement affectés [121, 123, 127, 372]. C'est pourquoi, dans le but de comparer nos deux échantillons (Vpu+/-) et pour quantifier l'importance de l'efficacité de relâche sur la localisation de Gag dans les CMV, nous avons mesuré la quantité de formes p25/p24 dans les fractions 13-14 et normalisé la valeur obtenue avec les niveaux intracellulaires du précurseur Pr55^{Gag}, sachant que ces niveaux sont constants en présence ou absence de Vpu. Alors que l'expression de Vpu dans les cellules HEK293T à sous-confluence ne modifie pas la proportion de formes matures p25/p24 dans les fractions enrichies en CMV, l'augmentation de la relâche virale à confluence conduit à une diminution de près de 4 fois de la quantité de p25/p24 présent dans les fractions 13-14 (Figure 1 C). Ces données montrent donc que l'expression seule de Vpu n'a pas d'effet sur la distribution intracellulaire de Gag : seule une augmentation de l'efficacité de la relâche virale permet une diminution drastique de la présence de Gag dans les CMV. Ces données confirment les observations faites précédemment montrant que l'expression de Vpu dans un système cellulaire où la relâche virale pouvait être affectée, diminue la présence de Gag dans des compartiments intracellulaires [123, 129]. Des travaux récents ont par ailleurs mis en évidence que Vpu, par l'inhibition d'un facteur adhésif présent à la membrane plasmique, facilite le détachement de particules matures de la membrane périphérique et prévient l'internalisation de particules virales matures ou complètes [123, 129]. Nos données confirment finalement la sensibilité de notre fractionnement cellulaire à des altérations du cycle de réplication du VIH-1.

2.b. Importance de la multimérisation de Gag dans sa distribution

La formation de la particule virale requiert entre autre que les molécules de Gag multimérisent et forment une structure compacte. Les étapes pré-multimérisation tels que l'interaction MA-membrane, ou les étapes post-multimérisation tels que le bourgeonnement de la particule viral et le recrutement de la machinerie cellulaire ESCRT, sont cruciales dans la distribution intracellulaire de Gag et sa localisation dans les CMV. Certaines données suggèrent par ailleurs que la multimérisation influence la distribution de Gag : contrairement à la souche sauvage,

un mutant perdant sa capacité à multimériser ne présente plus de localisation intracellulaire de Gag ponctuelle [373]. Il était donc particulièrement intéressant de vérifier si la multimérisation de Gag était nécessaire à sa localisation dans des compartiments intracellulaires dont les CMV. Pour cela, nous avons utilisé une construction précédemment décrite où tous les résidus basiques du domaine NC ont été substitués par des alanines [374]. Ce mutant appelé pNLHX15A (15A) a toujours la capacité d'être relâché dans le milieu extracellulaire mais de manière moins efficace que la souche sauvage [374]. Brièvement, les cellules HEK293T ont été transfectées avec la souche sauvage pNLSE HxBc2 ou le mutant 15A et analysées par fractionnement cellulaire comme précédemment décrit. La souche sauvage pNLSE HxBc2 présente une distribution intracellulaire de Gag comparable à ce que nous avons observé avec la souche provirale HxBc2 ou pNL4.3 (Figure 3), mettant en avant deux populations distinctes : une population présente dans les fractions enrichies en membrane plasmique (PM ; fractions 1-4) et une population se retrouvant dans les fractions de haute densité (LE/MVB ; fractions 13-14). De manière intéressante, la substitution des résidus basiques en alanine dans le domaine NC conduit à la perte de la population de Gag observée précédemment dans les fractions enrichies en CMV (LE/MVB ; fractions 13-14) alors que la population de Gag trouvée dans les fractions de faible densité (PM ; fractions 1-4) n'est que peu affectée (Figure 3). Les niveaux intracellulaires de p55 du mutant 15A sont plus importants par rapport à la construction sauvage, corrélant avec les travaux précédents montrant un défaut de maturation du précurseur Pr55^{Gag} par la protéase virale par inhibition de la multimérisation [374]. Ces données suggèrent donc que la multimérisation de Gag est nécessaire à sa localisation dans les CMV confirmant les données obtenues par immunofluorescence et montrant une absence de marquage ponctué intracellulaire de Gag dans les cellules HeLa [373]. Par ailleurs, l'absence du précurseur Pr55^{Gag} dans les fractions de forte densité (13-14) tend à suggérer que Gag n'est pas directement ciblé vers les CMV et que sa localisation dans ces compartiments intracellulaires est avant tout le résultat d'un processus d'internalisation de formes complètes/matures, confirmant les données obtenus avec des mutants PTAP ou du domaine L de Gag qui sont incapables d'être internalisés du fait de leur attachement à la membrane plasmique [123, 129, 229].

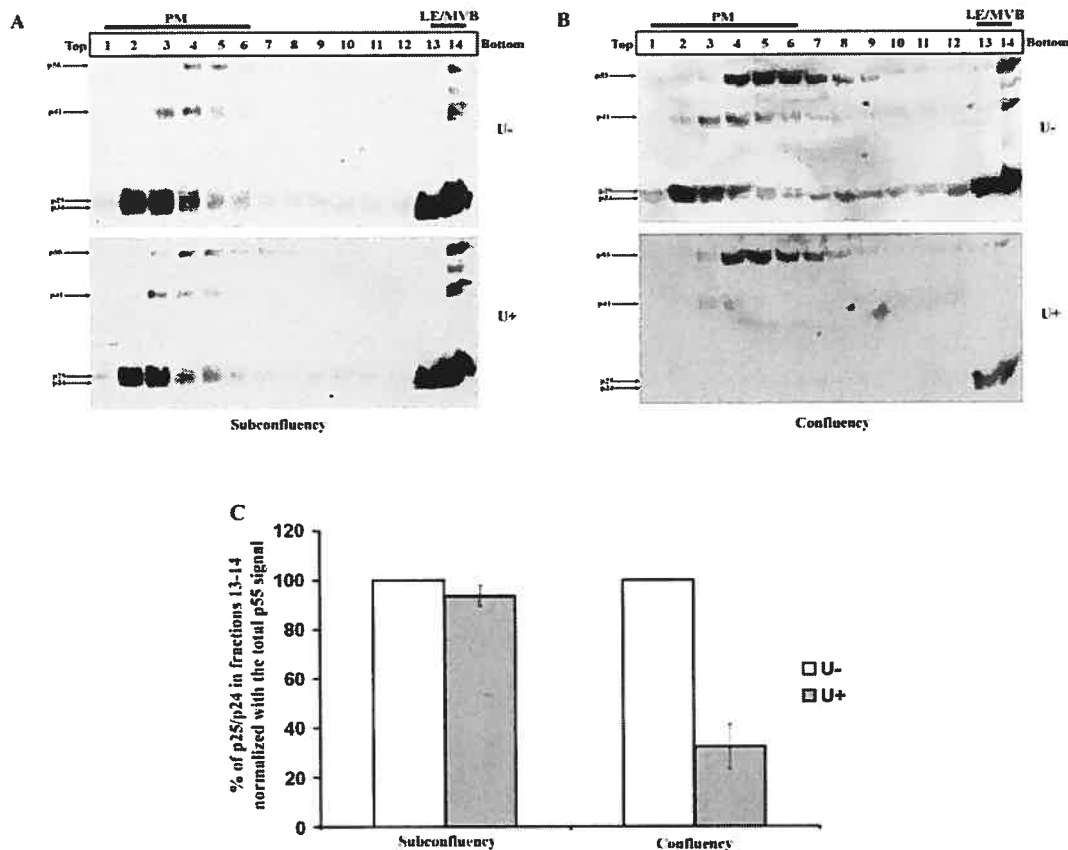


Figure 1. Vpu affecte la distribution intracellulaire de Gag dans les HEK293T à confluence. Les provirus HxBH10 et HxBH10 *vpu*- [375] ont été utilisés dans ces expériences : brièvement, les cellules HEK293T ont été cultivées à confluence (70-80%) ou sous-confluence (30%-40%) et transfectées avec la souche sauvage ou celle n'exprimant pas Vpu suite à une mutation au niveau de son codon d'initiation ATG selon les conditions précédemment évoquées [376]. 48h post-transfection, les cellules ont été récoltées et lysées mécaniquement dans un tampon osmotique avant d'être centrifugées à 1000g pour culoter les cellules non-lysées et les noyaux [377]. Le surnageant post-nucléaire (PNS) a ensuite été séparé sur colonne d'iodixanol (Optiprep) comme précédemment décrit [377]. Suite à la centrifugation, 14 fractions ont été collectées et la présence de Gag et ses produits de maturation a été analysée par immunobuvardage en utilisant un anticorps monoclonal anti-p24 comme décrit précédemment [378]. (A) Localisation intracellulaire de Gag dans les cellules HEK293T cultivées à sous-confluence en absence (U-) et en présence (U+) de Vpu. (B) Localisation intracellulaire de Gag dans les cellules HEK293T cultivées à confluence en absence (U-) et en présence (U+) de Vpu. Ces données sont représentatives de deux expériences indépendantes (n=2). (C) Quantification des formes matures (p25/p24) de Gag dans les fractions enrichies en CMV (LE/MVB ; fractions 13-14) en présence ou absence de Vpu selon la confluence des cellules HEK293T grâce au logiciel ImageQuant software 5.0. Les valeurs obtenues ont été normalisées en fonction du signal p55 et le signal normalisé obtenu en absence de Vpu est pris en référence.

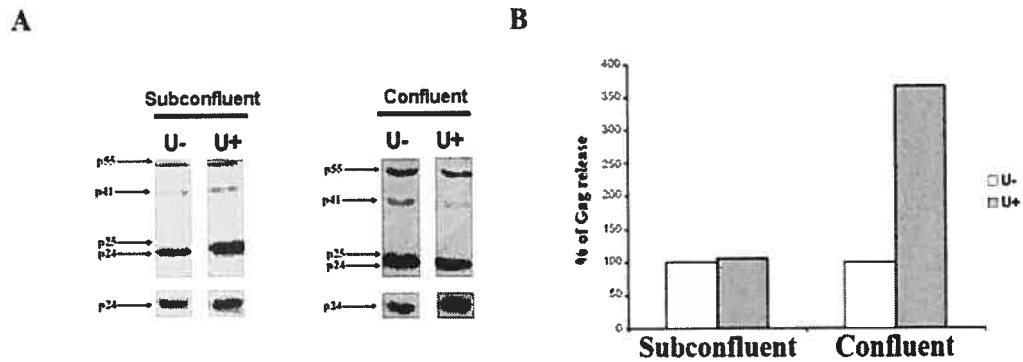


Figure 2. Vpu favorise la relâche de particules virales matures dans le milieu extracellulaire à confluence. Les provirus HxBH10 et HxBH10 *vpu*⁻ [375] ont été utilisés dans le même contexte que les expériences de la figure 1. Brièvement, le surnageant des cellules transfectées a été collecté et traité comme décrit précédemment [378] pour recueillir les particules virales relâchées. En outre une partie du lysat cellulaire obtenu après lyse mécanique dans un tampon osmotique a été traité dans du RIPA.DOC 1X [377]. La présence de Gag et ses produits de maturation dans les cellules (A partie supérieure) et le surnageant (A partie inférieure) a été analysée par immunobuvardage en utilisant un anticorps monoclonal anti-p24 comme décrit précédemment [378]. (A) Étude de la relâche en présence ou absence de Vpu selon la confluence des cellules HEK293T (sous-confluence vs confluence). (B) Quantification de l'efficacité de relâche dans ce contexte grâce au logiciel ImageQuant software 5.0. L'efficacité de relâche a été calculée selon la méthode décrite précédemment [263].

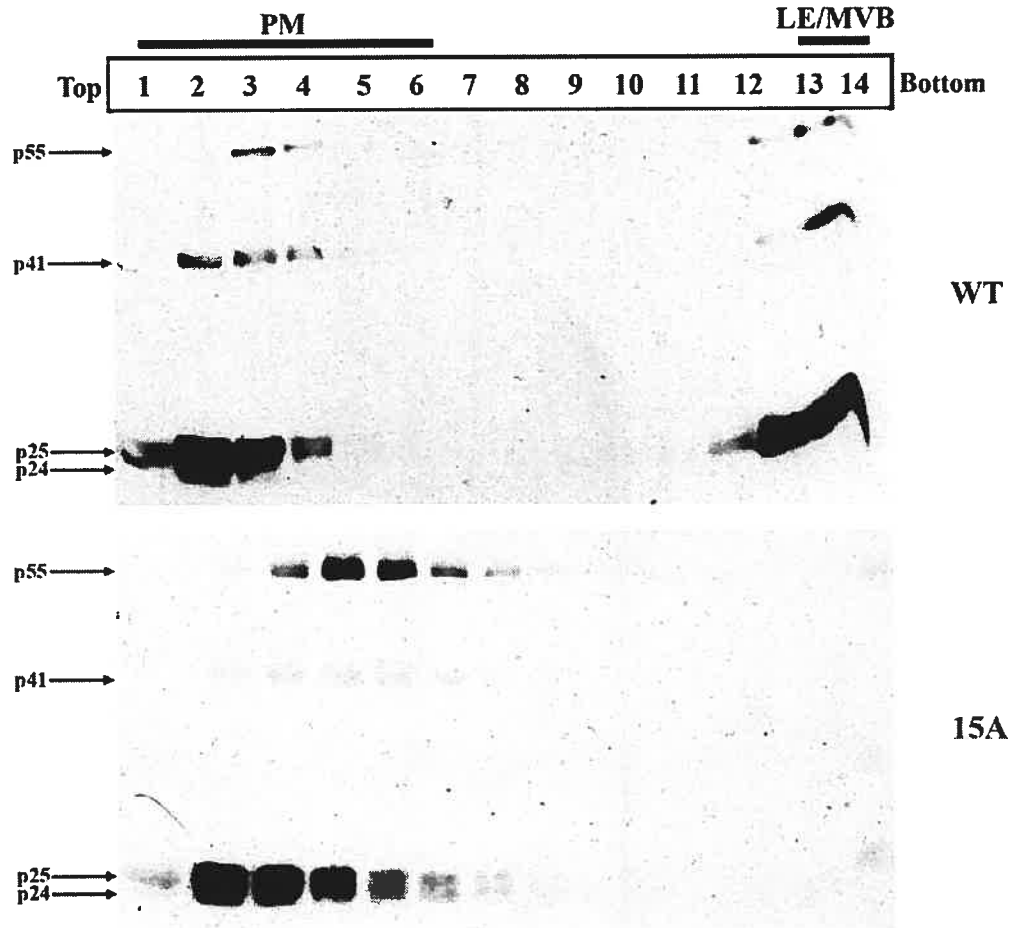


Figure 3. La multimérisation de Gag est nécessaire à sa localisation dans les CMV. Les provirus pNLSE HxBc2 et pNLHX15A ont été utilisés dans ces expériences : brièvement, les cellules HEK293T ont été transfectées selon les conditions précédemment évoquées [376], avec la souche sauvage (pNLSE HxBc2 noté WT) ou celle ne pouvant pas multimériser (pNLHX15A noté 15A) [374] suite à la substitution des résidus basiques par des alanines dans le domaine NC. 48h post-transfection, les cellules ont été récoltées et lysées mécaniquement dans un tampon osmotique avant d'être centrifugées à 1000g pour culoter les cellules non-lysées et les noyaux [377]. Le surnageant post-nucléaire (PNS) a ensuite été séparé sur colonne d'iodixanol (Optiprep) comme précédemment décrit [377]. Suite à la centrifugation, 14 fractions ont été collectées et la présence de Gag et ses produits de maturation a été analysée par immunobuvardage en utilisant un anticorps monoclonal anti-p24 comme décrit précédemment [378]. Localisation intracellulaire de Gag dans les cellules HEK293T en présence de la souche sauvage WT ou du mutant 15A. Ces données sont représentatives de deux expériences indépendantes (n=2).

Troisième Partie : Discussion et Conclusions

1. Discussion

L'objectif premier de notre étude était d'analyser le ciblage initial de la protéine Gag du VIH-1 et son trafic subséquent dans les cellules HEK293T : pour y parvenir, nous avons adapté une méthode de fractionnement cellulaire nous permettant de séparer efficacement la membrane plasmique des corps multivésiculaires (CMV), supposés être un intermédiaire important dans la formation des particules virales. Couplé à un marquage métabolique court et à une chasse, cette séparation nous a permis de suivre le mouvement intracellulaire de la protéine Gag nouvellement synthétisée. Par la suite, nous avons identifié certains déterminants importants pour la localisation intracellulaire de cette protéine dont le cholestérol, la multimérisation de Gag et l'efficacité de relâche des particules virales.

Tout d'abord, nous avons voulu vérifié que notre fractionnement séparait efficacement la membrane plasmique des CMV au niveau des cellules HEK293T dont la spécificité est de présenter une localisation de Gag dans ces deux compartiments. Contrairement à certaines études qui, via la surexpression de marqueurs *taggés*, vérifiaient la localisation des différents compartiments dans leur fractionnement cellulaire [1], nous avons préféré analyser la distribution de protéines endogènes connues pour se trouver dans les CMV telles que CD63, Lamp1 ou HLA-DR ainsi que de vérifier la présence de la membrane plasmique par biotinylation des protéines de surface, utilisation de ligands interagissant avec des protéines présentes à la surface cellulaire (transferrine biotinylée, CD4) ou détection de marqueurs endogènes (Na⁺-K⁺ ATPase, alcaline phosphatase). Nos données suggèrent fortement que la membrane plasmique migre exclusivement dans les fractions de faible densité (1-6). Les marqueurs des CMV se retrouvent, quant à eux, majoritairement dans les fractions de forte densité (13-14) : CD63, Lamp1 et HLA-DR se retrouvent cependant dans une certaine proportion au niveau des fractions 1 à 6. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces protéines peuvent transiter par la membrane plasmique avant d'atteindre leur destination finale. Elles ont par ailleurs été montrées comme localisant dans une certaine proportion au niveau de la membrane périphérique [2, 3]. Nous ne pouvons cependant pas exclure le fait que certaines organelles, lors de la lyse mécanique, soient endommagées pouvant résulter en la présence de certains marqueurs des CMV au niveau des fractions de faible densité. Pour exclure cette possibilité, nous avons analysé par microscopie électronique le contenu des fractions obtenues après séparation : l'analyse des

fractions 6-7 qui présentent à la fois des marqueurs de la membrane plasmique mais aussi CD63, Lamp1 et HLA-DR a mis en évidence des structures filamenteuses comparables à celles observées dans les fractions 2-3. Ces formes spécifiques obtenues ont été montré précédemment comme correspondant à la membrane plasmique [4], supportant l'idée que les marqueurs CD63, Lamp1 et HLA-DR présents dans les fractions de faible densité sont issus de la membrane plasmique. A l'opposé, les fractions 13-14 sont enrichies en structures multilamellaires et multivésiculaires, formes typiques des CMV. Ces données montrent que notre méthode de fractionnement sépare efficacement la membrane plasmique des CMV dans le contexte des cellules HEK293T. En outre, la distribution de Gag dans notre fractionnement cellulaire met en évidence une accumulation de produits matures dans les fractions de forte densité, corrélant avec la présence des structures multivésiculaires remplies de particules virales matures et présentant un cône central condensé observées par marquage aux billes d'or (*immunogold*). Or, les CMV sont connus pour être des compartiments d'accumulation de particules matures et infectieuses particulièrement au niveau des macrophages [4-7] : les CMV, remplis de virions migreraient donc dans les fractions 13-14. Finalement nous avons utilisé deux outils différents pour vérifier que notre technique de fractionnement était sensible à des modifications de la distribution intracellulaire de Gag. Dans un premier temps nous avons utilisé HLA-DR qui a été montré comme ayant la capacité de relocaliser Gag dans les CMV particulièrement sous forme mature p24 [8]. L'analyse de la distribution des formes p25/p24 de Gag a montré que deux à trois fois plus de formes matures se trouvent dans les fractions enrichies en CMV suite à l'expression de HLA-DR, corrélant avec les résultats obtenues précédemment [8]. Dans un second temps nous avons analysé la capacité de Vpu via sa modulation de la relâche virale d'affecter la distribution intracellulaire de Gag : les études précédentes ont montré que l'augmentation de la relâche virale par Vpu conduit à une réduction importante de la localisation intracellulaire de Gag, en particulier dans les CMV [9, 10]. De manière intéressante, dans des conditions où les cellules HEK293T sont sensibles à l'effet de Vpu, l'augmentation de la relâche virale conduit à une diminution significative de la présence de produits matures dans les fractions enrichies en CMV (13-14) confirmant les observations faites précédemment [9, 10]. Toutes ces données soutiennent donc que notre fractionnement sépare efficacement la membrane plasmique des CMV au niveau des cellules HEK293T. Cette technique biochimique

nous a donc permis d'analyser quantitativement le mouvement et la distribution de Gag : nous avons suivi le mouvement de la protéine Gag nouvellement synthétisée dans un contexte proviral pour nous approcher le plus fidèlement possible des conditions physiologiques dans lesquelles évolue le virus puisqu'il a été montré que l'utilisation d'expresseurs de Gag optimisés ne dépendait pas de la machinerie virale d'exportation nucléaire d'ARN (Rev-indépendant) ou de protéines fusionnées en C-terminale pouvait affecter le mouvement et la distribution intracellulaire de Gag [9, 11-13].

L'analyse du ciblage initial de Gag par marquage métabolique et de son trafic intracellulaire par chasse couplé au fractionnement cellulaire a montré que la protéine virale est ciblée précocement et majoritairement dans les fractions de faible densité (1-6), suggérant que la membrane plasmique est le site initial de ciblage de Gag. Par ailleurs, le nocodazole, drogue connue pour inhiber la polymérisation des microtubules nécessaires au mouvement des compartiments intracellulaires tels que les CMV ou encore les vésicules issues du TGN [288,399], n'a aucun effet sur la distribution de la protéine Gag nouvellement synthétisée dans notre fractionnement cellulaire, excluant un potentiel transit de Gag par le TGN ou les CMV avant d'atteindre la membrane plasmique (Finzi A., communication personnelle). Bien que le précurseur Pr55^{Gag} et ses produits de maturation soient présents dans les fractions 13-14 à des temps précoces, suggérant que Gag pourrait être ciblé de manière concomitante dans les CMV, l'altération du cholestérol au niveau de la membrane plasmique montre qu'une proportion significative de Gag présent initialement dans les CMV résulterait davantage d'un processus d'internalisation rapide. Nous ne pouvons cependant pas exclure que certains compartiments tels le TGN. En outre, la quantité de Gag dans les cellules HEK293T présente initialement dans les fractions enrichies en membrane plasmique (1-6) diminue au cours du temps, corrélant avec l'apparition de particules virales dans le surnageant. Par contre, de manière intéressante le signal global de Gag se retrouvant dans les fractions 13-14 augmente fortement au cours du temps, particulièrement après deux heures de chasse, sous forme p24 suggérant que l'accumulation de Gag dans les CMV résulterait d'un processus d'internalisation. Ainsi, Gag serait ciblé majoritairement vers la membrane plasmique où il est relâché sous formes de particules virales alors que les CMV seraient avant tout un réservoir de produits matures issus d'un processus

d'internalisation de la membrane plasmique. Les CMV ne joueraient donc pas un rôle d'intermédiaire dans le ciblage et le mouvement de Gag dans la cellule comme proposées par certains groupes suite à l'observation par microscopie électronique et à fluorescence de la présence de Gag dans ces compartiments intracellulaires [5-7, 14-18]. Gag visualisé dans un contexte statique et non dynamique a été montré comme s'accumulant dans les CMV. Or, l'analyse statique de la distribution intracellulaire de Gag ne peut nous éclairer sur la voie utilisée par celle-ci pour atteindre les CMV. Seul le suivi du mouvement des protéines virales nouvellement synthétisées peut nous permettre de comprendre comment Gag se retrouve finalement à la fois à la membrane plasmique mais aussi dans les CMV dans un certain nombre de types cellulaires dont les cellules HEK293T. Seuls deux travaux effectués précédemment, soit grâce à un fractionnement cellulaire soit par imagerie, ont montré que les CMV pouvaient jouer le rôle d'intermédiaire dans le ciblage et le mouvement intracellulaire de Gag [1, 19]. Perlman et coll. ont mis en évidence par l'utilisation de dérivés fluorescents que les molécules de Gag nouvellement synthétisées localisaient initialement dans des structures périnucléaires avant de se retrouver dans les CMV [19]. Les auteurs sont cependant limités techniquement par la méthode de FIAsh/ReFIAsh utilisée pour visualiser les molécules de Gag nouvellement formées puisque celle-ci ne peut se faire que 2 à 4h après traitement aux dérivés fluorescents, posant le problème d'un suivi précis de la protéine Gag nouvellement synthétisée. De manière intéressante, dans notre fractionnement cellulaire, après deux heures de chasse nous observons que la majorité de Gag se retrouve dans les CMV par un phénomène d'internalisation et non suite à un ciblage direct. Ainsi les différences entre les données de Perlman et coll. et nos résultats seraient principalement liées à l'impossibilité de visualiser en temps réel le mouvement des molécules de Gag nouvellement synthétisées par FIAsh/ReAsH. Dans le cas des conclusions tirées par Grigorov et coll. grâce à leur fractionnement cellulaire, certaines données suggèrent que leur séparation des différentes organelles est en partie inexacte: par exemple, Env a été montré comme localisant de manière prédominante au niveau du TGN dans les cellules HeLa [20] mais en partie aussi au niveau du RE. Or, dans leur fractionnement cellulaire, Env sous la forme du précurseur ou sous la forme TMgp41 se trouve majoritairement dans des fractions enrichies en CMV. Par ailleurs, Gag dans les cellules HEK293T est connu pour localiser majoritairement à la membrane plasmique: dans leur cas, Gag ne se retrouve à aucun moment à la membrane

plasmique. Toutes ces observations remettent en question la validité de l'outil de fractionnement utilisée dans leur étude [1]. En outre, l'identification des CMV comme intermédiaire dans l'assemblage des particules virales implique que le recrutement de ces compartiments par stimulation vers la membrane plasmique doit modifier la distribution intracellulaire de Gag. Pour vérifier cette hypothèse, ces deux études ont stimulé l'exocytose des CMV par modification des niveaux de calcium entrant [21]: après traitement à l'ionomycine, une molécule fixant le calcium, les auteurs observent une augmentation de la relâche de particules virales [1, 19]. De manière surprenante, les niveaux intracellulaires de Gag ne sont pas affectés par ce traitement. Or, si les CMV sont l'intermédiaire central de l'assemblage des particules virales et surtout si les CMV sont le site initial de ciblage du précurseur Pr55^{Gag}, la libération dans le surnageant de leur contenu devrait modifier drastiquement les niveaux intracellulaires de Gag. Ainsi, ces données suggèrent que le ciblage initial de Gag dans les CMV est tel que le recrutement de ces compartiments à la membrane plasmique ne modifie pas ses niveaux intracellulaires.

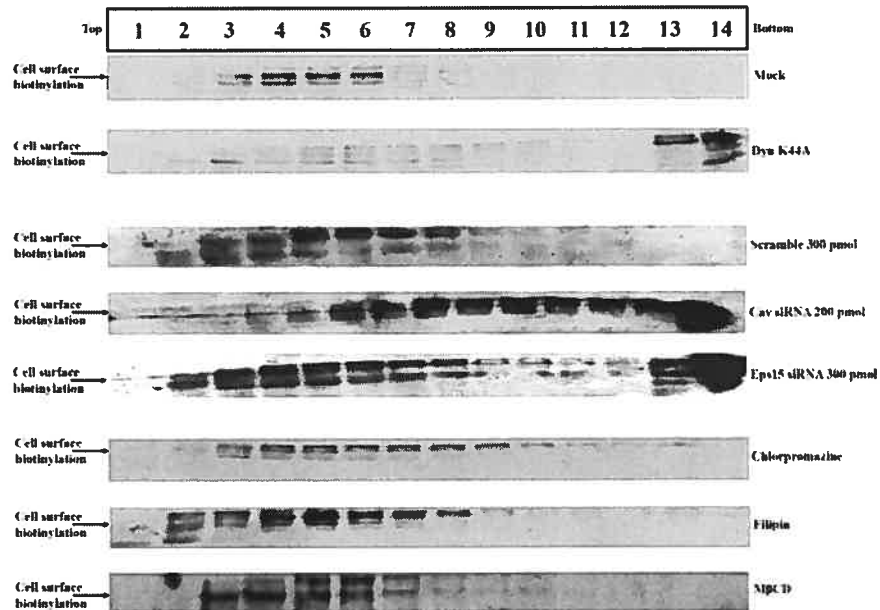
Nos données sont au contraire en accord avec certains travaux montrant un ciblage préférentiel de Gag vers la membrane plasmique, lieu central de l'assemblage et de la formation de particules virales matures. Il a été montré précédemment que le précurseur Pr55^{Gag} dans un contexte proviral ou d'une construction fusionnée à Gag se retrouve majoritairement à la membrane plasmique dans les étapes subséquentes à sa synthèse [9, 10, 12, 22]. Par ailleurs, l'accumulation importante de produits matures dans les fractions enrichies en CMV observée après deux heures de chasse suggère fortement que la présence de Gag dans les CMV résulte davantage d'un phénomène d'internalisation, en accord avec des travaux précédents montrant que des mutants transdominants négatifs de la dynamine (DynK44A) ou d'Eps15 (Eps15 Δ 95/295) empêchent Gag-CFP/GFP de se retrouver dans les CMV [10, 22]. C'est pourquoi il nous parut important d'identifier les voies endocytaires impliquées dans la localisation de Gag dans les CMV par fractionnement cellulaire. Malheureusement, l'utilisation de ces mutants, particulièrement la dynamine K44A, modifie drastiquement les propriétés de la membrane plasmique (Figure 1): dans ces conditions nous ne sommes plus capables de séparer la membrane plasmique des CMV et donc d'analyser l'importance des voies endocytaires dans le trafic de Gag. De même, l'emploi de siRNA ciblant la cavéoline-1 ou Eps15, connus pour inhiber

les voies endocytaires caveoline/radeaux lipidiques et clathrine dépendants respectivement, modifie trop fortement et durablement les voies d'internalisation, conduisant à une altération des propriétés de migration de la membrane plasmique dans notre fractionnement cellulaire (Figure 1). C'est pourquoi nous avons du opter pour un traitement bref, capable d'affecter rapidement et efficacement les voies d'internalisation cellulaires : pour cela, certaines drogues affectant la distribution de la clathrine (chlorpromazine) ou du cholestérol (filipin, M β CD) ont été utilisées pour vérifier la contribution des voies endocytaires dans la localisation intracellulaire de Gag. Nos données montrent que l'inhibition par la filipin des voies dépendant de la clathrine et cavéoline diminue fortement la localisation de produits matures dans les fractions 13-14 après deux heures de chasse, supportant l'idée que Gag est internalisé par la membrane plasmique pour se retrouver dans des compartiments intracellulaires tels que les CMV. Parallèlement, la filipin affecte les niveaux de Pr55^{Gag} au temps initial dans les fractions de forte densité (13-14), suggérant que deux processus différents d'internalisation vers les CMV ont lieu : l'un très rapide (10 min après le marquage) et l'autre atteignant son paroxysme deux heures post-marquage. Ces processus semblent cependant être insensibles à la chlorpromazine, suggérant que la voie d'endocytose clathrine-dépendante joue un rôle mineur dans l'internalisation de Gag vers les CMV dans nos conditions expérimentales. Ces résultats contrastent avec les données obtenues avec une construction Gag-CFP/GFP [10, 22], montrant qu'un transdominant négatif d'Eps15 est capable d'empêcher la présence de Gag dans les CMV. Or, plusieurs facteurs peuvent moduler la localisation intracellulaire dont la protéine fusionnée à Gag : elle peut influencer directement la localisation intracellulaire de Gag et sa capacité à être ou non internalisé. Alors qu'une construction Gag-FLAG peut être internalisée dans les cellules HeLa, une construction Gag-HA ne peut l'être [9]. De même une construction Gag-LTC a été montrée comme localisant de manière plus importante dans des compartiments intracellulaires apparentés à des CMV comparée à une construction Gag-TC, suggérant que la protéine de fusion utilisée peut grandement affecter la distribution intracellulaire de Gag et son trafic dans la cellule [12]. Par ailleurs, plusieurs travaux ont montré que l'altération de la machinerie d'export des ARN viraux, en particulier Rev, affecte le mouvement de Gag vers les membranes et l'assemblage des particules virales [11, 23]. Ayant fait le choix de suivre le mouvement de Gag dans un contexte proviral, nous nous approchons le plus possible des conditions physiologiques dans

lesquelles Gag évolue normalement et ne sommes donc pas limités dans notre interprétation par la construction de Gag utilisée. Nos données sont, de manière intéressante, en concordance avec des travaux récents montrant que Pr55^{Gag} issue d'une construction provirale est internalisé via un processus cholestérol-dépendant mais insensible à la déplétion des niveaux intracellulaires de clathrine par utilisation de siRNA ciblant cette protéine (Suomalainen M., Université d'Helsinki, Finlande, communication personnelle). Nos résultats soulignent, dans nos conditions expérimentales, le rôle central du cholestérol dans la localisation intracellulaire de Gag. Il a été précédemment montré que le cholestérol est un élément essentiel des radeaux lipidiques et est impliqué dans la formation des cavéoles [24]. L'altération du cholestérol à la membrane plasmique conduit à une perte d'intégrité des radeaux lipidiques. Certaines données ont démontré par ailleurs que le cholestérol est important pour l'organisation des TEM et l'interaction entre les tétraspanines, suggérant que le cholestérol pourrait affecter les deux principales plateformes d'assemblage identifiées du VIH-1. Enfin, le cholestérol a été montré comme étant essentiel à la formation de particules virales et à l'infectivité de celles-ci [25-28]. Il a en outre une fonction directe sur Gag puisqu'il favorise la motilité intracellulaire de cette protéine virale, ceci suggérant que le cholestérol pourrait promouvoir les interactions entre molécules de Gag nécessaires à l'initiation de l'assemblage des particules virales [29]. En concordance avec d'autres travaux [10, 22], nos travaux montrent que l'internalisation de Gag vers les CMV se fait majoritairement sinon exclusivement sous forme de particules matures. La déplétion en cholestérol au niveau de la membrane plasmique ou sa séquestration pourrait donc affecter des étapes pré-formation de la particule virale bien que le traitement à la filipin ou la M β CD n'affecte pas l'association de Gag aux membranes, d'où un effet potentiellement indirect des drogues sur la localisation intracellulaire de Gag. L'incapacité de former des particules virales matures serait alors la cause de l'absence de localisation de Gag dans les CMV plutôt que l'inhibition des voies d'internalisation suite à la déplétion ou la séquestration du cholestérol. Dans nos conditions expérimentales, la relâche virale en présence de M β CD ou filipin est diminuée (Finzi A., communication personnelle). Cependant, la réduction observée est telle (40%) qu'elle ne peut expliquer à elle seule la disparition de plus de 70% des formes matures dans les CMV, suggérant que l'effet observé en présence de la M β CD et la filipin est avant tout du à l'inhibition des voies d'endocytoses. Ainsi, le

cholestérol jouerait un rôle central dans le processus même d'internalisation de Gag vers les CMV. Il sera malgré tout important d'identifier plus précisément la contribution de la voie d'internalisation cavéoline/radeaux lipidiques-dépendant dans la localisation intracellulaire de Gag : la séquestration ou la déplétion en cholestérol affectant de nombreuses étapes du cycle de réplication du virus, l'utilisation de siRNA contre la cavéoline-1 ou syntaxine 6, protéines importantes pour cette voie d'endocytose [30], devrait être privilégiée pour identifier spécifiquement son rôle dans le trafic de Gag. Ceci pourrait notamment se faire par microscopie à fluorescence en analysant l'évolution de la localisation de Gag dans le temps dans un contexte proviral pour éviter d'influencer l'une ou l'autre voie d'endocytose par la présence d'une protéine de fusion. Plusieurs évidences tendent à supporter que la voie cavéoline-dépendante joue un rôle dans l'internalisation de particules matures, particulièrement le fait que le domaine transmembranaire d'Env (TMgp41) a la capacité d'interagir avec la cavéoline-1 [31, 32].

A.



B.

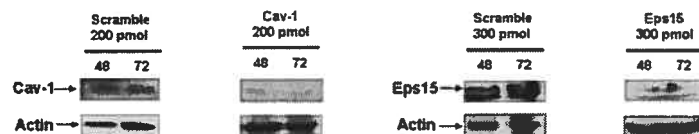


Figure 1. Analyse de la migration de la membrane plasmique dans un contexte d'altération des voies endocytaires. Le provirus HxBc2 [33] a été utilisé dans ces expériences : brièvement, les cellules HEK293T ont été transfectées selon les conditions précédemment évoquées [34] dans le cas des cellules Mock, DynK44A et des cellules traitées aux différentes drogues. La construction pBK-HA DynK44A a été gentiment fournie par le Dr J.P. Gratton, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, (IRCM, Montréal, Canada). Dans le cas des siRNA, 5 millions de cellules HEK293T ont été transfectées avec 200/300 pmol de siRNA non spécifiques (Scramble), de siRNA ciblant la cavéoline 1 ou Eps15 et avec la construction HxBc2 par Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Burlington ON) selon les conditions recommandées par la compagnie. 48h post-transfection, les cellules ont été récoltées et traitées selon les conditions décrites précédemment [35] : dans le cas des drogues, les cellules ont été prétraitées pendant 30 min dans les mêmes conditions que décrites précédemment [35] pour reproduire les conditions expérimentales dans lesquelles ont été fait le marquage et l'analyse du trafic de Gag. Les protéines de surface ont été biotinylées pour détecter la présence de la membrane plasmique. Par la suite, les cellules ont été lysées mécaniquement dans un tampon osmotique avant d'être centrifugées à 1000g pour culoter les cellules non-lysées et les noyaux [35]. Le surnageant post-nucléaire (PNS) a ensuite été séparé sur colonne d'iodixanol (Optiprep) comme précédemment décrit [35]. Suite à la centrifugation, 14 fractions ont été collectées et la présence des protéines biotinylées a été analysée par immunobuvardage en utilisant un conjugué peroxydase couplé à la streptavidine [35]. (A) Détection de la membrane plasmique par biotinylation des protéines de surface lorsque les voies endocytaires sont inhibées. (B) Analyse des niveaux en cavéoline-1 et en Eps15 des cellules traitées par siRNA. Une partie des cellules traitées aux siRNA a été lysée dans du RIPA.DOC 1X [35] et la détection des niveaux intracellulaires de Cav-1 et d'Eps15 a été vérifiée par immunobuvardage en utilisant un anticorps polyclonal de lapin anti Cav-1 (N-20, IgG, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) ou un anticorps polyclonal de lapin anti Eps-15 (C-20, IgG, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Les niveaux d'actine ont été vérifiés grâce à un anticorps polyclonal de lapin anti-actine (A2066, SIGMA, St Louis, Missouri).

De manière intéressante, un autre facteur influençant la localisation du VIH-1 dans les CMV est la multimérisation des molécules Gag : il a été montré précédemment par immunofluorescence qu'un mutant de Gag perdant sa capacité à multimériser ne forme plus de structures ponctuelles dans le cytosol [36]. Or, dans notre fractionnement cellulaire, ce défaut de multimérisation corrèle avec une absence de la protéine virale dans les fractions enrichies en CMV, suggérant que la multimérisation des molécules de Gag est une étape nécessaire à la localisation du VIH-1 dans les CMV, via un processus d'endocytose. L'effet de la multimérisation de Gag sur sa localisation dans les CMV pourrait cependant être un effet indirect : tout comme dans le cas des drogues, l'altération de la multimérisation de Gag est

connue pour réduire la relâche virale [37] et l'absence de particules matures pourraient résulter en l'impossibilité d'internaliser Gag. Plusieurs protéines sont connus pour leur dépendance à une étape de multimérisation précédant leur internalisation : par exemple la synaptotagmine, protéine de régulation des phénomènes d'exocytose et d'endocytose des vésicules synaptiques, a été montrée comme subissant une étape de multimérisation, favorisant l'exposition d'un motif d'interaction avec AP-2 et conduisant alors à son endocytose subséquente [38]. Dans le cas du VIH-1, Batonick et coll. ont notamment montré que l'altération de l'interaction entre AP-2 et Gag conduit à une augmentation de la relâche virale [39], suggérant que la protéine adaptatrice pourrait séquestrer une partie du précurseur viral et affecter la quantité de virions relâchés dans le surnageant. On ne peut cependant pas exclure que l'effet observé au niveau de la relâche virale soit lié à l'altération de l'interaction entre AP-2 et Env. Malgré tout, l'interaction Gag-AP-2 pourrait expliquer la présence rapide de Pr55^{Gag} dans les CMV, processus plus rapide que l'internalisation de produits matures puisqu'il nécessite au plus 30 min comparé aux 2h nécessaires pour observer une importante quantité de formes matures dans les fractions enrichies en CMV. Ce processus pourrait être modulé par la confluence des cellules puisque des données récentes montrent que, dans des conditions de sous-confluence, Gag est très rapidement présent dans des compartiments intracellulaires suggérant que la protéine virale peut être internalisée via un processus d'endocytose très rapide (Suomalainen M., Université d'Helsinki, Finlande, communication personnelle). Bien que les mécanismes impliqués dans ce phénomène d'internalisation rapide ne soient pas connus, ces observations suggèrent que la confluence des cellules pourrait moduler la voie d'internalisation utilisée par Gag pour se retrouver dans les CMV. La multimérisation de Gag pourrait alors favoriser une meilleure interaction avec AP-2 et permettre l'internalisation rapide du précurseur Pr55^{Gag} dans les CMV. De manière intéressante, le traitement à la chlorpromazine est connu pour affecter non seulement la localisation intracellulaire de la clathrine mais aussi la distribution d'AP-2 : la protéine adaptatrice se retrouve dans le cytosol avant d'être redistribué au niveau d'endosomes [40]. AP-2 pourrait dans ce contexte conserver sa capacité d'interagir avec le précurseur Pr55^{Gag} dans le cytoplasme et le rediriger vers les CMV, contribuant ainsi à maintenir en partie Gag dans les CMV. La détermination des mécanismes impliqués dans ce processus d'internalisation rapide de Gag reste une question importante à étudier. À la vue de

nos résultats, la voie clathrine-dépendante ne semble cependant pas jouer un rôle significatif dans l'internalisation de produits matures dans les CMV puisque son inhibition ne modifie pas drastiquement la présence de Gag dans les CMV. Elle pourrait cependant être impliquée dans le processus d'internalisation du précurseur Pr55^{Gag}, en liant la polyprotéine ancrée à la membrane plasmique mais de manière réduite dans nos conditions expérimentales.

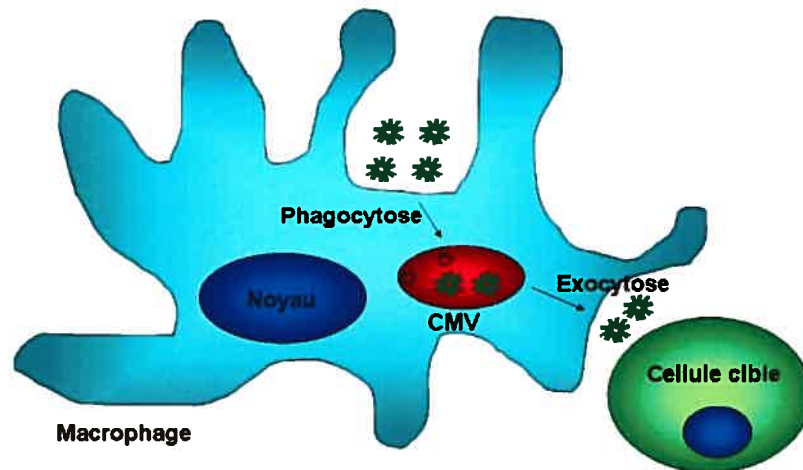
La modulation de l'efficacité de relâche virale via Vpu affecte elle-aussi la localisation de Gag dans les CMV : nos travaux en accord avec d'autres études faites par immunofluorescence et fractionnement cellulaire montrent que dans un système sensible à Vpu, l'augmentation de la relâche virale corrèle avec une diminution significative de la présence de Gag dans des compartiments intracellulaires [9, 10]. Dans nos conditions, une augmentation de la relâche virale de plus de 3 fois conduit à une réduction de près de 4 fois de la présence de produits matures dans les fractions enrichies en CMV en plus de réduire la présence de p25/p24 à la membrane plasmique. Ce processus d'internalisation de Gag de la membrane plasmique vers les structures intracellulaires requiert la présence de Tsg101 mais aussi un domaine p6 fonctionnel supportant l'idée que Gag est relâché sous forme mature avant d'être internalisée [9]. Plusieurs données suggèrent qu'en absence de Vpu, ces particules relâchées seraient retenues à la membrane plasmique formant des amas observables par microscopie électronique [41] et corrélant avec la présence de produits matures dans les fractions de faible densité dans notre fractionnement. Ce phénotype serait en fait du à un facteur de restriction cellulaire dominant [42]. L'étude des cellules simiennes Cos-7 non répondeuses à l'effet de Vpu au niveau de la relâche de virions et des cellules humaines HeLa sensibles à la protéine accessoire a montré que la fusion de ces deux types cellulaires conduit au maintien de la restriction. L'expression de Vpu ne permet pas de stimuler la libération de particules virales dans ces hétérocaryons, suggérant que Vpu n'est capable de surmonter ce bloc que dans un contexte humain [42]. Neil et coll. ont par ailleurs montré qu'en absence de Vpu, un traitement à la subtilisine, une sérine endopeptidase, permet la libération des particules virales attachées à la membrane plasmique, impliquant que ce facteur de restriction aurait des propriétés adhésives favorisant la rétention de virions à la membrane plasmique et par la suite son internalisation vers les CMV [10]. De manière intéressante, dans les cellules HEK293T du moins, l'effet de Vpu sur la

relâche est dépendant du cycle cellulaire : Deora et coll. ont mis en évidence que les cellules HEK293T à confluence ont la capacité de relâcher 5 fois plus de particules virales en présence de Vpu. Ceci serait dû à l'arrêt du cycle cellulaire induit par l'inhibition de contact puisque l'utilisation de drogues bloquant les cellules HEK293T en phase G1 ou G2 produit le même effet sur la relâche de particules virales [43]. Ainsi la prolifération cellulaire jouerait un rôle important dans les fonctions de Vpu sur la libération de particules virales dans les cellules HEK293T. Or, la protéine accessoire Vpr est connue pour sa capacité à moduler la progression des cellules infectées dans le cycle cellulaire : elle a été montrée comme bloquant les cellules en phase G2. Ainsi l'arrêt de cycle induit par Vpr est considéré comme favorisant la progression dans le cycle de réplication du virus et permettrait d'augmenter la production de particules virales [44]. On peut donc supposer que les protéines accessoires Vpr et Vpu pourraient agir de concert pour faciliter la production et la relâche de particules virales dans le surnageant, permettant ainsi une meilleure propagation du virus dans l'organisme. Ainsi Vpr pourrait via son arrêt du cycle cellulaire moduler les fonctions de Vpu sur la relâche résultant en une augmentation de la libération de virions mais aussi en empêchant l'internalisation de celles-ci. Il apparaît donc important de vérifier si les protéines accessoires Vpu et Vpr n'agiraient pas de concert, dans certains types cellulaires dont les cellules HEK 293T, pour favoriser la production et la relâche de particules virales.

Dans des conditions physiologiques, de nombreux facteurs peuvent moduler la présence de Gag et de particules matures dans les CMV. La capacité d'endocytose/phagocytose des cellules infectées ou disséminatrices est un élément central de cette présence intracellulaire de Gag. Très récemment, Jouvenet et coll. ont montré que la localisation de Gag dans les CMV au niveau des macrophages résulte d'un processus de phagocytose des particules virales matures (Jouvenet 2006; Figure 2). Ainsi, la présence de Gag dans les CMV au niveau des macrophages serait le résultat d'un processus d'internalisation contrairement aux conclusions qui avaient été tirés précédemment à partir d'analyse par microscopie électronique et à fluorescence [5-7, 17] supposant que Gag est directement ciblé dans ces compartiments intracellulaires. De manière intéressante, les macrophages sont connus pour constituer un réservoir lors de la pathogénèse du VIH-1. En outre, ce type cellulaire est plus résistant aux effets cytopathiques du virus que ne le sont les

lymphocytes T par exemple (Kedzierska 2003), d'où une persistance plus importante des macrophages infectés dans l'organisme. Le virus se trouvant dans les CMV au niveau des macrophages reste infectieux [5, 6, 45] et peut être transmis aux cellules T pendant une période très longue [45], suggérant que le maintien de ces importants stocks intracellulaires pourraient permettre la dissémination du VIH-1 à travers l'organisme. En effet, les CMV font partie intégrantes d'une voie sécrétoire connue pour la libération d'exosomes dans le surnageant suite au recrutement de ces compartiments intracellulaires à la membrane plasmique. Le mouvement de ces compartiments vers la membrane plasmique requiert un signal de mobilisation (e.g. reconnaissance antigénique, stimulation calcique) : il apparaît donc critique d'étudier le trafic de Gag dans les macrophages et les lymphocytes T dans un environnement reproduisant les conditions physiologiques dans lesquelles le virus évolue. De nombreuses données suggèrent que le recrutement des CMV peut se faire au niveau de la formation d'une synapse immunologique entre deux cellules du système immunitaire, permettant alors la transmission du virus de cellule à cellule par la formation d'une synapse virologique ([45-48]; Figure 2). Cependant, des travaux récents suggèrent que dans le contexte des cellules dendritiques, connues pour former elles aussi des réservoirs intracellulaires de particules virales infectieuses, la majeure partie du virus transmis par contact cellule-cellule se fait grâce à un transfert de particules virales restées associées à la surface cellulaire et non du fait du recrutement des compartiments intracellulaires vers la synapse immunologique ([49]; Figure 2). Dans le contexte d'une présentation antigénique, la proportion de virus transmis en *trans*, par recrutement des CMV, est augmentée mais reste mineure [49]. Des études plus approfondies sont nécessaires pour mieux évaluer l'importance pour le VIH-1 de constituer ces réservoirs intracellulaires. L'une des hypothèses postulées est que la relocalisation de Gag dans les CMV favoriserait une évasion immunitaire, le virus étant protégé dans ces réservoirs d'une quelconque reconnaissance par des cellules du système immunitaire ou par les mécanismes de neutralisation développés par la réponse humorale (anticorps neutralisants). Ainsi l'accumulation de particules virales matures dans les CMV pourrait être un moyen pour le VIH-1 de persister dans l'organisme en se cachant du système immunitaire. La compréhension de ces mécanismes d'évasion du VIH-1 reste central pour le développement de traitements antirétroviraux et de vaccins.

A.



B.

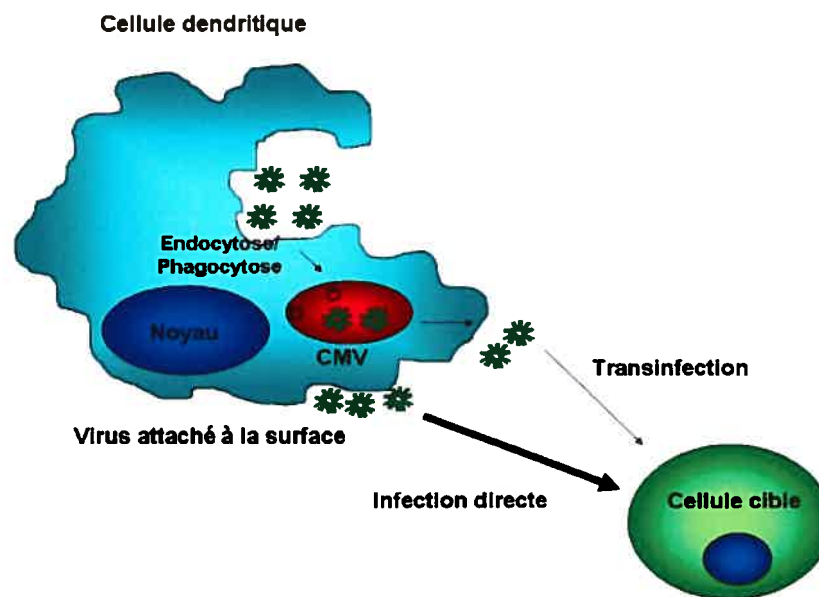


Figure 2. Internalisation et transmission de particules virales des macrophages et des cellules dendritiques vers une cellule cible. Alors que les macrophages et les cellules dendritiques peuvent endocytoser/phagocyter une proportion importante de particules virales matures pour constituer des réservoirs intracellulaires (A/B), la transmission de virus des cellules dendritiques vers une cellule cible semble résulter majoritairement de la présence de particules virales à la surface de ces cellules plutôt que par un phénomène de *transinfection* (B).

2. Perspectives et conclusions

L'analyse du ciblage initial de la protéine Gag du VIH-1 ainsi que son trafic subséquent dans les cellules HEK293T a permis de mettre en évidence le rôle central de la membrane plasmique dans l'initiation de l'assemblage des particules virales et la localisation ultérieure de Gag dans des compartiments intracellulaires, particulièrement les corps multivésiculaires. Nos données montrent que les molécules de Gag nouvellement synthétisées se retrouvent majoritairement à des temps précoces à la membrane plasmique où elles forment des particules virales matures qui sont relâchées dans le milieu extracellulaire (Figure 3). Parallèlement, bien que nous ne puissions exclure un ciblage initial mineur de Gag qui aurait lieu de manière concomitante vers les CMV, nos travaux montrent clairement que la majeure partie de Gag se retrouvant dans les compartiments intracellulaires est issue d'un processus d'internalisation de la membrane plasmique. Ce phénomène, insensible à la chlorpromazine, nécessite la présence du cholestérol à la membrane plasmique. L'endocytose de Gag requiert deux mécanismes centraux dans l'assemblage des particules virales : la multimérisation fonctionnelle des molécules de Gag en plus d'un défaut de relâche des virions (Figure 3).

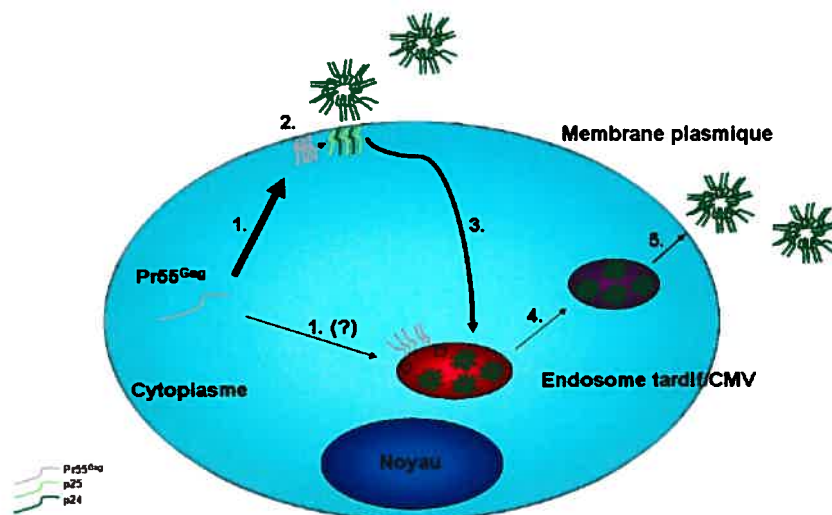
Notre étude ouvre la voie à l'analyse du ciblage initial et du trafic de Gag dans un contexte plus physiologique, c'est-à-dire dans les macrophages et les lymphocytes T. Nos résultats favorisent le concept d'un rôle central de la membrane plasmique dans l'initiation de l'assemblage des particules virales et leur libération subséquente au niveau des cellules du système immunitaire, cibles du VIH-1. Bien que nous ne puissions exclure que certains facteurs type-cellulaire dépendants puissent affecter le trafic de la protéine Gag dans les macrophages et les lymphocytes T, certains travaux dont ceux de Jouvenet et coll. suggèrent fortement que la localisation de Gag dans les CMV résulteraient d'un phénomène de phagocytose au niveau des macrophages [22]. L'importance de ces stocks intracellulaires de particules matures reste un point critique de la compréhension du trafic de Gag : quelles raisons poussent le VIH-1 à constituer de telles réserves intracellulaires, particulièrement dans les macrophages qui supportent mieux les effets cytopathiques du virus et survivent très longtemps dans l'organisme en comparaison des lymphocytes T ? En exploitant cette niche, le virus serait-il capable d'établir les bases d'une persistance dans l'organisme ? Cette accumulation dans les CMV est-elle véritablement un mécanisme d'évasion du

système immunitaire ? Le fait de s'accumuler dans le compartiment d'assemblage des molécules du CMH-II fonctionnels et de chargement de peptides antigéniques pourrait-il permettre au VIH-1 de manipuler les molécules présentées au système immunitaire et ainsi influencer sa réponse ? Ces questions sont cruciales pour une meilleure compréhension des mécanismes de réplication du VIH, d'installation de la persistance virale et des étapes de la pathogénèse de ce rétrovirus. La localisation de particules virales matures dans les CMV pose aussi la question de l'efficacité des traitements antirétroviraux actuels. Elles ouvrent la porte à la définition de nouvelles stratégies pour lutter contre la propagation dans l'organisme du VIH-1

Notre étude tend aussi à mieux définir le ou les processus d'internalisation impliqués dans la localisation intracellulaire de Gag. Le rôle central du cholestérol dans l'organisation des plateformes d'assemblage de Gag, dans les différentes étapes de formation des particules virales ainsi que dans l'internalisation du VIH-1 vers les CMV, suggèrent que ce constituant cellulaire est non seulement essentiel dans la sortie du virus mais aussi dans la formation de ces réservoirs intracellulaires. De manière intéressante, plusieurs études cliniques ont montré que les niveaux de cholestérol pouvaient être un facteur de risque dans la séroconversion d'un patient : l'étude d'une cohorte de jeunes hommes célibataires ayant des antécédents de maladies sexuellement transmissibles ou de problèmes rénaux a montré que les personnes ayant des niveaux sanguins faibles en cholestérol avaient deux fois plus de chance d'être infecté que des hommes ayant des niveaux élevés de cholestérol [395]. Par ailleurs, certains travaux ont montré que les patients ayant un niveau faible en cholestérol avaient quatre fois plus de chance de mourir du SIDA que les personnes ayant des niveaux plus élevés en cholestérol [396]. En quoi des niveaux élevés en cholestérol affectent-ils le risque d'infection et de propagation du VIH-1 ? Le cholestérol pourrait-il être une voie intéressante pour la prévention des infections au VIH-1 et le ralentissement de la maladie ? De plus, les radeaux lipidiques, constitués de manière importante en cholestérol, seraient-ils le site préférentiel de sortie et d'internalisation du VIH-1 ? En d'autres termes, les radeaux lipidiques pourraient-ils être directement impliqués dans la propagation mais aussi la persistance virale du fait de son importance dans la relâche de particules virales et la constitution des stocks intracellulaires ? Il apparaît donc clairement que le cholestérol et ces microdomaines de la membrane plasmique restent un sujet d'investigation dans la compréhension de la pathogénèse du VIH-1.

Finalement, nos travaux ouvrent la porte à l'étude de la coopérativité entre protéines accessoires du VIH-1. Longtemps sous-estimées dans le cycle de réplication du virus et dans l'établissement de la pathogénèse de ce rétrovirus, l'étude plus poussée de ces protéines accessoires a révélé leur rôle central dans le fonctionnement du VIH-1. Le fait que la confluence cellulaire, particulièrement l'arrêt du cycle cellulaire, puisse moduler les fonctions de Vpu sur la relâche virale soulève l'hypothèse d'une action concomitante entre les protéines Vpr et Vpu : ainsi en promouvant l'arrêt de cycle en phase G2, Vpr pourrait favoriser non seulement la production des transcrits viraux mais plus encore la libération de virions via la modulation d'une des fonctions de Vpu dans certains types cellulaires. L'étude du lien entre les fonctions de Vpr et Vpu pourrait mener à l'élaboration de stratégies antivirales ciblant ces protéines accessoires comme précédemment suggéré du fait de l'importance de Vpr dans l'import du complexe de préintégration. En définitive, ces directions futures favoriseront une meilleure compréhension des mécanismes d'assemblage et de formation du VIH-1 ainsi que des éléments impliqués dans l'établissement de la persistance virale. Ces connaissances devront nous permettre à terme d'élaborer de nouvelles stratégies antirétrovirales afin d'éradiquer la propagation du VIH-1.

A.



B.

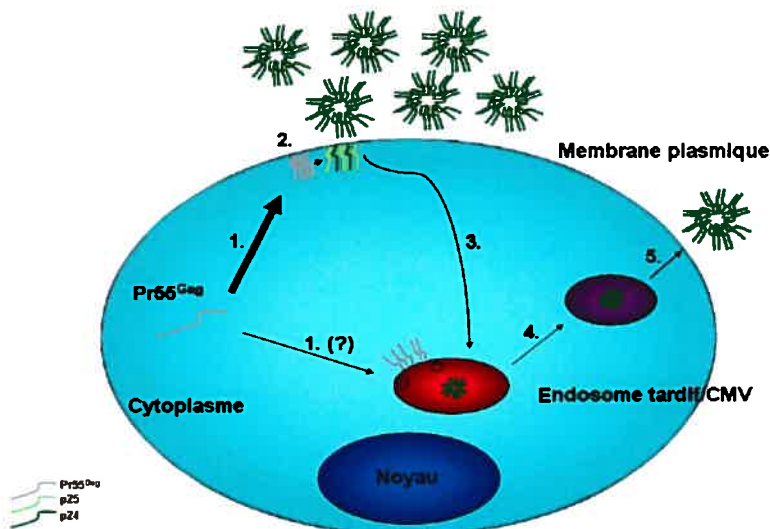


Figure 3. Modèle du ciblage du précurseur Pr55^{Gag} et de son trafic subséquent dans les cellules HEK293T. La polyprotéine Gag est initialement et de manière prédominante ciblée vers la membrane plasmique (1.) où elle multimérisse et forme des particules virales relâchées dans le milieu extracellulaire (2.). On ne peut cependant pas exclure qu'une certaine proportion de Pr55^{Gag} soit directement ciblée dans les CMV initialement (1.). Dans le contexte où la relâche est peu efficace (i.e absence de Vpu) (3.A), une proportion significative de particules virales matures est internalisée vers les CMV. En présence de Vpu, la localisation de Gag dans les CMV est fortement réduite (3.B). Le processus d'internalisation de Gag est dépendant du cholestérol présent à la membrane plasmique mais insensible à la chlorpromazine. Ces compartiments intracellulaires peuvent être recrutés à la membrane plasmique suite à une stimulation (4.) et peuvent fusionner à la membrane limitante pour libérer leur contenu intraluminal (5.). Cette voie d'exocytose ne semble pas constitutive dans le cas des cellules HEK293T.

Quatrième partie : Bibliographie

1. Gottlieb, M.S., et al., *Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency*. N Engl J Med, 1981. **305**(24): p. 1425-31.
2. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
3. Gallo, R.C., et al., *Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science, 1983. **220**(4599): p. 865-7.
4. ONUSIDA/OMS, *2006 Rapport sur l'épidémie mondiale de SIDA*. http://www.unaids.org/en/HIV_data/2006GlobalReport/2006-GR_fr.asp, 2006.
5. Santiago, M.L., et al., *Noninvasive detection of Simian immunodeficiency virus infection in a wild-living L'Hoest's monkey (Cercopithecus lhoesti)*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2003. **19**(12): p. 1163-6.
6. Stevenson, M., *HIV-1 pathogenesis*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 853-60.
7. Picker, L.J. and D.I. Watkins, *HIV pathogenesis: the first cut is the deepest*. Nat Immunol, 2005. **6**(5): p. 430-2.
8. Mattapallil, J.J., et al., *Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection*. Nature, 2005. **434**(7037): p. 1093-7.
9. Li, Q., et al., *Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells*. Nature, 2005. **434**(7037): p. 1148-52.
10. Bour, S., et al., *The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor?* J Virol, 1996. **70**(2): p. 820-9.
11. Bour, S. and K. Strebel, *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**(12): p. 8285-300.
12. Gottlinger, H.G., *The HIV-1 assembly machine*. Aids, 2001. **15 Suppl 5**: p. S13-20.
13. Gheysen, D., et al., *Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells*. Cell, 1989. **59**(1): p. 103-12.
14. Smith, A.J., et al., *Requirements for incorporation of Pr160gag-pol from human immunodeficiency virus type 1 into virus-like particles*. J Virol, 1993. **67**(4): p. 2266-75.
15. Bryant, M. and L. Ratner, *Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(2): p. 523-7.
16. Gottlinger, H.G., J.G. Sodroski, and W.A. Haseltine, *Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(15): p. 5781-5.
17. Spearman, P., et al., *Identification of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein domains essential to membrane binding and particle assembly*. J Virol, 1994. **68**(5): p. 3232-42.
18. Yuan, X., et al., *Mutations in the N-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block intracellular transport of the Gag precursor*. J Virol, 1993. **67**(11): p. 6387-94.
19. Zhou, W., et al., *Identification of a membrane-binding domain within the amino-terminal region of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein which interacts with acidic phospholipids*. J Virol, 1994. **68**(4): p. 2556-69.

20. Lee, P.P. and M.L. Linial, *Efficient particle formation can occur if the matrix domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag is substituted by a myristylation signal*. J Virol, 1994. **68**(10): p. 6644-54.
21. Reil, H., et al., *Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein*. Embo J, 1998. **17**(9): p. 2699-708.
22. Wang, C.T. and E. Barklis, *Assembly, processing, and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 gag mutants*. J Virol, 1993. **67**(7): p. 4264-73.
23. Dorfman, T., et al., *Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1994. **68**(12): p. 8180-7.
24. Yu, X., et al., *The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions*. J Virol, 1992. **66**(8): p. 4966-71.
25. Lopez-Verges, S., et al., *Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(40): p. 14947-52.
26. Bukrinsky, M.I., et al., *A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells*. Nature, 1993. **365**(6447): p. 666-9.
27. Miller, C.J., et al., *Rhesus macaques previously infected with simian/human immunodeficiency virus are protected from vaginal challenge with pathogenic SIVmac239*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 1911-21.
28. Gallay, P., et al., *HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator*. Cell, 1995. **80**(3): p. 379-88.
29. von Schwedler, U., R.S. Kornbluth, and D. Trono, *The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 6992-6.
30. Dong, X., et al., *AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly*. Cell, 2005. **120**(5): p. 663-74.
31. Batonick, M., et al., *Interaction of HIV-1 Gag with the clathrin-associated adaptor AP-2*. Virology, 2005. **342**(2): p. 190-200.
32. Gamble, T.R., et al., *Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein*. Science, 1997. **278**(5339): p. 849-53.
33. Gitti, R.K., et al., *Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein*. Science, 1996. **273**(5272): p. 231-5.
34. Momany, C., et al., *Crystal structure of dimeric HIV-1 capsid protein*. Nat Struct Biol, 1996. **3**(9): p. 763-70.
35. Borsetti, A., A. Ohagen, and H.G. Gottlinger, *The C-terminal half of the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is sufficient for efficient particle assembly*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 9313-7.
36. Reicin, A.S., et al., *The role of Gag in human immunodeficiency virus type 1 virion morphogenesis and early steps of the viral life cycle*. J Virol, 1996. **70**(12): p. 8645-52.
37. Srinivasakumar, N., M.L. Hammariskjold, and D. Rekosh, *Characterization of deletion mutations in the capsid region of human immunodeficiency virus type 1 that affect particle formation and Gag-Pol precursor incorporation*. J Virol, 1995. **69**(10): p. 6106-14.

38. Franke, E.K., et al., *Cyclophilin binding to the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein is mimicked by an anti-cyclosporine antibody*. J Virol, 1995. **69**(9): p. 5821-3.
39. Luban, J., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B*. Cell, 1993. **73**(6): p. 1067-78.
40. Thali, M., *Cyclosporins: immunosuppressive drugs with anti-HIV-1 activity*. Mol Med Today, 1995. **1**(6): p. 287-91.
41. Thali, M., et al., *Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions*. Nature, 1994. **372**(6504): p. 363-5.
42. Handschumacher, R.E., et al., *Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A*. Science, 1984. **226**(4674): p. 544-7.
43. Grattinger, M., et al., *In vitro assembly properties of wild-type and cyclophilin-binding defective human immunodeficiency virus capsid proteins in the presence and absence of cyclophilin A*. Virology, 1999. **257**(1): p. 247-60.
44. Gamble, T.R., et al., *Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1285-94.
45. Mammano, F., et al., *Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 4927-36.
46. McDermott, J., et al., *Structural analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein interactions, using cysteine-specific reagents*. J Virol, 1996. **70**(8): p. 5106-14.
47. Reicin, A.S., et al., *Linker insertion mutations in the human immunodeficiency virus type 1 gag gene: effects on virion particle assembly, release, and infectivity*. J Virol, 1995. **69**(2): p. 642-50.
48. Accola, M.A., A. Ohagen, and H.G. Gottlinger, *Isolation of human immunodeficiency virus type 1 cores: retention of Vpr in the absence of p6(gag)*. J Virol, 2000. **74**(13): p. 6198-202.
49. Accola, M.A., S. Høglund, and H.G. Gottlinger, *A putative alpha-helical structure which overlaps the capsid-p2 boundary in the human immunodeficiency virus type 1 Gag precursor is crucial for viral particle assembly*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 2072-8.
50. Wills, J.W. and R.C. Craven, *Form, function, and use of retroviral gag proteins*. Aids, 1991. **5**(6): p. 639-54.
51. Ebbets-Reed, D., S. Scarlata, and C.A. Carter, *The major homology region of the HIV-1 gag precursor influences membrane affinity*. Biochemistry, 1996. **35**(45): p. 14268-75.
52. Provitera, P., et al., *Role of the major homology region in assembly of HIV-1 Gag*. Biochemistry, 2001. **40**(18): p. 5565-72.
53. Cimarelli, A., et al., *Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3046-57.
54. Cimarelli, A., et al., *Rescue of multiple viral functions by a second-site suppressor of a human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid mutation*. J Virol, 2000. **74**(9): p. 4273-83.
55. Dawson, L. and X.F. Yu, *The role of nucleocapsid of HIV-1 in virus assembly*. Virology, 1998. **251**(1): p. 141-57.
56. Aldovini, A. and R.A. Young, *Mutations of RNA and protein sequences involved in human immunodeficiency virus type 1 packaging result in production of noninfectious virus*. J Virol, 1990. **64**(5): p. 1920-6.

57. Dorfman, T., et al., *Mapping of functionally important residues of a cysteine-histidine box in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein.* J Virol, 1993. **67**(10): p. 6159-69.
58. Gorelick, R.J., et al., *The two zinc fingers in the human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein are not functionally equivalent.* J Virol, 1993. **67**(7): p. 4027-36.
59. Berkowitz, R.D. and S.P. Goff, *Analysis of binding elements in the human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA and nucleocapsid protein.* Virology, 1994. **202**(1): p. 233-46.
60. Berkowitz, R.D., et al., *Retroviral nucleocapsid domains mediate the specific recognition of genomic viral RNAs by chimeric Gag polyproteins during RNA packaging in vivo.* J Virol, 1995. **69**(10): p. 6445-56.
61. Jiang, M., et al., *Identification of tRNAs incorporated into wild-type and mutant human immunodeficiency virus type 1.* J Virol, 1993. **67**(6): p. 3246-53.
62. Kleiman, L., et al., *Incorporation of tRNA into normal and mutant HIV-1.* Biochem Biophys Res Commun, 1991. **174**(3): p. 1272-80.
63. Burniston, M.T., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein multimerization requires the nucleocapsid domain and RNA and is promoted by the capsid-dimer interface and the basic region of matrix protein.* J Virol, 1999. **73**(10): p. 8527-40.
64. Kondo, E. and H.G. Gottlinger, *A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr.* J Virol, 1996. **70**(1): p. 159-64.
65. Kondo, E., et al., *The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles.* J Virol, 1995. **69**(5): p. 2759-64.
66. Lu, Y.L., et al., *A leucine triplet repeat sequence (LXX)₄ in p6gag is important for Vpr incorporation into human immunodeficiency virus type 1 particles.* J Virol, 1995. **69**(11): p. 6873-9.
67. Huang, M., et al., *p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease.* J Virol, 1995. **69**(11): p. 6810-8.
68. Gottlinger, H.G., et al., *Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(8): p. 3195-9.
69. Morita, E. and W.I. Sundquist, *Retrovirus budding.* Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 395-425.
70. Slagsvold, T., et al., *Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins.* Trends Cell Biol, 2006. **16**(6): p. 317-26.
71. Strack, B., et al., *AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding.* Cell, 2003. **114**(6): p. 689-99.
72. Raymond, C.K., et al., *Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants.* Mol Biol Cell, 1992. **3**(12): p. 1389-402.
73. Jacks, T., et al., *Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression.* Nature, 1988. **331**(6153): p. 280-3.
74. Darke, P.L., et al., *HIV-1 protease specificity of peptide cleavage is sufficient for processing of gag and pol polyproteins.* Biochem Biophys Res Commun, 1988. **156**(1): p. 297-303.

75. Humblet, C.C., et al., *Characterization of two structurally novel HIV-1 protease inhibitors identified by rational selection*. Antiviral Res, 1993. **21**(1): p. 73-84.
76. Peng, C., et al., *Role of human immunodeficiency virus type 1-specific protease in core protein maturation and viral infectivity*. J Virol, 1989. **63**(6): p. 2550-6.
77. Bukrinskaya, A.G., *HIV-1 assembly and maturation*. Arch Virol, 2004. **149**(6): p. 1067-82.
78. Furfine, E.S. and J.E. Reardon, *Reverse transcriptase.RNase H from the human immunodeficiency virus. Relationship of the DNA polymerase and RNA hydrolysis activities*. J Biol Chem, 1991. **266**(1): p. 406-12.
79. Furfine, E.S. and J.E. Reardon, *Human immunodeficiency virus reverse transcriptase ribonuclease H: specificity of tRNA(Lys3)-primer excision*. Biochemistry, 1991. **30**(29): p. 7041-6.
80. Lacey, S.F., et al., *Biochemical studies on the reverse transcriptase and RNase H activities from human immunodeficiency virus strains resistant to 3'-azido-3'-deoxythymidine*. J Biol Chem, 1992. **267**(22): p. 15789-94.
81. Temin, H.M., *A proposal for a new approach to a preventive vaccine against human immunodeficiency virus type 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(10): p. 4419-20.
82. Bushman, F.D. and R. Craigie, *Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1339-43.
83. Engelman, A. and R. Craigie, *Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro*. J Virol, 1992. **66**(11): p. 6361-9.
84. Engelman, A., et al., *Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication*. J Virol, 1995. **69**(5): p. 2729-36.
85. Katzman, M. and M. Sudol, *Mapping viral DNA specificity to the central region of integrase by using functional human immunodeficiency virus type 1/visna virus chimeric proteins*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 1744-53.
86. Drelich, M., R. Wilhelm, and J. Mous, *Identification of amino acid residues critical for endonuclease and integration activities of HIV-1 IN protein in vitro*. Virology, 1992. **188**(2): p. 459-68.
87. Vink, C., A.M. Oude Groeneger, and R.H. Plasterk, *Identification of the catalytic and DNA-binding region of the human immunodeficiency virus type 1 integrase protein*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(6): p. 1419-25.
88. Land, A. and I. Braakman, *Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum*. Biochimie, 2001. **83**(8): p. 783-90.
89. Leonard, C.K., et al., *Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells*. J Biol Chem, 1990. **265**(18): p. 10373-82.
90. Chan, D.C., et al., *Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein*. Cell, 1997. **89**(2): p. 263-73.
91. Hallenberger, S., et al., *Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160*. Nature, 1992. **360**(6402): p. 358-61.
92. Weissenhorn, W., et al., *Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41*. Nature, 1997. **387**(6631): p. 426-30.

93. Dubay, J.W., et al., *Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity*. J Virol, 1992. **66**(11): p. 6616-25.
94. Freed, E.O. and M.A. Martin, *The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection*. J Biol Chem, 1995. **270**(41): p. 23883-6.
95. Freed, E.O. and M.A. Martin, *Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 341-51.
96. Kessler, M. and M.B. Mathews, *Premature termination and processing of human immunodeficiency virus type 1-promoted transcripts*. J Virol, 1992. **66**(7): p. 4488-96.
97. Laspia, M.F., A.P. Rice, and M.B. Mathews, *HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation*. Cell, 1989. **59**(2): p. 283-92.
98. Brigati, C., et al., *HIV Tat, its TARgets and the control of viral gene expression*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **220**(1): p. 57-65.
99. Demarchi, F., et al., *Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1996. **70**(7): p. 4427-37.
100. Cochrane, A., *Controlling HIV-1 Rev function*. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2004. **4**(4): p. 287-95.
101. Malim, M.H., et al., *The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 254-7.
102. Fischer, U., et al., *The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs*. Cell, 1995. **82**(3): p. 475-83.
103. Aiken, C., et al., *Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain*. Cell, 1994. **76**(5): p. 853-64.
104. Levesque, K., et al., *Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection*. Curr HIV Res, 2004. **2**(1): p. 51-9.
105. Robinson, W.E., Jr., D.C. Montefiori, and W.M. Mitchell, *Complement-mediated antibody-dependent enhancement of HIV-1 infection requires CD4 and complement receptors*. Virology, 1990. **175**(2): p. 600-4.
106. Michel, N., et al., *The Nef protein of human immunodeficiency virus is a broad-spectrum modulator of chemokine receptor cell surface levels that acts independently of classical motifs for receptor endocytosis and Galphai signaling*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(8): p. 3578-90.
107. Venzke, S., et al., *Expression of Nef downregulates CXCR4, the major coreceptor of human immunodeficiency virus, from the surfaces of target cells and thereby enhances resistance to superinfection*. J Virol, 2006. **80**(22): p. 11141-52.
108. Aiken, C. and D. Trono, *Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis*. J Virol, 1995. **69**(8): p. 5048-56.
109. Kimpton, J. and M. Emerman, *Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene*. J Virol, 1992. **66**(4): p. 2232-9.
110. Schwartz, O., et al., *Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein*. Nat Med, 1996. **2**(3): p. 338-42.
111. Stumptner-Cuvelette, P., et al., *HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 12144-9.

112. Swigut, T., et al., *Simian and human immunodeficiency virus Nef proteins use different surfaces to downregulate class I major histocompatibility complex antigen expression*. J Virol, 2000. **74**(12): p. 5691-701.
113. Fackler, O.T., et al., *A natural variability in the proline-rich motif of Nef modulates HIV-1 replication in primary T cells*. Curr Biol, 2001. **11**(16): p. 1294-9.
114. Binette, J. and E.A. Cohen, *Recent advances in the understanding of HIV-1 Vpu accessory protein functions*. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2004. **4**(4): p. 297-307.
115. Buttica, C., et al., *Silencing of both beta-TrCP1 and HOS (beta-TrCP2) is required to suppress human immunodeficiency virus type 1 Vpu-mediated CD4 down-modulation*. J Virol, 2007. **81**(3): p. 1502-5.
116. Margottin, F., et al., *A novel human WD protein, h-beta TrCp, that interacts with HIV-1 Vpu connects CD4 to the ER degradation pathway through an F-box motif*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 565-74.
117. Meusser, B. and T. Sommer, *Vpu-mediated degradation of CD4 reconstituted in yeast reveals mechanistic differences to cellular ER-associated protein degradation*. Mol Cell, 2004. **14**(2): p. 247-58.
118. Wildum, S., et al., *Contribution of Vpu, Env, and Nef to CD4 down-modulation and resistance of human immunodeficiency virus type 1-infected T cells to superinfection*. J Virol, 2006. **80**(16): p. 8047-59.
119. Cohen, E.A., et al., *Identification of a protein encoded by the vpu gene of HIV-1*. Nature, 1988. **334**(6182): p. 532-4.
120. Geraghty, R.J., et al., *Cell type-dependence for Vpu function*. J Med Primatol, 1994. **23**(2-3): p. 146-50.
121. Gottlinger, H.G., et al., *Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(15): p. 7381-5.
122. Klimkait, T., et al., *The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release*. J Virol, 1990. **64**(2): p. 621-9.
123. Neil, S.J., et al., *HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane*. PLoS Pathog, 2006. **2**(5): p. e39.
124. Schubert, U., K.A. Clouse, and K. Strebel, *Augmentation of virus secretion by the human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein is cell type independent and occurs in cultured human primary macrophages and lymphocytes*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 7699-711.
125. Strebel, K., T. Klimkait, and M.A. Martin, *A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product*. Science, 1988. **241**(4870): p. 1221-3.
126. Varthakavi, V., et al., *Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15154-9.
127. Varthakavi, V., et al., *The pericentriolar recycling endosome plays a key role in Vpu-mediated enhancement of HIV-1 particle release*. Traffic, 2006. **7**(3): p. 298-307.
128. Deora, A. and L. Ratner, *Viral protein U (Vpu)-mediated enhancement of human immunodeficiency virus type 1 particle release depends on the rate of cellular proliferation*. J Virol, 2001. **75**(14): p. 6714-8.

129. Harila, K., et al., *Vpu and Tsg101 regulate intracellular targeting of the human immunodeficiency virus type 1 core protein precursor Pr55gag*. J Virol, 2006. **80**(8): p. 3765-72.
130. Mangeat, B., et al., *Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts*. Nature, 2003. **424**(6944): p. 99-103.
131. Mehle, A., et al., *Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7792-8.
132. Kao, S., et al., *The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein reduces intracellular expression and inhibits packaging of APOBEC3G (CEM15), a cellular inhibitor of virus infectivity*. J Virol, 2003. **77**(21): p. 11398-407.
133. Marin, M., et al., *HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1398-403.
134. Simon, J.H., et al., *Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype*. Nat Med, 1998. **4**(12): p. 1397-400.
135. Soros, V.B., W. Yonemoto, and W.C. Greene, *Newly Synthesized APOBEC3G Is Incorporated into HIV Virions, Inhibited by HIV RNA, and Subsequently Activated by RNase H*. PLoS Pathog, 2007. **3**(2): p. e15.
136. Kremer, M. and B.S. Schmierle, *HIV-1 Vif: HIV's weapon against the cellular defense factor APOBEC3G*. Curr HIV Res, 2005. **3**(4): p. 339-44.
137. Zhao, L.J. and H. Zhu, *Structure and function of HIV-1 auxiliary regulatory protein Vpr: novel clues to drug design*. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2004. **4**(4): p. 265-75.
138. Connor, R.I., et al., *Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes*. Virology, 1995. **206**(2): p. 935-44.
139. Heinzinger, N.K., et al., *The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7311-5.
140. Popov, S., et al., *Viral protein R regulates docking of the HIV-1 preintegration complex to the nuclear pore complex*. J Biol Chem, 1998. **273**(21): p. 13347-52.
141. Popov, S., et al., *Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 preintegration complex*. Embo J, 1998. **17**(4): p. 909-17.
142. Vodicka, M.A., et al., *HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection*. Genes Dev, 1998. **12**(2): p. 175-85.
143. Lai, M., et al., *Activation of the ATR pathway by human immunodeficiency virus type 1 Vpr involves its direct binding to chromatin in vivo*. J Virol, 2005. **79**(24): p. 15443-51.
144. Roshal, M., et al., *Activation of the ATR-mediated DNA damage response by the HIV-1 viral protein R*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25879-86.
145. Zimmerman, E.S., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces DNA replication stress in vitro and in vivo*. J Virol, 2006. **80**(21): p. 10407-18.
146. Goh, W.C., et al., *HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo*. Nat Med, 1998. **4**(1): p. 65-71.
147. Cui, J., et al., *The role of Vpr in the regulation of HIV-1 gene expression*. Cell Cycle, 2006. **5**(22): p. 2626-38.
148. Andersen, J.L., et al., *HIV-1 Vpr-Induced Apoptosis Is Cell Cycle Dependent and Requires Bax but Not ANT*. PLoS Pathog, 2006. **2**(12): p. e127.

149. Andersen, J.L., et al., *ATR and GADD45alpha mediate HIV-1 Vpr-induced apoptosis*. Cell Death Differ, 2005. **12**(4): p. 326-34.
150. Jacotot, E., et al., *Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2*. J Exp Med, 2001. **193**(4): p. 509-19.
151. Jacotot, E., et al., *The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore*. J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 33-46.
152. Carbonari, M., et al., *Frequency of provirus-bearing CD4+ cells in HIV type 1 infection correlates with extent of in vitro apoptosis of CD8+ but not of CD4+ cells*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1995. **11**(7): p. 789-94.
153. Carbonari, M., et al., *Death of bystander cells by a novel pathway involving early mitochondrial damage in human immunodeficiency virus-related lymphadenopathy*. Blood, 1997. **90**(1): p. 209-16.
154. Chia, W.K., et al., *Programmed cell death induced by HIV type 1 antigen stimulation is associated with a decrease in cytotoxic T lymphocyte activity in advanced HIV type 1 infection*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1995. **11**(2): p. 249-56.
155. Gougeon, M.L., *Apoptosis in AIDS. Genetic control and relevance for AIDS pathogenesis*. Biochem Soc Trans, 1996. **24**(4): p. 1055-8.
156. Gougeon, M.L., et al., *Direct and indirect mechanisms mediating apoptosis during HIV infection: contribution to in vivo CD4 T cell depletion*. Semin Immunol, 1993. **5**(3): p. 187-94.
157. Reddy, M.M., et al., *Human immunodeficiency virus type-1 infection of homosexual men is accompanied by a decrease in circulating B cells*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1991. **4**(4): p. 428-34.
158. Samuelsson, A., et al., *Apoptosis of CD4+ and CD19+ cells during human immunodeficiency virus type 1 infection--correlation with clinical progression, viral load, and loss of humoral immunity*. Virology, 1997. **238**(2): p. 180-8.
159. Samuelsson, A., et al., *Progressive B cell apoptosis and expression of Fas ligand during human immunodeficiency virus type 1 infection*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1997. **13**(12): p. 1031-8.
160. Fletcher, T.M., 3rd, et al., *Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIV(SM)*. Embo J, 1996. **15**(22): p. 6155-65.
161. Kewalramani, V.N., et al., *Protein stability influences human immunodeficiency virus type 2 Vpr virion incorporation and cell cycle effect*. Virology, 1996. **218**(2): p. 326-34.
162. Bour, S., R. Geleziunas, and M.A. Wainberg, *The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection*. Microbiol Rev, 1995. **59**(1): p. 63-93.
163. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 657-700.
164. Doms, R.W. and S.C. Peiper, *Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry*. Virology, 1997. **235**(2): p. 179-90.
165. O'Brien, W.A., et al., *HIV-1 tropism for mononuclear phagocytes can be determined by regions of gp120 outside the CD4-binding domain*. Nature, 1990. **348**(6296): p. 69-73.

166. Fassati, A. and S.P. Goff, *Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2001. **75**(8): p. 3626-35.
167. Munk, C., et al., *A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13843-8.
168. Owens, C.M., et al., *Human and simian immunodeficiency virus capsid proteins are major viral determinants of early, postentry replication blocks in simian cells*. J Virol, 2003. **77**(1): p. 726-31.
169. Stremblau, M., et al., *The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys*. Nature, 2004. **427**(6977): p. 848-53.
170. Chatterji, U., et al., *Trim5alpha accelerates degradation of cytosolic capsid associated with productive HIV-1 entry*. J Biol Chem, 2006. **281**(48): p. 37025-33.
171. Zennou, V., et al., *HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap*. Cell, 2000. **101**(2): p. 173-85.
172. Starcich, B., et al., *Characterization of long terminal repeat sequences of HTLV-III*. Science, 1985. **227**(4686): p. 538-40.
173. Preston, B.D., B.J. Poiesz, and L.A. Loeb, *Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase*. Science, 1988. **242**(4882): p. 1168-71.
174. Williams, K.J. and L.A. Loeb, *Retroviral reverse transcriptases: error frequencies and mutagenesis*. Curr Top Microbiol Immunol, 1992. **176**: p. 165-80.
175. Lori, F., et al., *Viral DNA carried by human immunodeficiency virus type 1 virions*. J Virol, 1992. **66**(8): p. 5067-74.
176. Trono, D., *Partial reverse transcripts in virions from human immunodeficiency and murine leukemia viruses*. J Virol, 1992. **66**(8): p. 4893-900.
177. Zhang, H., et al., *Intravirion reverse transcripts in the peripheral blood plasma on human immunodeficiency virus type 1-infected individuals*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 7591-7.
178. Zhang, H., et al., *Reverse transcription takes place within extracellular HIV-1 virions: potential biological significance*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1993. **9**(12): p. 1287-96.
179. Chiu, Y.L., et al., *High-molecular-mass APOBEC3G complexes restrict Alu retrotransposition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(42): p. 15588-93.
180. Farnet, C.M. and F.D. Bushman, *HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro*. Cell, 1997. **88**(4): p. 483-92.
181. Farnet, C.M. and W.A. Haseltine, *Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex*. J Virol, 1991. **65**(4): p. 1910-5.
182. Galloway, P., et al., *HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase*. Cell, 1995. **83**(4): p. 569-76.
183. Iordanskiy, S., et al., *Intracytoplasmic maturation of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription complexes determines their capacity to integrate into chromatin*. Retrovirology, 2006. **3**: p. 4.
184. Li, L., et al., *Retroviral cDNA integration: stimulation by HMG I family proteins*. J Virol, 2000. **74**(23): p. 10965-74.
185. Llano, M., et al., *Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55570-7.

186. Llano, M., et al., *LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes*. J Virol, 2004. **78**(17): p. 9524-37.
187. Miller, M.D., C.M. Farnet, and F.D. Bushman, *Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 5382-90.
188. Arhel, N., et al., *Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes*. Nat Methods, 2006. **3**(10): p. 817-24.
189. Arhel, N., et al., *Nuclear import defect of human immunodeficiency virus type 1 DNA flap mutants is not dependent on the viral strain or target cell type*. J Virol, 2006. **80**(20): p. 10262-9.
190. McDonald, D., et al., *Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells*. J Cell Biol, 2002. **159**(3): p. 441-52.
191. Gallay, P., et al., *HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9825-30.
192. Heuer, T.S. and P.O. Brown, *Mapping features of HIV-1 integrase near selected sites on viral and target DNA molecules in an active enzyme-DNA complex by photo-cross-linking*. Biochemistry, 1997. **36**(35): p. 10655-65.
193. Barr, S.D., et al., *HIV integration site selection: targeting in macrophages and the effects of different routes of viral entry*. Mol Ther, 2006. **14**(2): p. 218-25.
194. Suzuki, Y. and R. Craigie, *The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(3): p. 187-96.
195. Killebrew, D.A., D. Troelstrup, and B. Shiramizu, *Preferential HIV-1 integration sites in macrophages and HIV-associated malignancies*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2004. **50 Online Pub**: p. OL581-9.
196. Schroder, A.R., et al., *HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots*. Cell, 2002. **110**(4): p. 521-9.
197. Wagner, W., et al., *Retroviral integration sites correlate with expressed genes in hematopoietic stem cells*. Stem Cells, 2005. **23**(8): p. 1050-8.
198. Wu, X. and S.M. Burgess, *Integration target site selection for retroviruses and transposable elements*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(19-20): p. 2588-96.
199. Llano, M., et al., *Identification and characterization of the chromatin-binding domains of the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75*. J Mol Biol, 2006. **360**(4): p. 760-73.
200. Cherepanov, P., et al., *Identification of an evolutionarily conserved domain in human lens epithelium-derived growth factor/transcriptional co-activator p75 (LEDGF/p75) that binds HIV-1 integrase*. J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 48883-92.
201. Malim, M.H., et al., *Functional characterization of a complex protein-DNA-binding domain located within the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat leader region*. J Virol, 1989. **63**(8): p. 3213-9.
202. Marciniak, R.A., et al., *HIV-1 Tat protein trans-activates transcription in vitro*. Cell, 1990. **63**(4): p. 791-802.
203. Marciniak, R.A. and P.A. Sharp, *HIV-1 Tat protein promotes formation of more-processive elongation complexes*. Embo J, 1991. **10**(13): p. 4189-96.
204. Parada, C.A. and R.G. Roeder, *Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain*. Nature, 1996. **384**(6607): p. 375-8.

205. Zhou, M., et al., *The Tat/TAR-dependent phosphorylation of RNA polymerase II C-terminal domain stimulates cotranscriptional capping of HIV-1 mRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12666-71.
206. Bieniasz, P.D., et al., *Recruitment of cyclin T1/P-TEFb to an HIV type 1 long terminal repeat promoter proximal RNA target is both necessary and sufficient for full activation of transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7791-6.
207. Perkins, N.D., et al., *A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation*. Embo J, 1993. **12**(9): p. 3551-8.
208. Parkin, N.T., M. Chamorro, and H.E. Varmus, *Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo*. J Virol, 1992. **66**(8): p. 5147-51.
209. Halwani, R., et al., *Rapid localization of Gag/GagPol complexes to detergent-resistant membrane during the assembly of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2003. **77**(7): p. 3973-84.
210. Holm, K., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 assembly and lipid rafts: Pr55(gag) associates with membrane domains that are largely resistant to Brij98 but sensitive to Triton X-100*. J Virol, 2003. **77**(8): p. 4805-17.
211. Lindwasser, O.W. and M.D. Resh, *Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains*. J Virol, 2001. **75**(17): p. 7913-24.
212. Ono, A. and E.O. Freed, *Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13925-30.
213. Massiah, M.A., et al., *Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein*. J Mol Biol, 1994. **244**(2): p. 198-223.
214. Matthews, S., et al., *Structural similarity between the p17 matrix protein of HIV-1 and interferon-gamma*. Nature, 1994. **370**(6491): p. 666-8.
215. Resh, M.D., *Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles*. AIDS Rev, 2005. **7**(2): p. 84-91.
216. Freed, E.O., *HIV-1 Gag: flipped out for PI(4,5)P(2)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(30): p. 11101-2.
217. Saad, J.S., et al., *Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(30): p. 11364-9.
218. Tang, C., et al., *Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(2): p. 517-22.
219. Campbell, S. and V.M. Vogt, *Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1995. **69**(10): p. 6487-97.
220. Gross, I., et al., *N-Terminal extension of human immunodeficiency virus capsid protein converts the in vitro assembly phenotype from tubular to spherical particles*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 4798-810.
221. Khorchid, A., et al., *Role of RNA in facilitating Gag/Gag-Pol interaction*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 4131-7.
222. Cen, S., et al., *Incorporation of pol into human immunodeficiency virus type 1 Gag virus-like particles occurs independently of the upstream Gag domain in Gag-pol*. J Virol, 2004. **78**(2): p. 1042-9.
223. Babst, M., et al., *Mammalian tumor susceptibility gene 101 (TSG101) and the yeast homologue, Vps23p, both function in late endosomal trafficking*. Traffic, 2000. **1**(3): p. 248-58.

224. Bishop, N., A. Horman, and P. Woodman, *Mammalian class E vps proteins recognize ubiquitin and act in the removal of endosomal protein-ubiquitin conjugates*. J Cell Biol, 2002. **157**(1): p. 91-101.
225. Katzmann, D.J., M. Babst, and S.D. Emr, *Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I*. Cell, 2001. **106**(2): p. 145-55.
226. Stuchell, M.D., et al., *The human endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) and its role in HIV-1 budding*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 36059-71.
227. Martin-Serrano, J., et al., *Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12414-9.
228. Martin-Serrano, J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *Role of ESCRT-I in retroviral budding*. J Virol, 2003. **77**(8): p. 4794-804.
229. von Schwedler, U.K., et al., *The protein network of HIV budding*. Cell, 2003. **114**(6): p. 701-13.
230. Demirov, D.G., et al., *Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 955-60.
231. Garrus, J.E., et al., *Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding*. Cell, 2001. **107**(1): p. 55-65.
232. Babst, M., *A protein's final ESCRT*. Traffic, 2005. **6**(1): p. 2-9.
233. Babst, M., et al., *Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body*. Dev Cell, 2002. **3**(2): p. 283-9.
234. Babst, M., et al., *The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function*. Embo J, 1998. **17**(11): p. 2982-93.
235. Fujita, H., et al., *A dominant negative form of the AAA ATPase SKD1/VPS4 impairs membrane trafficking out of endosomal/lysosomal compartments: class E vps phenotype in mammalian cells*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 401-14.
236. Yoshimori, T., et al., *The mouse SKD1, a homologue of yeast Vps4p, is required for normal endosomal trafficking and morphology in mammalian cells*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(2): p. 747-63.
237. Gottwein, E. and H.G. Krausslich, *Analysis of human immunodeficiency virus type 1 Gag ubiquitination*. J Virol, 2005. **79**(14): p. 9134-44.
238. Martin-Serrano, J., D. Perez-Caballero, and P.D. Bieniasz, *Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5554-63.
239. Strack, B., et al., *A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13063-8.
240. Schubert, U., et al., *Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 13057-62.
241. Gottwein, E., et al., *Cumulative mutations of ubiquitin acceptor sites in human immunodeficiency virus type 1 gag cause a late budding defect*. J Virol, 2006. **80**(13): p. 6267-75.
242. Kleiman, L. and S. Cen, *The tRNALys packaging complex in HIV-1*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(9): p. 1776-86.

243. Arthur, L.O., et al., *Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1935-8.
244. Cantin, R., et al., *The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity*. J Virol, 1997. **71**(3): p. 1922-30.
245. Esser, M.T., et al., *Differential incorporation of CD45, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and major histocompatibility complex class I and II molecules into human immunodeficiency virus type 1 virions and microvesicles: implications for viral pathogenesis and immune regulation*. J Virol, 2001. **75**(13): p. 6173-82.
246. Fortin, J.F., et al., *Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity*. J Virol, 1997. **71**(5): p. 3588-96.
247. Hermida-Matsumoto, L. and M.D. Resh, *Localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env at the plasma membrane by confocal imaging*. J Virol, 2000. **74**(18): p. 8670-9.
248. Ono, A., J.M. Orenstein, and E.O. Freed, *Role of the Gag matrix domain in targeting human immunodeficiency virus type 1 assembly*. J Virol, 2000. **74**(6): p. 2855-66.
249. Sandefur, S., V. Varthakavi, and P. Spearman, *The I domain is required for efficient plasma membrane binding of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 2723-32.
250. Nguyen, D.H. and J.E. Hildreth, *Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3264-72.
251. Simons, K. and J. Gruenberg, *Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(11): p. 459-62.
252. Simons, K. and E. Ikonen, *Functional rafts in cell membranes*. Nature, 1997. **387**(6633): p. 569-72.
253. Suomalainen, M., *Lipid rafts and assembly of enveloped viruses*. Traffic, 2002. **3**(10): p. 705-9.
254. Chazal, N. and D. Gerlier, *Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(2): p. 226-37, table of contents.
255. Duncan, M.J., et al., *Bacterial penetration of bladder epithelium through lipid rafts*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18944-51.
256. Duncan, M.J., J.S. Shin, and S.N. Abraham, *Microbial entry through caveolae: variations on a theme*. Cell Microbiol, 2002. **4**(12): p. 783-91.
257. Hawkes, D.J. and J. Mak, *Lipid membrane; a novel target for viral and bacterial pathogens*. Curr Drug Targets, 2006. **7**(12): p. 1615-21.
258. Campbell, S., et al., *The raft-promoting property of virion-associated cholesterol, but not the presence of virion-associated Brij 98 rafts, is a determinant of human immunodeficiency virus type 1 infectivity*. J Virol, 2004. **78**(19): p. 10556-65.
259. Campbell, S.M., S.M. Crowe, and J. Mak, *Virion-associated cholesterol is critical for the maintenance of HIV-1 structure and infectivity*. Aids, 2002. **16**(17): p. 2253-61.
260. Khanna, K.V., et al., *Vaginal transmission of cell-associated HIV-1 in the mouse is blocked by a topical, membrane-modifying agent*. J Clin Invest, 2002. **109**(2): p. 205-11.

261. Liao, Z., D.R. Graham, and J.E. Hildreth, *Lipid rafts and HIV pathogenesis: virion-associated cholesterol is required for fusion and infection of susceptible cells*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2003. **19**(8): p. 675-87.
262. Ding, L., et al., *Independent segregation of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein complexes and lipid rafts*. J Virol, 2003. **77**(3): p. 1916-26.
263. Ono, A., et al., *Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(41): p. 14889-94.
264. Skwarek, M., *Recent controversy surrounding lipid rafts*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2004. **52**(6): p. 427-31.
265. Orentas, R.J. and J.E. Hildreth, *Association of host cell surface adhesion receptors and other membrane proteins with HIV and SIV*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1993. **9**(11): p. 1157-65.
266. Aloia, R.C., H. Tian, and F.C. Jensen, *Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5181-5.
267. Kramer, B., et al., *HIV interaction with endosomes in macrophages and dendritic cells*. Blood Cells Mol Dis, 2005. **35**(2): p. 136-42.
268. Ott, D.E., *Potential roles of cellular proteins in HIV-1*. Rev Med Virol, 2002. **12**(6): p. 359-74.
269. Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, and M. Marsh, *Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages*. J Cell Biol, 2003. **162**(3): p. 443-55.
270. Nydegger, S., et al., *Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1*. J Cell Biol, 2006. **173**(5): p. 795-807.
271. Boucheix, C. and E. Rubinstein, *Tetraspanins*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(9): p. 1189-205.
272. Hemler, M.E., *Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2003. **19**: p. 397-422.
273. Levy, S. and T. Shoham, *The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(2): p. 136-48.
274. Silvie, O., et al., *Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 10): p. 1992-2002.
275. Gould, S.J., A.M. Booth, and J.E. Hildreth, *The Trojan exosome hypothesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(19): p. 10592-7.
276. Keller, S., et al., *Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function*. Immunol Lett, 2006. **107**(2): p. 102-8.
277. Booth, A.M., et al., *Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane*. J Cell Biol, 2006. **172**(6): p. 923-35.
278. Nermut, M.V., et al., *Time course of Gag protein assembly in HIV-1-infected cells: a study by immunoelectron microscopy*. Virology, 2003. **305**(1): p. 219-27.
279. Nydegger, S., et al., *HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes*. Traffic, 2003. **4**(12): p. 902-10.
280. Ono, A. and E.O. Freed, *Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body*. J Virol, 2004. **78**(3): p. 1552-63.
281. Rudner, L., et al., *Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4055-65.

282. Finzi, A., et al., *Major histocompatibility complex class II molecules promote human immunodeficiency virus type 1 assembly and budding to late endosomal/multivesicular body compartments*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9789-97.
283. Grigorov, B., et al., *Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines*. J Mol Biol, 2006. **359**(4): p. 848-62.
284. Folks, T.M., et al., *Infection and replication of HIV-1 in purified progenitor cells of normal human bone marrow*. Science, 1988. **242**(4880): p. 919-22.
285. Raposo, G., et al., *Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments*. Traffic, 2002. **3**(10): p. 718-29.
286. Sherer, N.M., et al., *Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies*. Traffic, 2003. **4**(11): p. 785-801.
287. Lindwasser, O.W. and M.D. Resh, *Human immunodeficiency virus type 1 Gag contains a dileucine-like motif that regulates association with multivesicular bodies*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 6013-23.
288. Jouvenet, N., et al., *Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly*. PLoS Biol, 2006. **4**(12): p. e435.
289. Jolly, C., et al., *HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse*. J Exp Med, 2004. **199**(2): p. 283-93.
290. Jolly, C. and Q.J. Sattentau, *Retroviral spread by induction of virological synapses*. Traffic, 2004. **5**(9): p. 643-50.
291. Piguet, V. and Q. Sattentau, *Dangerous liaisons at the virological synapse*. J Clin Invest, 2004. **114**(5): p. 605-10.
292. Jolly, C. and Q.J. Sattentau, *Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity*. J Virol, 2005. **79**(18): p. 12088-94.
293. Simonsen, A. and H. Stenmark, *PX domains: attracted by phosphoinositides*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(8): p. E179-82.
294. Simonsen, A., et al., *The role of phosphoinositides in membrane transport*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(4): p. 485-92.
295. Wenk, M.R. and P. De Camilli, *Protein-lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(22): p. 8262-9.
296. Boge, M., 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**(25): p. 15773-8.
297. Ohno, H., et al., *Interaction of endocytic signals from the HIV-1 envelope glycoprotein complex with members of the adaptor medium chain family*. Virology, 1997. **238**(2): p. 305-15.
298. Dell'Angelica, E.C., et al., *Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor*. Mol Cell, 1999. **3**(1): p. 11-21.
299. Rous, B.A., et al., *Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(3): p. 1071-82.
300. Helliwell, S.B., S. Losko, and C.A. Kaiser, *Components of a ubiquitin ligase complex specify polyubiquitination and intracellular trafficking of the general amino acid permease*. J Cell Biol, 2001. **153**(4): p. 649-62.
301. Puertollano, R. and J.S. Bonifacino, *Interactions of GGA3 with the ubiquitin sorting machinery*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(3): p. 244-51.
302. Schnell, J.D. and L. Hicke, *Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 35857-60.

303. Scott, P.M., et al., *GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(3): p. 252-9.
304. Umehayashi, K., *The roles of ubiquitin and lipids in protein sorting along the endocytic pathway*. Cell Struct Funct, 2003. **28**(5): p. 443-53.
305. Alroy, I., et al., *The trans-Golgi network-associated human ubiquitin-protein ligase POSH is essential for HIV type 1 production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1478-83.
306. Goff, A., et al., *Tsg101 control of human immunodeficiency virus type 1 Gag trafficking and release*. J Virol, 2003. **77**(17): p. 9173-82.
307. Bouamr, F., et al., *The C-terminal portion of the Hrs protein interacts with Tsg101 and interferes with human immunodeficiency virus type 1 Gag particle production*. J Virol, 2007. **81**(6): p. 2909-22.
308. Calafat, J., et al., *Major histocompatibility complex class II molecules induce the formation of endocytic MIIC-like structures*. J Cell Biol, 1994. **126**(4): p. 967-77.
309. Facke, M., et al., *A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum*. J Virol, 1993. **67**(8): p. 4972-80.
310. Gallina, A., et al., *Influence of MA internal sequences, but not of the myristylated N-terminus sequence, on the budding site of HIV-1 Gag protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **204**(3): p. 1031-8.
311. Freed, E.O., et al., *Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 5311-20.
312. Hansen, M., et al., *Transport and assembly of gag proteins into Moloney murine leukemia virus*. J Virol, 1990. **64**(11): p. 5306-16.
313. Scheifele, L.Z., et al., *Nuclear entry and CRM1-dependent nuclear export of the Rous sarcoma virus Gag polyprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3944-9.
314. Wang, C.T., H.Y. Lai, and J.J. Li, *Analysis of minimal human immunodeficiency virus type 1 gag coding sequences capable of virus-like particle assembly and release*. J Virol, 1998. **72**(10): p. 7950-9.
315. Chen, B.K., et al., *Efficient assembly of an HIV-1/MLV Gag-chimeric virus in murine cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15239-44.
316. Reed, M., et al., *Chimeric human immunodeficiency virus type 1 containing murine leukemia virus matrix assembles in murine cells*. J Virol, 2002. **76**(1): p. 436-43.
317. Handley, M.A., et al., *Association of Vpu-binding protein with microtubules and Vpu-dependent redistribution of HIV-1 Gag protein*. Virology, 2001. **291**(2): p. 198-207.
318. Handler, J.S., *Overview of epithelial polarity*. Annu Rev Physiol, 1989. **51**: p. 729-40.
319. Rodriguez-Boulan, E. and W.J. Nelson, *Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype*. Science, 1989. **245**(4919): p. 718-25.
320. Kilpatrick, D.R., R.V. Srinivas, and R.W. Compans, *Expression of the spleen focus-forming virus envelope gene in a polarized epithelial cell line*. Virology, 1988. **164**(2): p. 547-50.
321. Owens, R.J. and R.W. Compans, *Expression of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein is restricted to basolateral surfaces of polarized epithelial cells*. J Virol, 1989. **63**(2): p. 978-82.

322. Owens, R.J., et al., *Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3987-91.
323. Roth, M.G., R.V. Srinivas, and R.W. Compans, *Basolateral maturation of retroviruses in polarized epithelial cells*. J Virol, 1983. **45**(3): p. 1065-73.
324. Takimoto, T. and A. Portner, *Molecular mechanism of paramyxovirus budding*. Virus Res, 2004. **106**(2): p. 133-45.
325. Lodge, R., et al., *The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells*. J Virol, 1994. **68**(8): p. 4857-61.
326. Fais, S., et al., *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, 1995. **9**(4): p. 329-35.
327. Pearce-Pratt, R., D. Malamud, and D.M. Phillips, *Role of the cytoskeleton in cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus*. J Virol, 1994. **68**(5): p. 2898-905.
328. Deschambeault, J., 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**(6): p. 5010-7.
329. Perlman, M. and M.D. Resh, *Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag*. Traffic, 2006. **7**(6): p. 731-45.
330. Sieczkarski, S.B. and G.R. Whittaker, *Dissecting virus entry via endocytosis*. J Gen Virol, 2002. **83**(Pt 7): p. 1535-45.
331. Kirchhausen, T., *Clathrin*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 699-727.
332. Kirchhausen, T., *Three ways to make a vesicle*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(3): p. 187-98.
333. Rowell, J.F., et al., *Lysosome-associated membrane protein-1-mediated targeting of the HIV-1 envelope protein to an endosomal/lysosomal compartment enhances its presentation to MHC class II-restricted T cells*. J Immunol, 1995. **155**(4): p. 1818-28.
334. Rowell, J.F., P.E. Stanhope, and R.F. Siliciano, *Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC*. J Immunol, 1995. **155**(1): p. 473-88.
335. Bonifacino, J.S. and L.M. Traub, *Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes*. Annu Rev Biochem, 2003. **72**: p. 395-447.
336. Benmerah, A., et al., *AP-2/Eps15 interaction is required for receptor-mediated endocytosis*. J Cell Biol, 1998. **140**(5): p. 1055-62.
337. McDonald, P.H. and R.J. Lefkowitz, *Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions*. Cell Signal, 2001. **13**(10): p. 683-9.
338. Gaidarov, I., et al., *Arrestin function in G protein-coupled receptor endocytosis requires phosphoinositide binding*. Embo J, 1999. **18**(4): p. 871-81.
339. Gaidarov, I. and J.H. Keen, *Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits*. J Cell Biol, 1999. **146**(4): p. 755-64.
340. Wang, L.H., K.G. Rothberg, and R.G. Anderson, *Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation*. J Cell Biol, 1993. **123**(5): p. 1107-17.
341. Hinshaw, J.E., *Dynamin and its role in membrane fission*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 483-519.

342. Chen, M.S., et al., *Multiple forms of dynamin are encoded by shibire, a Drosophila gene involved in endocytosis*. Nature, 1991. **351**(6327): p. 583-6.
343. Clark, S.G., et al., *A dynamin GTPase mutation causes a rapid and reversible temperature-inducible locomotion defect in C. elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(19): p. 10438-43.
344. Hovanessian, A.G., et al., *The caveolin-1 binding domain of HIV-1 glycoprotein gp41 is an efficient B cell epitope vaccine candidate against virus infection*. Immunity, 2004. **21**(5): p. 617-27.
345. Scheiffele, P., et al., *Caveolin-1 and -2 in the exocytic pathway of MDCK cells*. J Cell Biol, 1998. **140**(4): p. 795-806.
346. Schuck, S., et al., *Resistance of cell membranes to different detergents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(10): p. 5795-800.
347. Kurzchalia, T.V., et al., *VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles*. J Cell Biol, 1992. **118**(5): p. 1003-14.
348. Rothberg, K.G., et al., *Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats*. Cell, 1992. **68**(4): p. 673-82.
349. Fra, A.M., et al., *De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(19): p. 8655-9.
350. Murata, M., et al., *VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(22): p. 10339-43.
351. Trigatti, B.L., R.G. Anderson, and G.E. Gerber, *Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **255**(1): p. 34-9.
352. Kurzchalia, T.V. and R.G. Parton, *Membrane microdomains and caveolae*. Curr Opin Cell Biol, 1999. **11**(4): p. 424-31.
353. Choudhury, A., et al., *Regulation of caveolar endocytosis by syntaxin 6-dependent delivery of membrane components to the cell surface*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(4): p. 317-28.
354. Pelkmans, L., D. Puntener, and A. Helenius, *Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae*. Science, 2002. **296**(5567): p. 535-9.
355. Anderson, H.A., Y. Chen, and L.C. Norkin, *Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(11): p. 1825-34.
356. Stang, E., J. Kartenbeck, and R.G. Parton, *Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(1): p. 47-57.
357. Orlandi, P.A. and P.H. Fishman, *Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains*. J Cell Biol, 1998. **141**(4): p. 905-15.
358. Neufeld, E.B., et al., *Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin*. J Biol Chem, 1996. **271**(35): p. 21604-13.
359. Huang, J.H., et al., *Identification of the HIV-1 gp41 core-binding motif in the scaffolding domain of caveolin-1*. J Biol Chem, 2007. **282**(9): p. 6143-52.
360. Swanson, J.A. and S.C. Baer, *Phagocytosis by zippers and triggers*. Trends Cell Biol, 1995. **5**(3): p. 89-93.
361. Sallusto, F., et al., *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 389-400.

362. Norbury, C.C., *Drinking a lot is good for dendritic cells*. Immunology, 2006. **117**(4): p. 443-51.
363. Honda, A., et al., *Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation*. Cell, 1999. **99**(5): p. 521-32.
364. Allen, L.A. and A. Aderem, *Mechanisms of phagocytosis*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(1): p. 36-40.
365. Crowley, M.T., et al., *A critical role for Syk in signal transduction and phagocytosis mediated by Fcgamma receptors on macrophages*. J Exp Med, 1997. **186**(7): p. 1027-39.
366. Niedergang, F. and P. Chavrier, *Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phago(s)ome*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(4): p. 422-8.
367. Cooper, J.A., *Effects of cytochalasin and phalloidin on actin*. J Cell Biol, 1987. **105**(4): p. 1473-8.
368. Araki, N., M.T. Johnson, and J.A. Swanson, *A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages*. J Cell Biol, 1996. **135**(5): p. 1249-60.
369. Cox, D., et al., *A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension*. J Biol Chem, 1999. **274**(3): p. 1240-7.
370. May, R.C. and L.M. Machesky, *Phagocytosis and the actin cytoskeleton*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 6): p. 1061-77.
371. Sheff, D.R., et al., *The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions*. J Cell Biol, 1999. **145**(1): p. 123-39.
372. Deora, A., P. Spearman, and L. Ratner, *The N-terminal matrix domain of HIV-1 Gag is sufficient but not necessary for viral protein U-mediated enhancement of particle release through a membrane-targeting mechanism*. Virology, 2000. **269**(2): p. 305-12.
373. Ono, A., et al., *Association of human immunodeficiency virus type 1 gag with membrane does not require highly basic sequences in the nucleocapsid: use of a novel Gag multimerization assay*. J Virol, 2005. **79**(22): p. 14131-40.
374. Cimarelli, A. and J. Luban, *Human immunodeficiency virus type 1 virion density is not determined by nucleocapsid basic residues*. J Virol, 2000. **74**(15): p. 6734-40.
375. Terwilliger, E.F., et al., *Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(13): p. 5163-7.
376. Yao, X.J., et al., *Mutagenic analysis of human immunodeficiency virus type 1 Vpr: role of a predicted N-terminal alpha-helical structure in Vpr nuclear localization and virion incorporation*. J Virol, 1995. **69**(11): p. 7032-44.
377. Finzi, A., et al., *PRODUCTIVE HIV-1 ASSEMBLY TAKES PLACE AT THE PLASMA MEMBRANE*. soumis à Journal of Virology, 2007.
378. Levesque, K., Y.S. Zhao, and E.A. Cohen, *Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 28346-53.
379. Dugast, M., et al., *AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes*. J Biol Chem, 2005. **280**(20): p. 19656-64.
380. Janvier, K. and J.S. Bonifacino, *Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(9): p. 4231-42.

381. Bailly, C., et al., *Plasma membrane perturbations of KB3 cells induced by the bleomycin-iron complex*. *Cancer Res*, 1990. **50**(2): p. 385-92.
382. Beriault, V., et al., *A late role for the association of hnRNP A2 with the HIV-1 hnRNP A2 response elements in genomic RNA, Gag, and Vpr localization*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(42): p. 44141-53.
383. Swanson, C.M., et al., *Retroviral mRNA nuclear export elements regulate protein function and virion assembly*. *Embo J*, 2004. **23**(13): p. 2632-40.
384. Blot, G., et al., *Targeting of the human immunodeficiency virus type 1 envelope to the trans-Golgi network through binding to TIP47 is required for env incorporation into virions and infectivity*. *J Virol*, 2003. **77**(12): p. 6931-45.
385. Barclay, J.W., A. Morgan, and R.D. Burgoyne, *Calcium-dependent regulation of exocytosis*. *Cell Calcium*, 2005. **38**(3-4): p. 343-53.
386. Crane, J.M. and L.K. Tamm, *Role of cholesterol in the formation and nature of lipid rafts in planar and spherical model membranes*. *Biophys J*, 2004. **86**(5): p. 2965-79.
387. Gomez, C.Y. and T.J. Hope, *Mobility of human immunodeficiency virus type 1 Pr55Gag in living cells*. *J Virol*, 2006. **80**(17): p. 8796-806.
388. Lavallee, C. and E.A. Cohen, *HIV-1 HxBc2 strain encodes a truncated vpr gene product of 78 amino acids*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1993. **6**(5): p. 529-30.
389. Grass, I., et al., *Recognition of a basic AP-2 binding motif within the C2B domain of synaptotagmin is dependent on multimerization*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(52): p. 54872-80.
390. Sharova, N., et al., *Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination in trans*. *Embo J*, 2005. **24**(13): p. 2481-9.
391. Garcia, E., et al., *HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse*. *Traffic*, 2005. **6**(6): p. 488-501.
392. McDonald, D., et al., *Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions*. *Science*, 2003. **300**(5623): p. 1295-7.
393. Turville, S.G., et al., *Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells*. *Blood*, 2004. **103**(6): p. 2170-9.
394. Cavrois, M., et al., *In Vitro Derived Dendritic Cells trans-Infect CD4 T Cells Primarily with Surface-Bound HIV-1 Virions*. *PLoS Pathog*, 2007. **3**(1): p. e4.
395. Claxton, A.J., et al., *Association between serum total cholesterol and HIV infection in a high-risk cohort of young men*. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, 1998. **17**(1): p. 51-7.
396. Neaton, J.D. and D.N. Wentworth, *Low serum cholesterol and risk of death from AIDS*. *Aids*, 1997. **11**(7): p. 929-30.
397. Welsch, S. et al., *HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages*. *Plos Pathogens*, 2007. **3**(3): e36.
398. Deneka, M. et al., *In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9 and CD53*. *J. Cell Biol.*, 2007. **177**(2):329-41.
399. Polishchuck, EV. et al., *Mechanism of constitutive export from the Golgi : bulk flow via the formation, protrusion, and en bloc cleavage of large trans-golgi network tubular domains* . *Mol. Biol. Cell.*, 2003. **14**(11):4470-85.

