

Université de Montréal

Étude du rôle des domaines structuraux et du motif de ciblage YXXØ dans le transport intracellulaire et de l'activité fusogénique de la gp41 du VIH-1

par
Mélanie Welman

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de Médecine

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

Juin, 2006

© Mélanie Welman, 2006



W
4
U58
2006
V.098

Direction des bibliothèques

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

Cette thèse intitulée :

Étude du rôle des domaines structuraux et du motif de ciblage YXXØ dans le transport intracellulaire et de l'activité fusogénique de la gp41 du VIH-1

présentée par :

Mélanie Welman

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

M. Jacques Thibodeau Ph.D, président rapporteur

M. Guy Lemay Ph.D, directeur de recherche

M. Éric A. Cohen Ph.D, co-directeur de recherche

Mme. Veronika von Messling Ph.D, membre du jury

M. André Darveau Ph.D, examinateur externe

M. Hugo Soudeyns Ph.D, Représentant du doyen de la FES

Sommaire

La sous-unité transmembranaire, gp41, de la glycoprotéine virale du VIH-1, se subdivise en trois domaines qui ont chacun des rôles distincts. De nombreuses études ont démontré l'importance de l'ectodomaine de la gp41 dans le processus de fusion virale. Le domaine transmembranaire est responsable de l'ancrage de la glycoprotéine à la membrane mais son implication au niveau de la fusion reste à définir. Quant au domaine cytoplasmique, il contient un motif de ciblage à base de tyrosine (YSPL) responsable du bourgeonnement polarisé du virus et de la glycoprotéine virale du côté basolatéral des cellules épithéliales polarisées. De plus, ce motif est responsable de l'internalisation des glycoprotéines virales présentes à la surface des cellules.

L'objectif premier de ce travail visait à identifier les séquences moléculaires responsables du ciblage polarisé et de l'internalisation. Afin de séparer les deux phénomènes, la stratégie retenue consistait à substituer par des alanines, et ce de manière individuelle, les acides aminés flanquant la tyrosine responsable de la polarisation et de l'internalisation. Les résultats obtenus ont démontré que la substitution de la glycine adjacente à la tyrosine provoque l'augmentation du niveau de glycoprotéines à la surface des cellules, par rapport au niveau de la protéine sauvage. Ceci suggère que la substitution entraîne la perte du signal d'internalisation. En revanche, cette substitution permet toujours le ciblage de la glycoprotéine et le bourgeonnement viral au domaine basolatéral chez les cellules épithéliales polarisées utilisées. Les autres mutants ponctuels semblent conserver l'internalisation de la glycoprotéine mais ils perdent le ciblage basolatéral. De plus, il semble que la distribution de la capsid virale soit influencée, lorsque les glycoprotéines sont ciblées au domaine basolatéral des cellules polarisées MDCK-T4/R4.

La seconde partie de nos travaux a permis d'établir que la substitution du domaine transmembranaire de la gp41 par celui de la protéine HA du virus influenza (mutant TM-HA) ou la délétion de l'isoleucine en position 642 de l'ectodomaine (mutant Δ I642), qui empêche la maturation de la glycoprotéine, abolissent tous deux l'infectivité. Les résultats obtenus ont montré que les deux

mutants peuvent se lier au récepteur CD4, mais qu'ils sont incapables d'entraîner la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. L'inhibition de la fusion peut avoir lieu non seulement en présence de molécules prévenant le clivage du précurseur, mais également en présence de molécules chez lesquelles le domaine d'ancrage à la membrane est altéré. Il a également été démontré que ces deux classes de mutants peuvent agir comme trans-dominants négatifs puisqu'ils inhibent l'infektivité du VIH-1, suite à la formation d'un hétéro-oligomère avec la glycoprotéine sauvage.

Ces études ont donc mené à l'identification des acides aminés impliqués dans le ciblage polarisé, dans l'internalisation et la fusion, ce qui permet de mieux comprendre le rôle joué par la glycoprotéine virale lors de l'assemblage de la particule virale et de l'infection par le VIH-1.

Mots clés : internalisation; polarisation; assemblage; bourgeonnement polarisé; cellule épithéliale; VIH-1; glycoprotéine virale; fusion; mutant trans-dominant négatif.

Abstract

The transmembrane subunit, gp41, of HIV-1 is subdivided into three domains each with their own distinct role. The ectodomain is able to mediate fusion between viral and target cell membranes. The membrane-spanning domain (MSD) of gp41 is responsible for anchoring the envelope glycoproteins on the lipid bilayer but many questions remain concerning its implication in the fusion process. The last domain, the intracytoplasmic domain of the HIV-1 gp41 glycoprotein, harbors a tyrosine-based (YSPL) signal involved in targeting both viral particles and the glycoprotein at the basolateral domain of polarized epithelial cells and in downmodulation of the glycoprotein from the cell surface via endocytosis. The dual role of the signal renders complex the analysis of its role in viral replication and assembly.

The main goal of this study was to delineate the molecular determinants responsible for the polarized targeting and for the endocytosis of the glycoprotein present at the cell surface. An alanine scan mutagenesis was performed on the glycoprotein intracytoplasmic region, encompassing the tyrosine, in an effort to separate endocytic from basolateral targeting signal. Substitution of the glycine residue preceding the tyrosine increased steady-state levels of the glycoprotein at the cell surface, suggesting loss of endocytic signal, while basolateral targeting remained unaffected. In contrast, other amino acids substitutions, except for that of the critical tyrosine residue, resulted in a loss of basolateral targeting while level of glycoprotein at the cell surface was essentially unaffected. Interestingly, a punctuate distribution of the capsid proteins was noticed in presence of glycoproteins that retained the basolateral targeting in polarized MDCK-T4/R4 cell line.

The second part of our study showed that two mutant glycoproteins, the first mutant named TM-HA, which is a chimeric protein obtained by replacing the MSD of gp41 by the one of the HA protein of the influenza virus and the second mutant which has a deletion of an isoleucine in position 642 of the ectodomain (mutant $\Delta I642$) and who had also lost gp120 maturation, had both lost the ability to infect cell. The next step was to determine if these two mutant glycoproteins,

TM-HA and Δ I642, could abolish viral infectivity in presence of WT glycoprotein. The results also showed that both mutant glycoproteins were able to bind to intracellular CD4, which suggested that fusion inhibition was post-CD4 binding. An entry assay using the β -lactamase-Vpr (BlaM) fusion protein showed that both virus mutants were unable to enter the cell, most probably due to a defect in fusogenic activity. We also showed that both mutant glycoproteins, TM-HA and Δ I642, were dominant-negative mutants that abolished viral infectivity in presence of WT envelope by forming hetero-oligomers.

Overall, these results indicate that it is possible to separately alter and modulate the different phenotypes conferred by the intracytoplasmic domain of HIV-1 envelope glycoprotein to further examine their roles in HIV-1 replication and pathogenesis. This study also showed that both changes, in the ectodomain or the MSD of gp41, can inhibit membrane fusion.

Key words: endocytosis; polarized budding; epithelial cell; HIV-1; glycoprotein; dominant-negative mutant; fusion

Table des matières

Identification du jury.....	ii
Sommaire.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures.....	xii
Liste des abréviations.....	xiv
Dédicace.....	xvi
Remerciements.....	xvii
CHAPITRE 1 : REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	1
<u>1. Introduction</u>	2
<u>2. Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA)</u>	4
<u>2.1 Origine</u>	4
<u>2.2 Pathogenèse, immunité et estimation mondiale de l'épidémie</u>	5
<u>2.3 Thérapies</u>	11
<u>3. Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)</u>	15
<u>3.1 Taxonomie</u>	15
<u>3.2 Structure</u>	16
<u>3.3 Génome viral</u>	16
<u>3.4 Cycle de réplication</u>	21
<u>3.4.1 Récepteurs et co-récepteurs</u>	24
<u>3.4.2 Transcription inverse</u>	25
<u>3.4.3 Intégration</u>	31
<u>3.4.4 Synthèse de l'ARN génomique viral</u>	33
<u>3.4.5 ARNm viraux et synthèse protéique</u>	34
<u>3.5 Gag / Gag-Pro-Pol</u>	35
<u>3.5.1 Synthèse</u>	35
<u>3.5.2 Modifications durant la synthèse</u>	36

<u>3.5.3 Protéines obtenues suite à la maturation du précurseur Pr55^{Gag}</u>	37
3.5.3.1 Protéine de la matrice (MA) p17	37
3.5.3.2 Protéine de la capsid (CA) p24	37
3.5.3.3 Protéine de la nucléocapsid (NC) p9	40
3.5.3.4 Protéine p6	40
<u>3.6 Les glycoprotéines d'enveloppe virales</u>	40
<u>3.6.1 Synthèse, assemblage et maturation</u>	41
3.6.1.1 Synthèse	41
3.6.1.2 Assemblage	42
3.6.1.3 Maturation	43
<u>3.6.2 Rôles et propriétés de la glycoprotéine virale de surface : la gp120</u>	46
<u>3.6.3 Rôle des différents domaines de la glycoprotéine transmembranaire : gp41</u>	47
3.6.3.1 Ectodomaine	47
3.6.3.2 Domaine transmembranaire	50
3.6.3.3 Domaine cytoplasmique	51
<u>3.7 Assemblage et bourgeonnement</u>	53
<u>3.7.1 Ciblage à la membrane plasmique : Domaine M</u>	54
<u>3.7.2 Multimérisation : Domaine I</u>	54
<u>3.7.3 Bourgeonnement : Domaine L</u>	56
<u>3.8 Relâche de la particule virale</u>	57
<u>3.8.1 Compartiments intracellulaires : Corps multivésiculaires (MVBs)</u>	57
3.8.1.1 Rôle de l'ubiquitine	60
3.8.1.2 Rôle des protéines de la classe E	61
<u>3.8.2 Relâche à la membrane plasmique</u>	63
3.8.2.1 Relâche aux domaines apical et basolatéral	63
3.8.2.2 Radeaux lipidiques (lipid rafts)	64
<u>4. Mécanismes d'internalisation des protéines membranaires</u>	67
<u>4.1 Clathrine vs Cavéoles</u>	67
<u>4.2 Clathrine</u>	68

4.2.1 Structure et assemblage.....	69
4.3 Adaptines.....	72
4.3.1 Structure et types.....	72
4.3.2 Fonction du complexe et des sous-unités.....	75
4.4 Dynamine.....	76
4.4.1 Structure et rôle.....	76
4.5 Internalisation des glycoprotéines.....	78
4.5.1 Glycoprotéines cellulaires.....	78
4.5.2 Glycoprotéines virales.....	82
4.5.2.1 Protéines rétrovirales.....	83
5. Polarisation.....	85
5.1 Cellules polarisées.....	85
5.2 Types de cellules polarisées.....	86
5.3 Cellules épithéliales polarisées.....	88
5.3.1 Structure.....	88
5.3.2 Domaines membranaires des cellules épithéliales polarisées.....	92
5.3.3 Modèle de cellules polarisées utilisées.....	97
5.4 Ciblage des protéines membranaires dans les cellules épithéliales polarisées.....	99
5.4.1 Motifs associés au domaine apical.....	99
5.4.2 Motifs associés au domaine basolatéral.....	100
5.4.3 Transcytose.....	105
6. Implication des domaines transmembranaire et cytoplasmique des glycoprotéines virales dans l'infectivité et la pathogenèse virale.....	111
6.1 Paramyxovirus : virus Sendai, virus de la rougeole et virus respiratoire syncytial (RSV).....	111
6.1.1 Virus Sendai.....	111
6.1.2 Virus de la rougeole.....	112
6.1.3 Virus respiratoire syncytial (RSV).....	113
6.2 Rétrovirus : oncoretrovirus et lentivirus.....	114
6.2.1 Oncoretrovirus.....	114

6.2.1.1 Virus de la leucémie bovine (BLV).....	114
6.2.1.2 Virus de la leucémie à cellule T humaine de type 1 (HTLV-1).....	114
6.2.1.3 Virus de la leucémie murine (MLV).....	115
<u>6.2.2 Lentivirus</u>	115
6.2.2.1 Virus de l'immunodéficience simienne (VIS).....	115
6.2.2.2 Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1).....	117
<u>6.3 Filovirus : Marburg et Ebola</u>	118
<u>7. Problématique et buts du projet de recherche</u>	119
CHAPITRE 2 (ARTICLE 1) : Sequence Context Modulates Activity of Dual Basolateral/Endocytosis YXXØ Signal of HIV-1 gp41 Intracytoplasmic Domain.	122
CHAPITRE 3 (ARTICLE 2) : Two different forms of fusion-defective HIV-1 transmembrane glycoprotein, gp41, can act as trans-dominant inhibitors of infectivity conferred by the wild type glycoprotein.....	170
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	209
CHAPITRE 5 : CONCLUSIONS ET CONTRIBUTIONS MAJEURES...	228
CHAPITRE 6 : RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	234
CHAPITRE 7 : APPENDICE 1 (ARTICLE 3) : CD4/CXCR4 co-expression allows productive human immunodeficiency virus type 1 infection in canine kidney MDCK cells: effect of Vpu and Nef in polarized epithelial cells.....	299

Liste des tableaux

- Page 12 : Tableau I : Résumé représentant les principaux médicaments anti-rétroviraux présentement commercialisés.
- Page 80 : Tableau II : Résumé des différentes fonctions remplies par les adaptines AP-1 et AP-2 et leurs sous-unités lors de l'internalisation des protéines cellulaires ou virales.
- Page 103 : Tableau III : Résumé des différentes fonctions des adaptines AP-1, AP-3 et AP-4 et de leurs sous-unités lors de l'internalisation des protéines cellulaires ou virales.

Liste des figures

- Page 6 : Figure 1 : Représentation des étapes qui mènent au développement du SIDA suite à l'infection par le VIH-1.
- Page 17 : Figure 2 : Représentation schématique du VIH-1.
- Page 19 : Figure 3 : Représentation du génome viral de différents lentivirus.
- Page 22 : Figure 4 : Représentation schématique du cycle de réplication du VIH-1.
- Page 26 : Figure 5 : Représentation des étapes menant à la fusion entre la membrane et l'enveloppe virale lors de l'infection par le VIH-1.
- Page 28 : Figure 6 : Représentation schématique des différentes étapes de la transcription inverse lors de la réplication du VIH-1.
- Page 38 : Figure 7 : Représentation schématique de la particule virale immature et mature du VIH-1.
- Page 44 : Figure 8 : Schéma représentant le précurseur de l'enveloppe, la gp160 (gp120 et gp41).
- Page 48 : Figure 9 : Représentation des peptides synthétiques N36 et C34 de la gp41.
- Page 58 : Figure 10 : Représentation de la relâche de la particule virale à la membrane plasmique et de la relâche aux corps multivésiculaires (MVBs).
- Page 65 : Figure 11 : Représentation schématique d'un radeau lipidique, d'une cavéole et d'une vésicule de clathrine.
- Page 70 : Figure 12 : Représentation schématique de la clathrine et de ses différentes chaînes.
- Page 73 : Figure 13 : Représentation schématique des quatre familles d'adaptines et de leurs différentes sous-unités.
- Page 89 : Figure 14 : Représentation schématique d'un modèle classique de cellule épithéliale provenant de l'intestin.
- Page 94 : Figure 15 : Représentation schématique du transport intracellulaire des protéines.
- Page 106 : Figure 16 : Représentation des mécanismes de transmission *in utero* du VIH.

Page 230 : Figure 17 : Schéma récapitulatif représentant les domaines de la gp41 ainsi que les positions et fonctions des acides aminés étudiés.

Liste des abréviations

A :	Acide aminé Alanine
AAV :	Vecteur "adeno-associated viral"
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AP :	"Adaptor protein"
ARN :	Acide ribonucléique
BLV :	Virus de la leucémie bovine
CA :	Protéine de la capsid
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
COP :	"Coatomer protein"
CPI :	Complexe de pré-intégration
ELISA :	"Enzyme-linked immunosorbant assay"
F :	Protéine de fusion (paramyxovirus)
G :	Acide aminé Glycine
Gag :	"Group antigen"
GalCer :	Galactosyl céramide
Gp :	Glycoprotéine
H :	Protéine hémagglutinine (paramyxovirus)
HA :	Protéine hémagglutinine (virus influenza)
HTLV-I,II :	Virus de la leucémie (lymphotropique) T humaine de type 1 et 2
IL-2 :	Interleukine 2
L :	Acide aminé Leucine
LDL :	"Low density lipoprotein"
LLP1,2 :	"Lentivirus lytic peptide" 1 et 2
LTR :	"Long terminal repeat"
M6P :	Mannose-6-phosphate
MA :	Protéine de la matrice
MDCK :	"Madin Darby Canine Kidney"
MLV :	Virus de leucémie murine
MSD :	"Membrane-spanning domain"
MVB :	Corps multivésiculaire ("multivesicular body")
Nef :	"Negative factor"
NK :	"Natural killer"

Liste des abréviations (suite)

P :	Acide aminé Proline
PBMC :	"Peripheral Blood Mononuclear Cells"
Q :	Acide aminé Glutamine
R :	Acide aminé Arginine
RE :	Réticulum endoplasmique
RSV :	Virus respiratoire syncytial ou virus du sarcoma de Rous
S :	Acide aminé Serine
SIDA :	Syndrome d'immunodéficience humaine acquise
SNARE :	"SNAP-Receptor (v-vesicule) (t-target)"
SRP :	"Signal recognition protein"
TGN :	"Trans Golgi Network"
TM :	Partie transmembranaire de la glycoprotéine
V :	Acide aminé Valine
V1-V5 :	Région variable 1 à 5
VIH-1,2 :	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et 2
VIS :	Virus de l'immunodéficience simienne
VLP :	"Virus-like particle"
VSV-G :	Virus de la stomatite vésiculaire (glycoprotéine G)
Y :	Acide aminé Tyrosine

À mes parents, pour leur soutien constant

"À vaincre sans péril on triomphe sans gloire"

Pierre Corneille

*"Notre plus grande gloire n'est pas de ne jamais
tomber mais de nous relever après chaque chute..."*

Confucius

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier le docteur Guy Lemay qui m'a donné ma première chance lors d'un stage d'été. L'expérience ne doit pas avoir été trop traumatisante car, bien qu'il ait pris un repos de deux ans le temps que je termine une maîtrise ailleurs, il m'a de nouveau accueilli dans son laboratoire pour que j'effectue mes études doctorales. Je tiens également à remercier mon co-directeur, le docteur Éric Cohen, pour son accueil au sein de l'équipe du laboratoire de rétrovirologie. Je tiens particulièrement à vous remercier tous les deux pour votre soutien, autant moral que financier, tout au long des mes études et de m'avoir permis de participer à différents congrès. Vous m'avez inculqué une rigueur scientifique qui me sera très utile sur le marché du travail.

Bien sûr, lorsqu'on travaille aussi longtemps à un endroit on côtoie bien des gens qui deviennent un peu une seconde famille. Je tiens à remercier le personnel technique très compétent avec qui j'ai eu la chance de travailler : Carole Danis, Johanne Mercier et Nicole Rougeau. Merci de votre patience à chaque fois que vous avez entendu "J'ai une question!", spécialement à mon arrivée au laboratoire. Je voudrais également saluer et remercier tout d'abord l'équipe du docteur Lemay. Un merci chaleureux à mon amateur de sport préféré, Martin Bisailon, pour son encadrement lors de mon stage et bien sûr pour toutes les discussions sportives que nous avons eues. Merci également à Guillermo, Nick "ti-Gilles", Penny, Sapha, Sandra, Etienne et Fred pour les nombreux moments de folie lors des pauses café. Je tiens également à remercier Robert "Bob" Lodge pour son étonnante mémoire et pour le fait qu'il n'ait jamais hésité à répondre à mes questions, concernant le projet "polarisation", même après toutes ces années loin du laboratoire. Je tiens également à remercier les gens de l'équipe du docteur Cohen, les anciens de qui je garde un excellent souvenir, et ceux de l'équipe actuelle avec qui j'ai eu le plaisir de participer à plusieurs activités "parascolaires"!! Vous vous reconnaissez !! J'espère sincèrement avoir l'occasion de retravailler avec vous.

Je tiens également et surtout à remercier mes parents et ma famille. Merci pour votre soutien à tous les niveaux lors des moments les plus difficiles. Je

n'aurai jamais assez de toute une vie pour vous rendre ne serait-ce que la moitié de ce vous m'avez apporté tout au long de mes études. Un salut tout spécial à ma mère pour la belle leçon de courage et de combativité!

Mes études auraient été difficiles sans le soutien financier particulièrement de mes patrons et du Département de microbiologie et d'immunologie, grâce aux bourses attribuées aux étudiants du cycle supérieur.

Enfin, j'aimerais également remercier les chercheurs ainsi que le personnel présents au Département de microbiologie et d'immunologie pour leur aide ainsi que les étudiants gradués du département que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant mes études. J'aimerais finalement remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer cette thèse.

CHAPITRE 1 :
REVUE DE LA
LITTÉRATURE

1. Introduction

Depuis plus de 20 ans, des scientifiques à travers le monde unissent leurs efforts afin de mieux comprendre le VIH-1 et de développer de nouvelles thérapies qui permettront d'enrayer l'épidémie du SIDA. À ce jour, il existe un bon nombre de thérapies qui permettent de ralentir la progression de la maladie mais aucune ne permet d'éliminer le virus chez les patients infectés. Ceci s'explique en partie par la haute fréquence de mutations chez certains gènes du VIH-1 et par le fait que le génome viral s'intègre au génome de la cellule infectée.

Afin de développer des thérapies plus efficaces, une meilleure compréhension des étapes menant à la synthèse de la particule virale est essentielle. Le VIH-1, comme tous les virus, est un parasite qui doit utiliser la machinerie de la cellule hôte afin d'assurer sa survie. L'assemblage des protéines responsables de la formation de la particule virale dépend de la présence de plusieurs protéines cellulaires. C'est tout aussi vrai pour le bourgeonnement et la relâche du virus qui dépendent également de la machinerie cellulaire. En effet, la composition lipidique et protéique des domaines membranaires de la cellule influence le transport à la fois de la particule virale et de ses glycoprotéines. Cette dernière est également responsable de la relâche du virus à des endroits spécifiques de la cellule^(248, 322). Le transport de la particule virale est également influencé par certaines séquences en acides aminés spécifiques qui sont présentes dans les glycoprotéines virales⁽²⁴⁹⁾. C'est l'interaction de ces séquences avec des protéines cellulaires qui permettront le ciblage spécifique des glycoprotéines virales à des domaines de la membrane plasmique des cellules épithéliales polarisées⁽¹⁴⁾.

La machinerie cellulaire est également impliquée dans la maturation des glycoprotéines virales du VIH-1. C'est ainsi qu'en l'absence des protéases cellulaires, responsables du clivage des glycoprotéines gp160, ces dernières ne peuvent assurer l'infection d'autres cellules cibles. L'internalisation des glycoprotéines virales non-incorporées dans la particule virale joue un rôle dans la pathogenèse virale en limitant la quantité de glycoprotéines virales à la surface de la cellule. De ce fait, elle facilite la relâche du virus et évite la surinfection et la



reconnaissance par le système immunitaire. L'internalisation se fait également par l'intermédiaire des protéines cellulaires⁽¹⁷⁷⁾.

Cette revue de la littérature se veut être un résumé des connaissances actuelles sur les éléments viraux et cellulaires impliqués dans l'assemblage, le bourgeonnement et la relâche du VIH-1. Tout au long de cette revue, l'emphase sera mise sur la biologie de la glycoprotéine d'enveloppe virale.

2. Le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA)

Bien que ce chapitre porte majoritairement sur la biologie du virus, il semble tout d'abord approprié d'énoncer quelques notions relatives à l'épidémie du SIDA.

2.1 Origine

Depuis son apparition au début des années 1980, le SIDA suscite toujours autant de discussions et de questionnement dans la communauté scientifique quant à son origine. Les premiers cas de SIDA sont apparus aux États-Unis, en 1980, parmi la population d'hommes homosexuels vivants à New York et à San Francisco. Les patients développaient des infections opportunistes rares ainsi que des cancers résistants à toutes formes de traitements.

Plusieurs données de la littérature montrent que les rétrovirus humains existaient probablement déjà au début des années 1900. Cependant, il a fallu attendre jusqu'en 1980 avant que les premiers exemples soient identifiés. Par la suite, les études n'ont cessé de s'accumuler. On doit l'identification du premier rétrovirus humain à l'équipe du docteur Gallo. Ce rétrovirus, nommé HTLV (human T-leukemia virus) à cause de son tropisme pour les lymphocytes T, a par la suite été identifié comme étant l'agent responsable de la leucémie à cellules T chez l'adulte^(339, 340). Jusqu'à maintenant, deux groupes distincts de rétrovirus humains ont été identifiés; les rétrovirus à leucémie (HTLV-I et HTLV-II) ainsi que les rétrovirus à immunodéficience (VIH-1 et VIH-2)⁽¹²⁷⁾. Le VIH-1 a par la suite été identifié comme étant l'agent étiologique responsable de l'épidémie du SIDA à travers le monde^(23, 343). Des études sérologiques suggèrent que le berceau du VIH-1 se trouve en Afrique centrale. Par la suite, un second rétrovirus humain, VIH-2, a été identifié principalement chez les populations d'Afrique de l'ouest^(74, 75). Bien qu'étant le seul autre rétrovirus humain, le VIH-2 s'apparente plus au virus d'immunodéficience simien (VIS) présent chez les macaques en captivité qu'au VIH-1, et il est très différent au niveau génétique du VIH-1^(7, 133, 160). Même s'il est clair que le VIH-1 est responsable du SIDA, il existe quelques hypothèses dans la littérature sur l'origine exacte de ce syndrome. Si on fait abstraction des

hypothèses les plus loufoques, l'hypothèse de la transmission du virus suite à une campagne de vaccination contre le virus de la poliomyélite, tenue dans la République démocratique du Congo entre 1957 et 1960, semblait la plus plausible. Il semble que le vaccin, fabriqué à l'aide de cellules de chimpanzés séjournant dans la région, aurait été contaminé par des particules de rein de chimpanzés contaminées par le VIS. Cependant, cette hypothèse a vite été remise en question en 2004⁽⁴⁷⁹⁾. Des études ont démontré que les chimpanzés de la République démocratique du Congo, région où la vaccination a eu lieu, sont bien infectés par une souche de VIS mais cette souche est totalement différente au niveau phylogénétique des souches connues du VIH-1. Il semble toutefois certain que les souches variantes, réparties dans les groupes M, N et O, connues du VIH-1 sont toutes liées à une espèce de chimpanzés native de l'Afrique centrale^(394, 479). L'hypothèse qui demeure à ce jour la plus plausible repose sur le concept "bushmeat hunting". En effet, l'exode des populations africaines dans la forêt durant la seconde guerre mondiale aurait contribué à la transmission du virus du chimpanzé à l'homme. Le nombre élevé d'individus ayant recours à la chasse pour subvenir à leurs besoins et les techniques de chasse auraient facilité la transmission du virus⁽⁶⁷⁾.

2.2 Pathogénèse, immunité et estimation mondiale de l'épidémie

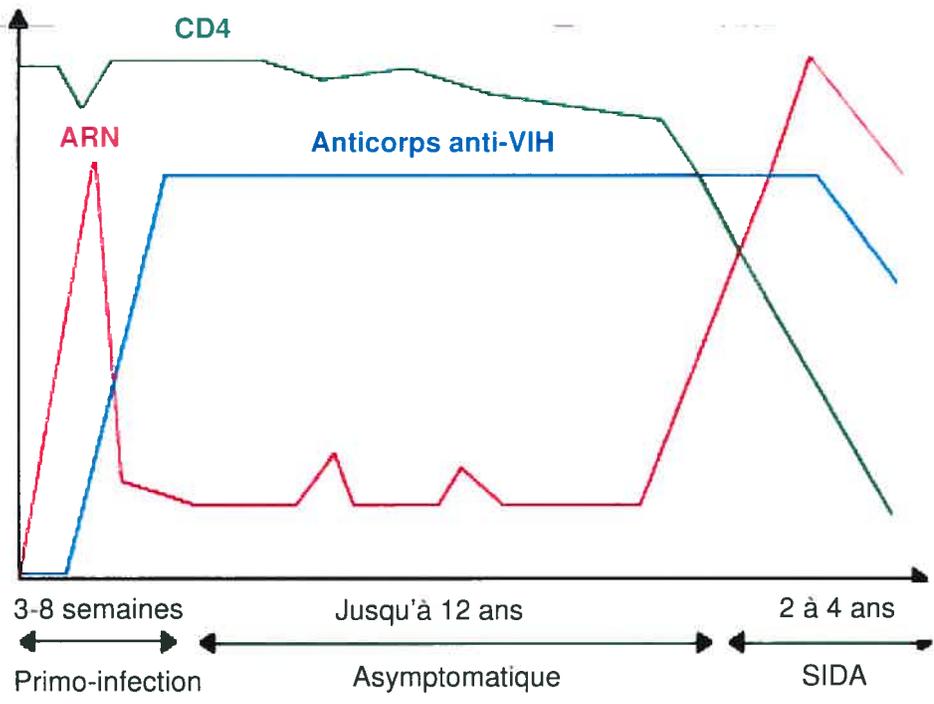
Le VIH-1 peut infecter plusieurs types de cellules chez son hôte. Parmi les nombreux types cellulaires qui supportent l'infection par le VIH-1 *in vitro*, il est possible d'inclure : les cellules dendritiques du sang périphérique, les cellules NK, les cellules de Langerhans, les cellules CD8⁺, les astrocytes, les cellules épithéliales rénales, les cellules des muqueuses rectale et vaginale ainsi que plusieurs tissus provenant des poumons, du foie, des testicules et des glandes salivaires. Cependant, les deux seuls types de cellules constamment infectés par le VIH-1, *in vivo*, sont les lymphocytes T CD4⁺ ainsi que les macrophages^(240, 365).

La succession d'événements qui conduisent au développement du SIDA suite à l'infection par le VIH-1 peut se décrire en trois étapes (Figure 1). La première a lieu durant les premiers mois qui suivent l'infection de l'individu par le

Figure 1

Page 6

Représentation des étapes qui mènent au développement du SIDA suite à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). La figure a été tirée de Coffin, J.M., Hughes, S.H. et Varmus, H.E. 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 812 pages, puis elle a été adaptée pour les besoins de la revue.



VIH-1 et se nomme la primo-infection. Elle se caractérise par un syndrome aigu mononucléosique et une diminution du niveau des lymphocytes CD4⁺ qui peut être accompagnée par de la fièvre et des douleurs musculaires⁽⁴²⁹⁾.

Lors de l'entrée initiale du VIH-1 dans l'organisme, le système n'est pas prêt à le combattre ce qui permet au virus de se répliquer en abondance. La charge virale est donc très élevée et elle peut être détectée dans le sang dans les trois semaines suivant l'infection⁽⁷²⁾.

La primo-infection est suivie de la phase de latence. Cette phase débute lorsque le système immunitaire se met en branle. Cette période se caractérise par le peu ou l'absence de manifestations cliniques ainsi que par la diminution constante du nombre de lymphocytes CD4⁺. Bien que cette phase soit considérée comme asymptomatique, il est possible d'observer une réplication constante du virus de même qu'une progression de la maladie et d'isoler des cellules infectées dans les ganglions⁽³²⁵⁾.

Cette phase précède la phase dite SIDA, période où la maladie se déclare. La période de latence varie énormément d'un patient à l'autre. Ceux chez qui la maladie progresse rapidement deviendront sidatiques en deux ou trois ans, alors qu'il peut s'écouler en moyenne 10 ans pour ceux qui progressent lentement vers la maladie. De façon générale la période de latence a augmenté au cours des dernières années, probablement en raison d'une meilleure prophylaxie contre les infections opportunistes et des nombreuses thérapies antirétrovirales^(234, 235, 392). Il existe également une classe de patients qui sont infectés depuis 14 et même 18 ans. Chez ces patients, qualifiés de "long-term non-progressors", la maladie n'a pas évolué. Ces derniers sont répartis dans plusieurs cohortes d'études à travers le monde. Cependant, c'est à Sydney en Australie que l'on retrouve la première cohorte qui a permis d'établir les critères définissant ces patients. Ces patients ne présentent aucun symptôme et ils ont un compte de lymphocytes CD4⁺ stable. De plus, il a été démontré que ces derniers ont été infectés par une souche virale défective pour la protéine Nef⁽⁹⁵⁾.

Bien que le système immunitaire parvienne à contrebalancer le niveau de lymphocytes CD4⁺ détruits par l'infection, tôt ou tard il y a un point de non retour où la quantité de lymphocytes CD4⁺ diminue à un point tel (moins de 200 cellules/ μ l) que le patient devient susceptible aux infections opportunistes associées au SIDA⁽⁷⁸⁾. L'apparition de zona, de pneumonies ou d'autres infections pulmonaires, d'infection par le virus herpès, d'infections fongiques ainsi que l'apparition du sarcome de Kaposi ou l'identification de manifestations neurologiques sont toutes de bonnes indications que le patient est maintenant dans la phase SIDA⁽⁷⁸⁾.

Le système immunitaire est le mécanisme de défense de l'organisme contre la maladie. Il protège contre l'invasion d'organismes étrangers tels : les bactéries, les virus, les champignons, les parasites ainsi que contre les cellules cancéreuses. Généralement, le système immunitaire est en mesure d'identifier un corps étranger et de l'éliminer. Il est également en mesure de le reconnaître et de se défendre contre ce dernier s'il envahit de nouveau l'organisme. Afin d'y parvenir, le système immunitaire dispose d'une multitude de composantes. Parmi ces composantes, il y a les leucocytes ou "globules blancs" contenus dans les ganglions lymphatiques. Il existe plusieurs types de leucocytes dont les cellules dendritiques, les mastocytes, les cellules mononucléaires (monocytes et macrophages) et les lymphocytes. Les lymphocytes sont les cellules du système immunitaire les plus touchées lors d'une infection au VIH⁽³⁶⁵⁾. De plus, l'expression du récepteur CD4 est réduite, chez les lymphocytes infectés, par la présence de la gp120 qui lie la partie extracellulaire de CD4 et forme des complexes gp120-CD4 intracellulaires⁽¹⁷⁾. La présence de la protéine Vpu ou de la protéine Nef contribue également à réduire le niveau de CD4 à la surface cellulaire. Ceci a pour effet d'éviter une surinfection en réduisant à la fois le niveau d'enveloppe et de récepteur à la surface cellulaire^(12,26,63). Cette diminution d'expression de CD4 réduit également les interactions de CD4 avec le CMH de classe II. Ceci engendre une réponse spécifique plus faible du système face aux antigènes du VIH qui infectent les lymphocytes CD4⁺ mémoires⁽³⁸⁸⁾.

Les macrophages sont également susceptibles à l'infection au VIH et tout comme les lymphocytes T CD4⁺, les macrophages peuvent servir de réservoirs

pour le virus en période de latence⁽¹²⁸⁾. Puisque les macrophages, infectés par une grande quantité de virus, peuvent se retrouver dans le système nerveux central sans l'activation de cytokines, le cerveau devient donc un sanctuaire pour le VIH^(275,478). La progression de la maladie entraîne un dérèglement des macrophages auquel est associé une surproduction de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines à même le système nerveux central, ce qui cause une démence associée au VIH^(151, 442).

Les lymphocytes T CD8⁺ sont également touchés lors d'une infection au VIH. Leur nombre chute lors de la primo-infection, augmente durant la phase latente de la maladie^(81, 144) et chute à nouveau lors de la phase SIDA⁽¹²⁵⁾.

L'activation polyclonale aberrante des cellules B est la première anomalie immunologique qui peut être notée suite à l'infection au VIH et elle peut s'expliquer par l'hyperplasie des ganglions lymphatiques associée à l'infection au VIH⁽²²⁶⁾. Cette prolifération est de courte durée et, rapidement, le nombre de cellules B diminue au cours de l'infection. Cette perte peut être associée à celle des lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires qui sont critiques pour le bon fonctionnement des cellules B⁽⁷⁸⁾.

Depuis quelques années, les Nations Unies en collaboration avec l'Organisation Mondiale de la Santé produisent un rapport faisant état du nombre d'individus infectés par le VIH-1 ainsi que des nouveaux cas d'infection, et ce, à travers la planète. Selon les dernières estimations datant de décembre 2004, il y a présentement environ 39 millions de personnes qui vivent avec le VIH/SIDA et environ 4,9 millions de nouveaux cas d'infection ont été répertoriés. En 2004, l'épidémie a fait plus de trois millions de victimes à travers le monde. Le nombre de personnes vivant avec le VIH ne cesse de s'accroître dans toutes les régions du monde. Une forte augmentation de cas a été recensée en Asie de l'Est, en Europe orientale et en Asie centrale. De toutes les régions, l'Afrique subsaharienne demeure la région la plus touchée, la seconde étant les Caraïbes. Un peu moins de la moitié des personnes vivant avec le VIH sont de sexe féminin. En 2004, il y a eu plus de 60 000 nouveaux cas d'infections en Amérique

du Nord ainsi qu'en Europe occidentale et la majorité de ces nouveaux cas d'infection sont dûs aux rapports non protégés entre hétérosexuels⁽³¹⁴⁾.

2.3 Thérapies

La meilleure façon de traiter le VIH consiste à combiner au moins trois médicaments anti-rétroviraux, ce traitement est souvent qualifié de multithérapie anti-rétrovirale ou HAART (Highly Active AntiRetroviral Therapy). Les principaux médicaments anti-rétroviraux présentement disponibles sont énumérés au Tableau I. Les patients infectés qui vivent dans les pays où ces médicaments sont accessibles disposent donc de thérapies à combinaisons multiples qui permettent de contenir l'infection. La multithérapie la plus classique, ou trithérapie, consiste à combiner deux inhibiteurs de la transcriptase inverse avec un inhibiteur de la protéase virale. Ces cibles thérapeutiques seront décrites en détails plus loin. Toutefois, cette multithérapie présente des inconvénients qui sont de plus en plus présents, lorsque le traitement se prolonge. Tout d'abord, la majorité de ces médicaments causent de graves effets secondaires lorsqu'ils sont ingérés individuellement, leur combinaison ne fait qu'accroître ces effets. De plus certains patients ont de la difficulté à respecter l'horaire contraignant de la prise des médicaments que leur impose la multithérapie. Finalement, il arrive que les médicaments perdent leur efficacité chez les personnes soumises à la thérapie depuis longtemps. Parmi ces personnes, certaines ne disposent plus d'aucune autre option thérapeutique. Le traitement contre le VIH ne fait pas appel qu'à la prise de médicaments, il est reconnu que la malnutrition peut favoriser la progression de la maladie et l'exercice peut également contribuer à améliorer la qualité de vie des personnes infectées⁽²²⁵⁾.

Les coûts élevés et les effets secondaires associés aux médicaments utilisés pour traiter le VIH font que l'élaboration d'un vaccin contre le VIH devient une priorité mondiale. Le développement d'un vaccin préventif, qui permettrait le développement d'une immunité efficace contre l'infection au VIH, constituerait la solution idéale. De façon plus réaliste, un vaccin thérapeutique limitant la réplication du virus chez l'individu infecté entraînerait ainsi un délai dans la

Tableau I

Page 12

Résumé représentant les principaux médicaments anti-rétroviraux présentement commercialisés. Ces informations ont été tirées du "AIDS info", un site internet élaboré par le Département américain des affaires humaines et de la santé. (http://aidsinfo.nih.gov/drugs/drugsdetail.asp?rec_id=164)

Inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse	3TC (Epivir, Lamivudine) AZT (Retrovir) d4T (Zerit) ddC (Hivid) Abacavir (Ziagen) ddl (Videx) AZT/3TC (Combivir) AZT/3TC/Abacavir (Trizivir) Abacavir/Lamivudine (Epzicom) Zidovudine (Retrovir, AZT)
Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse	Delavirdine (Rescriptor) Névirapine (Viramune) Enfavirez (Sustiva)
Inhibiteurs nucléotidiques de la transcriptase inverse	Ténofovir (appelé également Viread et PMPA)
Inhibiteurs de fusion	Enfuvirtide (T-20, Fuzeon)
Inhibiteurs de la protéase	<u>Amprenavir (Agenerase)</u> <u>Atazanavir (Reyataz)</u> <u>Fosamprenavir (Lexiva, 908)</u> <u>Indinavir (Crixivan)</u> <u>Lopinavir+Ritonavir (Kaletra)</u> <u>Nelfinavir (Viracept)</u> <u>Ritonavir (Norvir)</u> <u>Saquinavir (Fortovase, Invirase)</u> <u>Tipranavir (Aptivus)</u>

propagation de la maladie, limitant de ce fait le risque de transmission du virus⁽⁴¹³⁾. Les efforts pour développer un vaccin efficace contre le VIH ne datent pas d'hier. Depuis 15 ans, les scientifiques du monde ont tenté tant bien que mal de développer un vaccin. Bien qu'infructueuses, puisqu'à ce jour il n'existe aucun vaccin dont l'efficacité a été reconnue, leurs tentatives ont permis de recueillir un grand nombre de données en ce qui concerne les éléments requis pour qu'un vaccin puisse générer une bonne immunité⁽⁴¹³⁾. Les premières études visaient la glycoprotéine de surface, gp120, puisqu'elle représente la seule cible pour le développement d'anticorps neutralisants. L'utilisation de gp120 recombinante a permis de démontrer que les anticorps neutralisants générés, suite à l'immunisation avec cette dernière, n'étaient efficaces que contre la souche qui avait servi à l'immunisation^(25, 413). La majorité des experts s'entendent sur le fait que la vaccination avec la gp120 monomérique ne représente pas la meilleure alternative, puisque les anticorps générés sont incapables de neutraliser un virus provenant d'isolats primaires et qu'aucune réponse efficace en cellules T cytotoxiques n'est observée^(239, 279). Cependant, il n'en demeure pas moins que le seul vaccin en phase III d'étude clinique depuis 2003, est un vaccin qui combine deux protéines recombinantes, dérivées de la gp120, provenant de deux clades différentes. Toutefois les résultats préliminaires montrent que ce vaccin nommé AIDSVAX ne permet pas de protéger contre une infection au VIH⁽²⁶⁷⁾. L'incapacité de ce dernier à fournir une protection contre le virus vient entre autre de la forte glycosylation de la gp120, qui la protège contre les anticorps neutralisants⁽²⁶⁷⁾.

Des études réalisées sur des macaques vaccinés ont également permis de tirer plusieurs informations. En effet, il semble que la façon la plus efficace de contrôler la virémie serait d'utiliser un vaccin générant une bonne réponse en lymphocytes T cytotoxiques⁽³⁸⁷⁾. Un bon nombre de ces vaccins sont présentement testés. Parmi ceux-ci figure le vaccin à base de vecteur AAV (adeno-associated virus-based HIV vaccine) qui fait présentement l'objet d'une étude clinique de phase II^(267, 413). Un autre vaccin fait appel à l'utilisation d'un vecteur recombinant de la bactérie *Salmonella typhi* ou *Salmonella typhimurium* exprimant des antigènes du VIH. Ce dernier peut engendrer une immunité mucoale et systémique chez la souris et il est présentement à l'étude chez l'homme^(132, 395).

Au cours des dernières années les études, portant sur le développement d'un vaccin vraiment efficace contre le VIH, ont permis d'acquérir plusieurs informations pertinentes. Cependant plusieurs questions demeurent toujours sans réponse. En effet, même si le vaccin stimulant l'immunité cellulaire semble le meilleur choix, il n'en demeure pas moins que la production d'un vaccin générant des anticorps neutralisants ne doit pas être abandonnée, puisqu'une des caractéristiques du VIH est de pouvoir échapper au contrôle des lymphocytes T cytotoxiques du système immunitaire⁽⁴¹³⁾. Quant à l'immunité mucoale, il a été possible de noter la présence d'anticorps de type IgA, dans l'appareil génital de personnes non-infectées mais exposées au virus, capables de neutraliser le VIH et de possiblement fournir une protection contre l'infection⁽²⁰⁸⁾. Cependant, il a été démontré que chez les patients infectés, la réponse mucoale en IgA spécifique au VIH est plutôt faible⁽⁴⁷⁵⁾. On est donc encore très loin d'un consensus sur la meilleure stratégie à adopter pour le développement d'un vaccin contre le VIH/SIDA.

3. Virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

Cette section traitera des différentes étapes menant à la synthèse d'une nouvelle particule virale et ce en mettant particulièrement l'emphase sur les protéines de structure.

3.1 Taxonomie

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) fait partie de la sous-famille des Lentivirinae, du groupe des lentivirus. Ce groupe comprend également le VIH de type 2 ainsi que le virus de l'immunodéficience simienne (VIS). La sous-famille des Lentivirinae fait partie de la grande famille des Retroviridae. La banque internationale de données sur les différentes séquences du VIH-1 a permis de diviser celui-ci en trois groupes : M (Major), N (New) et O (Outlier). Le groupe M comprend la majorité des souches de VIH-1 qui sont présentes à travers le monde et il est possible d'y retrouver 11 sous-types différents, nommés de A à L selon la séquence de leurs enveloppes⁽³¹⁵⁾. Parmi ces sous-types il a été possible d'identifier des recombinants entre sous-types,

pour cette raison les sous-types E et I ont dû être classifiés en sous sous-types représentant les formes recombinantes en circulation^(278, 360).

3.2 Structure

Le VIH est un virus ayant un diamètre se situant entre 80 et 100nm. Ce virus possède deux copies d'un ARN simple brin de polarité positive. Le fragment d'ARN est également non-segmenté et il a une taille d'environ 10 kb. La membrane lipidique externe du virion incorpore les glycoprotéines virales exposées à sa surface (Figure 2). Le VIH fait partie des rétrovirus complexes puisqu'en plus des trois protéines de structure, Gag, Pol et Env, il possède également des protéines accessoires et de régulation. Une des grandes particularités des rétrovirus consiste en son mode de réplication, qui nécessite une étape de transcription inverse de l'ARN viral en ADN bicaténaire et l'intégration subséquente de cet ADN au génome de la cellule⁽⁴⁴¹⁾.

3.3 Génome viral

Tel que mentionné dans la section précédente, le VIH-1 est un rétrovirus complexe qui compte 15 protéines distinctes. Le VIH-1 possède un génome ayant neuf cadres de lecture (Figure 3). Parmi ces différents cadres de lecture, trois codent pour les polyprotéines Gag, Pol et Env qui, une fois clivées, représentent les protéines de structure communes à tous les rétrovirus. La polyprotéine Gag code pour les protéines suivantes : la matrice (MA) ou p17 qui représente le poids moléculaire de la protéine, la capsid (CA) ou p24, la nucléocapsid et la protéine p6. La polyprotéine d'enveloppe code pour une glycoprotéine de surface, la gp120, ainsi que pour une glycoprotéine transmembranaire, la gp41. Ces composantes constituent le corps ainsi que la membrane externe du virion⁽¹³⁵⁾. Le gène Pol code, quant à lui, pour la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT) et l'intégrase (IN). Ces protéines procurent les fonctions enzymatiques nécessaires à la réplication du virus et elles sont

Figure 2
Page 17

Représentation schématique du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Image tirée et adaptée de Gelderblom, H. R. 1997. Fine structure of HIV and SIV. Los Alamos National Laboratory (Ed) HIV Sequence Compendium, 31-44.

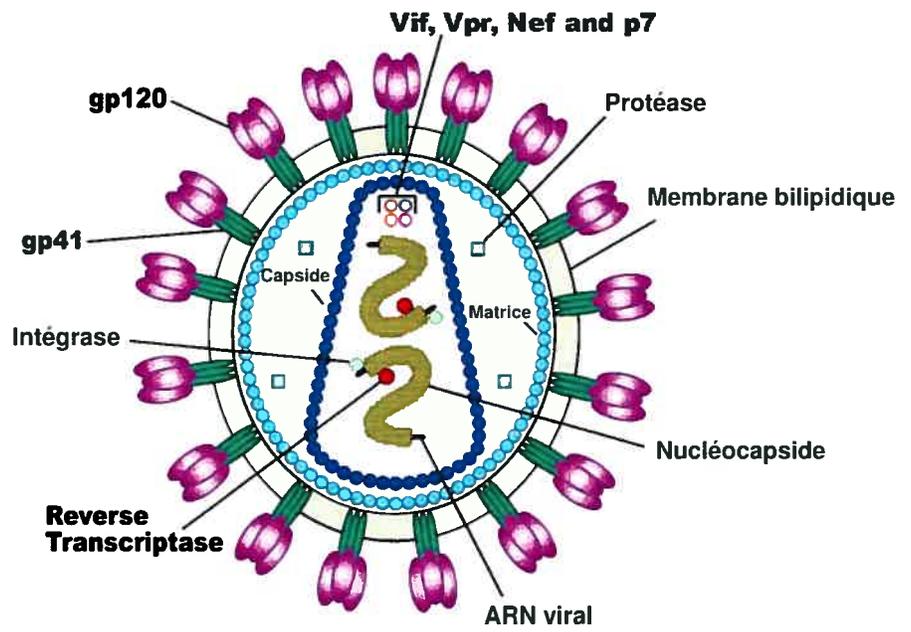
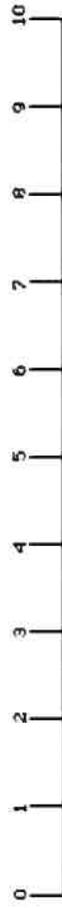
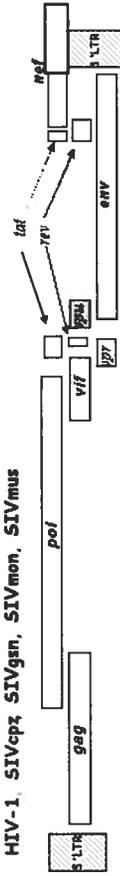


Figure 3
Page 19

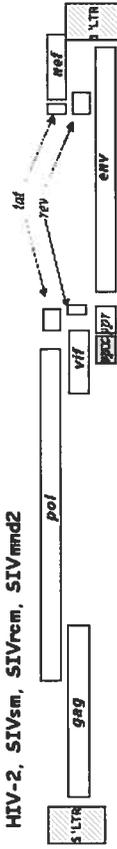
Représentation du génome viral de différents lentivirus dont le VIH-1, le VIH-2 et certaines souches de VIS. Ces schémas ont été tirés de Peeters, M. et Courgnaud, V. Overview of Primate Lentiviruses and Their Evolution in Non-human Primates in Africa. HIV sequence database (<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/REVIEWS/PEETERS2002/Peeters2002.html>).



HIV-1, SIVcpz, SIVgsn, SIVmon, SIVmus



HIV-2, SIVsm, SIVrcm, SIVmmd2



contenues à l'intérieur de la particule. Le génome du VIH-1 code pour six protéines supplémentaires dont quatre sont des protéines accessoires : Vpu, Nef, Vpr, Vif, alors que les deux autres sont des protéines de régulation : Tat et Rev⁽¹³⁵⁾.

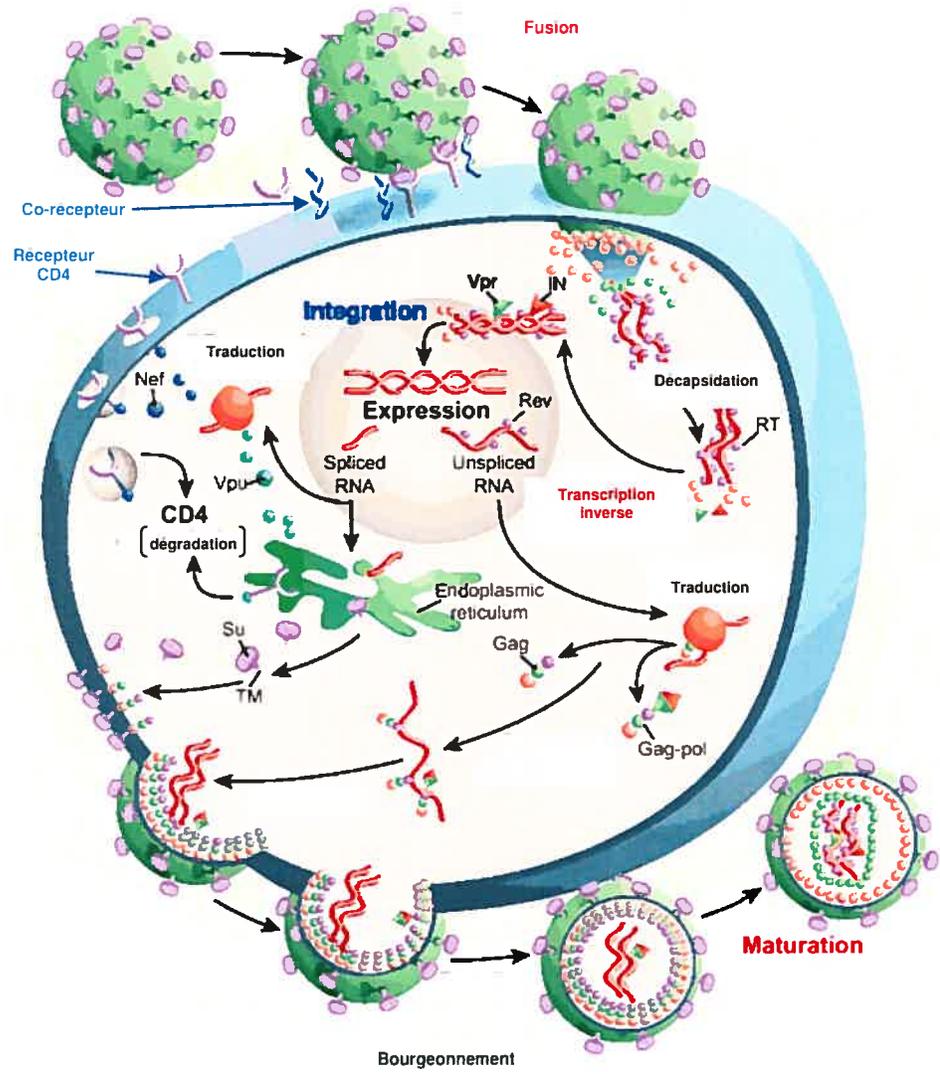
Bien que le VIH-2 et le VIS soient également des lentivirus il est possible de constater quelques différences au niveau de leurs génomes si on les compare à celui du VIH-1 (Figure 3). Le VIH-2 ne possède pas de protéine Vpu. Le rôle joué par la protéine Vpu, qui est de faciliter la relâche de la particule virale nouvellement synthétisée, serait joué par la protéine d'enveloppe chez le VIH-2⁽³⁶⁾. Dans le cas du VIS, il n'y a que chez les chimpanzés infectés par le VIScpz⁽⁴⁴⁴⁾ et les singes infectés par le VISgsn, par le VISmon ou par le VISmus que la protéine Vpu est présente^(82, 94). La protéine Vpu est remplacée par la protéine Vpx chez le VIH-2 ainsi que chez les souches de VIS suivantes : la souche VISsm, VISrcm, VISmnd-2 et la souche VISdrl^(94, 134, 172, 489). Cependant, la séquence en acides aminés de la protéine Vpx, présente chez le VIH-2, est très similaire à celle de la protéine Vpr. La similarité est tellement élevée qu'il a été suggéré que Vpx proviendrait d'une duplication de gène ancestral de Vpr présent chez le VIH-2⁽⁴³⁵⁾.

3.4 Cycle de réplication viral

Le cycle de réplication du VIH se divise en deux étapes : l'étape précoce et l'étape tardive. Chacune de ces étapes requiert l'utilisation de différentes protéines du VIH. L'étape précoce débute avec la reconnaissance de la cellule cible par la particule virale mature et se termine avec l'intégration de l'ADN génomique dans le chromosome de la cellule hôte. L'étape tardive, quant à elle, débute avec la régulation de l'expression du génome proviral intégré et se termine par le bourgeonnement et la maturation de la nouvelle particule synthétisée⁽⁴⁴¹⁾ (Figure 4).

Figure 4
Page 22

Représentation schématique du cycle de réplication du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). La figure tirée de : Pomerantz, R. et Horn, D.L. 2003. Twenty years of therapy for HIV-1 infection. *Nature Medecine* 9(7):867-873 a été adaptée pour les besoins de la revue.



3.4.1 Récepteurs et co-récepteurs

Le VIH-1 se lie de façon spécifique aux molécules CD4⁺ présentes à la surface des lymphocytes T. La molécule CD4 a un poids moléculaire de 60kDa et, de plus, elle s'exprime à la surface des monocytes et des macrophages. Elle est le récepteur principal du VIH-2 et de certaines souches de VIS^(183, 379). Cette liaison est possible grâce à l'interaction spécifique de la glycoprotéine de surface, la gp120, avec le domaine D1 situé dans la région amino-terminale de la molécule CD4. Cette interaction permet la liaison du virus au récepteur mais est insuffisante pour permettre l'infection de la cellule. Les lentivirus, contrairement aux autres rétrovirus, ont besoin d'autres protéines cellulaires ou co-récepteurs, qui permettent la fusion entre la membrane cellulaire et la membrane virale. Ces protéines cellulaires sont des récepteurs des chimiokines, les deux principaux sont le CXCR4 et CCR5⁽⁴⁴¹⁾. Le co-récepteur CXCR4 est spécifique aux virus dits T-tropiques, qui ont un tropisme pour les cellules T⁽³⁰³⁾, alors que le co-récepteur CCR5 a, quant à lui, une spécificité pour les virus M-tropiques qui peuvent infecter les monocytes et les macrophages^(8, 105).

En plus des co-récepteurs, il semble que la boucle V3 présente dans la glycoprotéine d'enveloppe gp120 soit un déterminant majeur du tropisme cellulaire^(190, 399). Elle aurait également un rôle à jouer dans le choix du co-récepteur utilisé par le virus^(359, 415). La liaison de CD4 à la gp120 entraîne un changement dans la structure formée par les boucles V1 et V2 de la gp120 qui favorise la liaison subséquente de l'enveloppe au co-récepteur CCR5⁽³⁵⁹⁾. D'autres co-récepteurs peuvent également jouer un rôle dans l'infection au VIH. A cet effet, il semble que l'expression du co-récepteur CCR3 sur les microglies, présentes dans le système nerveux central, facilite l'infection de ces cellules par le VIH⁽¹⁶⁵⁾.

Les premières études réalisées suggéraient que la molécule CD4 était présente seulement sur les lymphocytes T. Cependant, en 1990, les études de Collman et al⁽⁷⁹⁾ ont montré que les monocytes et les macrophages exprimaient un faible niveau de CD4 à leur surface, mais que ce dernier était suffisant pour l'infection du VIH. Cependant, pour une autre variété de cellules humaines

infectées par le VIH telles : les cellules endothéliales, les cellules du système nerveux et les cellules provenant d'un fœtus, où la molécule CD4 est absente⁽⁷¹⁾, il a été possible d'identifier un récepteur glycolipidique nommé galactosyl céramide (GalCer)⁽¹⁶⁴⁾.

Suite à la liaison entre la gp120, le récepteur CD4 et le co-récepteur, il se produit un changement de conformation de la glycoprotéine qui permet d'exposer l'autre glycoprotéine virale présente à la surface du virion, la glycoprotéine transmembranaire gp41. La gp41 possède une répétition d'heptade dans sa partie amino-terminale, très conservée chez la majorité des protéines transmembranaires des rétrovirus, qui engendre la formation d'une structure torsadée⁽⁴⁶⁹⁾. Cette structure présente le peptide fusion à la cellule cible. Ceci permet la fusion entre la membrane cellulaire et l'enveloppe virale et permet l'entrée de la capsid virale dépourvue de sa membrane dans la cellule hôte (Figure 5).

3.4.2 Transcription inverse

Suite à l'entrée du virus dans le cytoplasme de la cellule hôte, l'ARN génomique viral, faisant partie d'un complexe nucléoprotéique, est libéré de la capsid. L'objectif final de la transcription inverse étant de générer un ADN bicaténaire dans le cytoplasme de la cellule infectée, plusieurs étapes sont nécessaires. Tout d'abord, il faut mentionner que la synthèse du brin d'ADN dépend de l'activité de deux enzymes. Elle dépend en premier lieu de la RT (reverse transcriptase), qui possède une activité ADN polymérase capable de synthétiser un brin d'ADN à partir d'un brin d'ADN ou d'ARN comme brin parental, et d'une nucléase, la ribonucléase H (RNase H) qui est spécifique au brin d'ARN génomique qui forme le complexe ARN:ADN.

Le processus qui mène à la synthèse du double brin d'ADN rétroviral se déroule en plusieurs étapes (Figure 6). La première étape consiste à synthétiser le brin d'ADN de polarité négative. La synthèse est initiée à l'aide de l'extrémité 3' d'un ARN de transfert (ARNt) partiellement déroulé et qui sert d'amorce⁽⁴²⁶⁾. Cet ARNt est hybridé au site PBS (primer-binding site) présent sur l'ARN génomique.

Figure 5

Page 26

Représentation des étapes menant à la fusion entre la membrane et l'enveloppe virale lors de l'infection de la cellule cible par le VIH-1. Ce schéma a été tiré des notes du cours de virologie fondamentale de l'Institut Pasteur, disponibles sur internet (<http://virologie.free.fr/>).

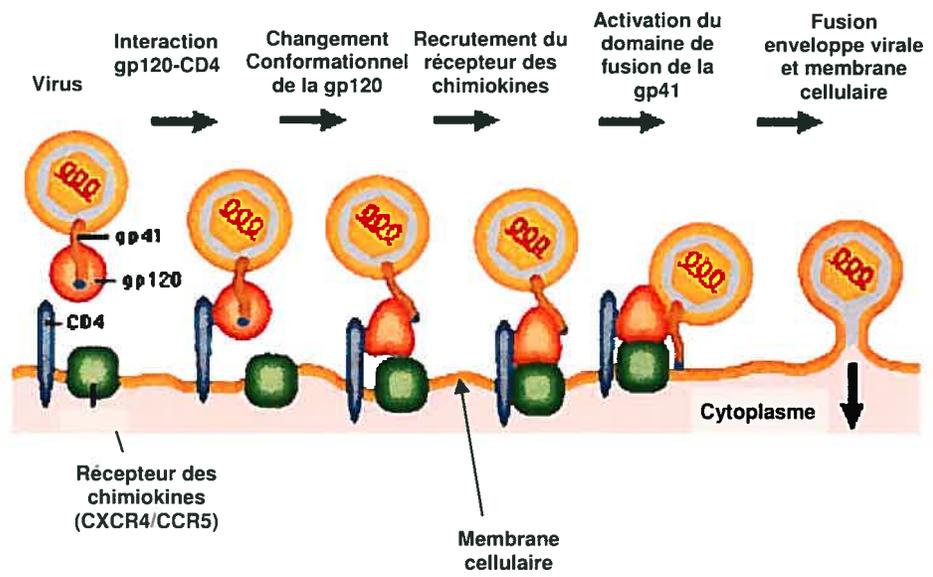
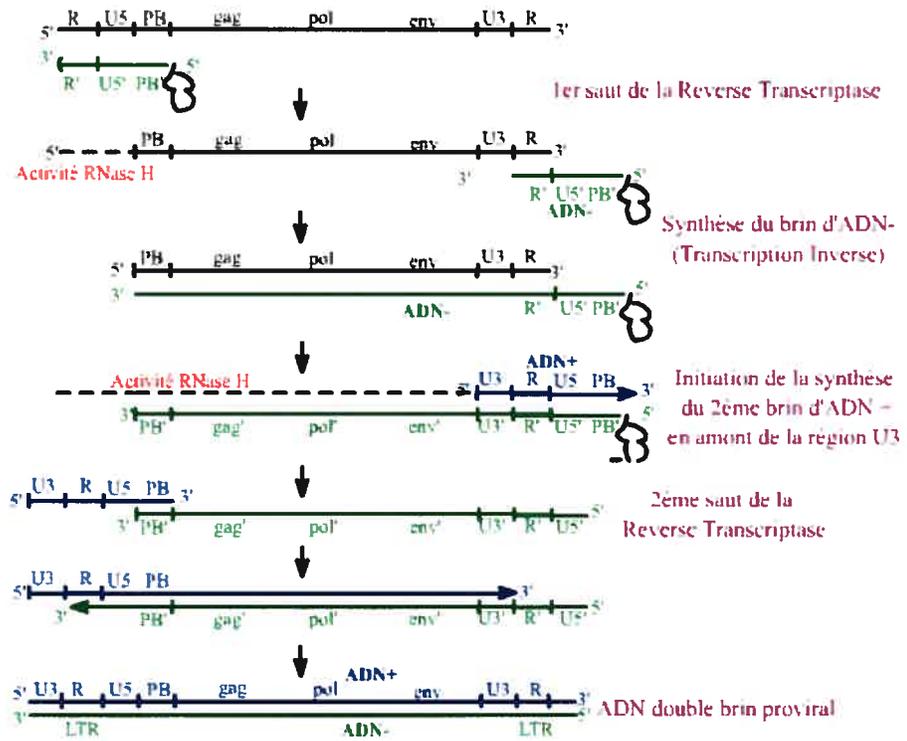


Figure 6

Page 28

Représentation schématique des différentes étapes de la transcription inverse lors de la réplication du VIH-1. Ce schéma a été tiré et adapté de Coffin, J.M., Hughes, S.H. et Varmus, H.E. 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 812 pages.



La synthèse du brin d'ADN de polarité négative se poursuit, grâce à l'enzyme RT, jusqu'à ce que l'extrémité 5' du brin d'ARN génomique soit atteinte. Ceci génère un court brin d'ADN intermédiaire, hybridé avec l'ARN, d'environ 100-150 paires de bases, puisque le site de liaison à l'amorce (PBS) est situé près de l'extrémité 5' du brin d'ARN génomique.

Par la suite, la RNaseH dégrade le brin d'ARN de l'hybride ADN:ARN. Cette dégradation entraîne le transfert de la RT et du court brin d'ADN de polarité négative à l'extrémité 3' du brin d'ARN génomique, où il y a hybridation du brin d'ADN⁽⁴³⁰⁾. Ce transfert est rendu possible grâce aux séquences répétées (R) présentes à la fois aux extrémités 5' et 3' de l'ARN génomique⁽⁷⁷⁾. L'hybridation et le transfert semblent facilités par la présence de la protéine de la nucléocapside^(91, 462). Suite à son transfert à l'extrémité 3' de l'ARN viral, la synthèse du brin d'ADN intermédiaire de polarité négative peut donc se poursuivre, et ce grâce à l'enzyme RT. Durant la synthèse, la RNaseH digère le brin d'ARN génomique parental mais cette dégradation n'est toutefois pas complète.

Le brin d'ARN génomique contient une région nommée PPT (polypurine tract) qui est résistante à la dégradation par la RNaseH. La région PPT sert d'amorce pour la synthèse de brin d'ADN de polarité positive⁽⁶¹⁾. La région où la synthèse du brin positif débute définit la région U3 et la région la plus en aval du LTR (long terminal repeat) donc la fin du brin d'ADN viral. L'insertion de l'amorce doit se faire dans une région bien précise permettant la synthèse du brin positif et la production d'un ADN qui pourra être intégré dans le génome de la cellule. La synthèse du brin d'ADN de polarité positive est stoppée lorsqu'une partie de l'amorce représentée par l'ARNt sur le brin négatif d'ADN subit une transcription inverse⁽³⁶⁷⁾. Cette transcription inverse permet de synthétiser la région PBS à l'extrémité 3'. Par la suite, la RNaseH clive la région PPT de l'amorce, qui a servi à synthétiser le brin d'ADN de polarité positive, sans toutefois cliver une seule base associée à l'ARN^(347, 409).

Le retrait de l'ARNt du brin d'ADN de polarité négative permet d'exposer la région PBS, présente à l'extrémité 3' du brin d'ADN de polarité positive, qui est

complémentaire à la région PBS présente à l'extrémité 5' du brin négatif d'ADN. L'hybridation entre les deux régions PBS, qui sont complémentaires et présentes sur le brin positif et sur le brin négatif d'ADN, est responsable du second transfert de brin et de la RT⁽³⁵⁷⁾.

Suite au second transfert, chacun des brins d'ADN sert de matrice à l'autre brin. C'est ce qui permet à l'élongation du brin positif et du brin négatif d'ADN de se poursuivre grâce également à la RT. Le produit final est un ADN proviral complet, contenant une brisure au centre d'un des brins d'ADN, ce qui a pour conséquence de créer un brin flottant d'ADN appelé le DNA flap⁽⁶²⁾. Le provirus peut par la suite être intégré au génome cellulaire⁽³⁵⁷⁾.

Des études ont permis de démontrer que la protéine APOBEC3G agit comme facteur de restriction, suite à son incorporation dans la particule virale, au cours de l'infection des cellules cibles. Sa présence chez les cellules entraîne une activité anti-rétrovirale, en absence de la protéine Vif (viral infectivity factor), qui se reflète par une hypermutation de l'ADN viral produit au cours de la transcription inverse^(188, 263). Cette activité peut être contrée par la présence de la protéine Vif, chez les cellules productrices, qui recrute une ubiquitine ligase qui se lie à APOBEC et entraîne sa dégradation par le protéasome^(80, 264). La protéine Trim-5 α est un autre facteur de restriction capable de bloquer les étapes précoces de l'infection au VIH, en agissant sur la capsid virale mature du virus et en interférant avec la transcription inverse⁽⁴²⁰⁾.

3.4.3 Intégration

L'intégration est une étape importante de la réplication virale, puisque l'ADN viral doit être intégré afin de demeurer stable dans les cellules en division. Une fois intégré à l'ADN de la cellule hôte, le provirus se transmet comme étant un élément à part entière du génome de la cellule hôte. L'intégration permet de protéger l'ADN viral contre la dégradation, puisqu'un ADN non intégré dans la cellule infectée sera dégradé. L'intégration est également importante pour la transcription de l'ADN viral en nouvelles copies du génome viral et en ARN messagers qui codent pour les différentes protéines du virus⁽⁷⁸⁾.

Tout comme pour la transcription inverse, l'intégration du provirus se déroule en plusieurs étapes. Premièrement, dans le cas du VIH-1, la synthèse de l'ADN viral débute dans le cytoplasme de la cellule infectée et elle est complétée après son arrivée dans le noyau. Lorsque la synthèse du brin d'ADN est terminée, l'enzyme virale intégrase clive l'extrémité en 3' de l'ADN viral éliminant ainsi les deux bases situées à chacune des extrémités 3'. Il en résulte donc un brin d'ADN plus court avec un groupement hydroxyle qui servira de site d'attachement, pour le provirus, à l'ADN cellulaire. Ceci permet de définir les deux extrémités du provirus intégré ce qui signifie que ce brin d'ADN viral est le précurseur du provirus intégré. Il est également important de mentionner que ce brin d'ADN viral se retrouve dans une structure spécifique du complexe de la nucléoprotéine; le complexe de pré-intégration (CPI).

Le complexe de pré-intégration (CPI) contient le brin d'ADN viral bicaténaire ainsi que la machinerie nécessaire pour l'importation du complexe au noyau. En ce qui concerne le virus de la leucémie murin (MLV) et le virus du sarcome de Rous (RSV), deux oncorétrovirus, l'accès du CPI au noyau se fait durant la mitose alors que la membrane nucléaire est désassemblée. Le CPI du VIH-1 peut entrer dans le noyau durant la mitose mais également lors de l'interphase. Cependant, ceci implique que le complexe doit traverser le pore nucléaire de la couche bilipidique de la membrane nucléaire afin d'atteindre le nucléoplasme et ce même si la taille du CPI excède d'environ deux fois celle du canal du pore nucléaire. Il semble que la présence de la protéine de la matrice, de la protéine virale r (Vpr), de l'intégrase et du DNA flap faciliterait l'importation du complexe dans le noyau⁽³⁹⁷⁾. L'intégrase possède un signal d'importation nucléaire, non classique, qui faciliterait le transport du CPI au noyau⁽³⁸⁾. Ceci est également le cas de la protéine de la matrice qui possède un signal de localisation nucléaire qui lui permet de se lier au récepteur cellulaire, la karyophérine α , qui est quant à elle spécifique aux protéines ciblées au noyau. La présence de la protéine Vpr augmente l'affinité entre le signal de localisation nucléaire et la karyophérine α ⁽³⁴²⁾. Cette protéine s'exprime principalement dans le noyau de la cellule hôte et ce à cause de la présence de ses deux signaux de localisation nucléaire^(198, 396). La protéine Vpr peut faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, ce qui lui permet d'être incorporée au CPI^(106, 396). Elle est

également impliquée dans la translocation au noyau du CPI chez les cellules qui ne se divisent pas, comme les macrophages⁽¹⁶⁹⁾. Le DNA flap agirait, quant à lui, à titre de signal d'importation nucléaire permettant au CPI de s'accumuler au noyau⁽⁴⁹²⁾. Cependant, le rôle exact joué par le DNA flap lors de l'intégration demeure imprécis^(13, 90, 407).

L'entrée dans le noyau du CPI permet à ce dernier d'interagir avec l'ADN cellulaire. L'intégration à l'ADN cellulaire n'est pas un phénomène aléatoire. En effet, il semble que l'ADN proviral du MLV s'intègre de préférence près de la région où débute la transcription, en amont ou en aval, alors que l'ADN proviral du VIH-1 s'intègre un peu partout sur l'unité transcriptionnelle mais seulement en aval de la région où débute la transcription⁽⁴⁸⁰⁾. La liaison de l'ADN viral à l'ADN cellulaire se fait grâce à l'interaction entre l'extrémité 3' hydroxyle de l'ADN viral et l'extrémité 5' du brin opposé qui est l'ADN cellulaire⁽⁴⁶⁾. Un nouveau lien étant créé, il ne reste plus qu'à réparer le trou, entre l'extrémité 5' du brin d'ADN viral non-apparié et le brin d'ADN cellulaire, en liant les deux brins grâce à l'intégrase⁽³⁶³⁾. Ceci permet l'intégration complète de l'ADN viral avec l'ADN cellulaire.

3.4.4 Synthèse de l'ARN génomique viral

L'environnement dans lequel le provirus est intégré définit son état transcriptionnel. En effet, un provirus intégré dans une hétérochromatine dont la transcription est réprimée sera en état de latence, contrairement au provirus intégré dans un environnement transcriptionnel actif. Le LTR (long terminal repeat) présent à l'extrémité 5' du provirus agit à titre d'unité transcriptionnelle chez la cellule hôte. Il contient des éléments du promoteur en amont et en aval qui incluent un initiateur (Ihr), une boîte TATA et trois sites Sp1⁽⁴²⁴⁾. Ces trois régions favorisent le bon positionnement de l'ARN polymérase II au site d'initiation de la transcription et aide à l'assemblage du complexe de pré-initiation. Légèrement en amont du promoteur il est possible de retrouver un amplificateur ("enhancer") de la transcription qui chez le VIH est capable de lier les facteurs nucléaires NF-κB et NFAT ainsi que les membres de la famille Ets⁽²⁰²⁾. Une fois que tous ces facteurs sont présents sur le LTR, la transcription peut commencer

mais la protéine TAT doit être présente afin que l'élongation soit efficace. Durant ce processus, de petits ARNs non-polyadénylés sont synthétisés et ils persistent de manière stable dans la cellule grâce à la formation d'une boucle d'ARN qui représente l'élément TAR (transactivation response)⁽²⁰⁵⁾. La présence de la protéine TAT augmente le niveau d'expression des gènes viraux. Cette dernière ainsi que la cycline T1 lient la structure TAR et recrutent une autre cycline, la Cdk9, au LTR du VIH⁽⁴⁶¹⁾. La Cdk9 jumelée au facteur d'élongation de la transcription b (TEFb) phosphoryle un domaine de l'ARN polymérase II ce qui permet la transition de la phase d'initiation à la phase d'élongation de la transcription⁽³⁴⁵⁾.

3.4.5 ARNm viraux et synthèse protéique

La transcription du génome entraîne la formation de plus d'une douzaine de transcrits viraux différents du VIH-1⁽³⁷⁴⁾. Chaque transcrit possède une coiffe en 5' et une queue polyadénylée en 3' tout comme les ARNm cellulaires. Parmi les différents ARNs, certains peuvent être épissés plusieurs fois et transportés dans le cytoplasme en absence de séquences inhibitrices de l'ARN (IRS)⁽⁸⁶⁾. Ces transcrits codent pour les protéines TAT, Nef et Rev. D'autres transcrits viraux, non épissés ou épissés une seule fois, demeurent dans le noyau de manière stable et codent pour les protéines de structure, les protéines accessoires ainsi que pour les protéines responsables des différents rôles enzymatiques et ils représentent les différents ARN viraux nécessaires à l'assemblage d'un virus complet et infectieux. Les transcrits présents dans le noyau ont besoin de la protéine Rev pour assurer leur transport dans le cytoplasme. La protéine Rev se lie à la protéine Importine β , pour son importation au noyau, et à la protéine CRM-1/Exportine pour son exportation du noyau⁽¹⁷¹⁾. La protéine CRM-1/Exportine module l'exportation de Rev et des transcrits avec lesquels elle interagit via la séquence RRE (Rev responsive element) présente sur le gène de l'enveloppe⁽⁸⁶⁾.

Afin que le cycle réplcatif viral puisse se poursuivre, il doit y avoir un équilibre entre l'épissage et le transport de l'ARNm viral. Si l'épissage est trop efficace, seuls les transcrits qui peuvent être épissés plusieurs fois seront

présents dans le cytoplasme. Bien qu'elles soient requises les protéines de régulation TAT et Rev, qui sont codées par les transcrits épissés plusieurs fois, sont insuffisantes pour permettre une réplication virale efficace. Cependant, si l'épissage ne se fait plus, les protéines TAT, Rev et Nef ne seront pas synthétisées⁽²⁶¹⁾.

3.5 Gag / Gag-Pro-Pol

Tel que décrit à la section 3.4.5, les différents transcrits viraux sont les ARNm nécessaires à la synthèse des différentes protéines du VIH-1. Les transcrits non épissés, qui sont traduits dans le cytoplasme de la cellule, mènent à la synthèse des précurseurs Pr55^{Gag} et Pr160 Gag-Pol. Le précurseur, suite à sa maturation, code pour les différentes protéines de structure : la capsid, la matrice et les protéines p9 et p6. Cette polyprotéine joue un rôle essentiel dans l'assemblage ainsi que dans le bourgeonnement du VIH-1. Ce rôle du précurseur Gag dans l'assemblage et le bourgeonnement sera décrit de façon détaillée à la section 3.7. La protéine Gag est également impliquée dans l'encapsidation des différentes composantes du virion parmi lesquelles figurent les deux copies d'ARN génomique.

3.5.1 Synthèse

Un grand nombre de molécules du précurseur Pr55^{Gag} doivent être synthétisées afin de générer les protéines structurales du virion. En revanche, les enzymes produites suite à la synthèse des protéines Pro et Pol ne sont pas requises en aussi grande quantité. Les rétrovirus ont développé un mécanisme qui permet la synthèse d'une plus grande quantité de gènes qui codent pour la protéine Gag comparativement aux gènes Pro et Pol. Il est donc possible de retrouver entre 10 et 20 molécules de Gag pour une molécule de Gag-Pro-Pol.

Chez les rétrovirus, le gène Gag se situe à l'extrémité 5' du génome viral en amont des gènes Pro et Pol. Le précurseur Gag-Pro-Pol est synthétisé selon une stratégie qui permet de passer outre le codon de terminaison situé à l'extrémité 3' du gène Gag et qui définit le cadre de lecture de ce dernier. En ce

qui concerne le VIH-1, le ribosome recule d'un nucléotide ce qui permet à la traduction de se poursuivre sur le cadre de lecture des gènes Pro et Pol jusqu'au codon de terminaison situé sur le nouveau cadre de lecture⁽¹⁹⁵⁾.

Le changement de cadre de lecture (-1) peut se faire seulement si l'ARNm possède les deux éléments suivants : une séquence consensus glissante de sept nucléotides ainsi qu'une structure secondaire située en aval de la séquence glissante qui favorise le changement de cadre de lecture⁽⁴²⁾. Bien qu'il est évident que la structure secondaire en aval soit importante il semble que la forme exacte de cette structure soit matière à controverse. La divergence d'opinion se situe au niveau des boucles contenues dans la structure d'ARN. De récentes études ont montré que la structure en aval de la région glissante est en fait une structure large et complexe d'ARN qui comprend une double hélice⁽¹¹⁶⁾ alors que d'autres études mentionnent que la structure comprend en fait une triple hélice⁽¹⁰⁹⁾.

3.5.2 Modifications durant la synthèse

La modification la plus importante que subit le précurseur Pr55^{Gag} survient au cours des étapes tardives de l'assemblage et implique le clivage du précurseur par la protéase, entraînant la maturation du précurseur et la synthèse des différentes protéines qui lui sont associées. L'assemblage de la particule virale par la protéine Gag sera décrite plus loin. Quant aux protéines obtenues suite à la maturation du précurseur, elles seront décrites à la section 3.5.3.

Bien avant d'être clivé par la protéase, le précurseur Gag doit subir deux autres modifications. La première implique la myristylation de son extrémité amino-terminale. La myristylation est une modification post-traductionnelle qui entraîne l'ajout d'un myristate sur la glycine, situé à l'extrémité NH₂ de la protéine. Le myristate est un acide gras, composé de 14 carbones, dont la présence est requise afin de permettre la liaison de Gag à la membrane plasmique⁽⁴⁷⁾. La simple présence du myristate est toutefois insuffisante pour assurer une liaison permanente du précurseur à la membrane, contrairement aux peptides palmitoylés qui contiennent 16 carbones, ce qui entraîne une plus forte association à la membrane^(332, 356). La présence du myristate est souhaitable

lorsque la protéine doit effectuer des allés retours à la membrane plasmique, afin qu'elle puisse remplir d'autres fonctions nécessaires à la réplication du virus, comme dans le cas de la protéine de la matrice.

La protéine de la matrice, faisant partie du précurseur Pr55^{Gag}, peut également être phosphorylée. La phosphorylation est associée à l'intégration du complexe de pré-intégration, décrit à la section 3.4.3⁽¹⁴⁷⁾. La phosphorylation semble mettre en évidence le signal de localisation nucléaire présent sur la protéine de la matrice et ce afin de permettre l'intégration du complexe de pré-intégration au noyau des macrophages⁽⁴⁵²⁾.

3.5.3 Protéines obtenues suite à la maturation du précurseur Pr55^{Gag}

3.5.3.1 Protéine de la matrice (MA) p17

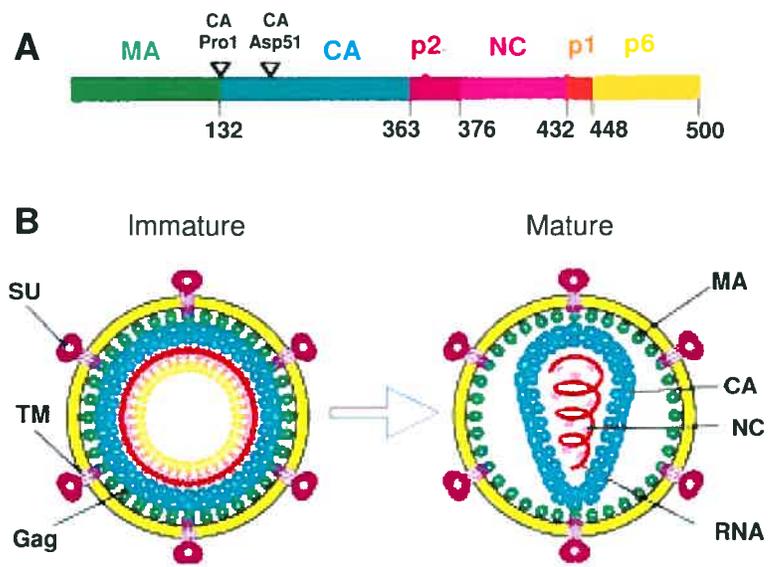
La protéine MA est située à l'extrémité amino-terminale du précurseur Pr55^{Gag} (Figure 7). Le rôle joué par la protéine p17 au niveau de l'intégration du provirus ainsi qu'au niveau de la liaison du précurseur Gag à la membrane plasmique a été décrit précédemment. Cependant, la p17 est également impliquée dans l'incorporation de la glycoprotéine d'enveloppe à la membrane plasmique de la particule virale lors de l'assemblage. Des études de mutagenèse ont démontré que la liaison à la matrice n'est pas toujours nécessaire à l'incorporation de la glycoprotéine virale. En fait, la présence de la p17 faciliterait le transfert passif de la longue queue cytoplasmique de la glycoprotéine transmembranaire, la gp41, dans la particule virale^(139, 355). De plus récentes études ont montré que l'interaction entre la p17 et la gp41, serait plus ou moins nécessaire pour l'incorporation de la glycoprotéine d'enveloppe, selon le type cellulaire⁽²⁹⁵⁾.

3.5.3.2 Protéine de la capsid (CA) p24

La protéine de la capsid suit, dans l'ordre, la protéine MA sur le précurseur Gag (Figure 7). Elle représente un déterminant antigénique majeur du virus⁽⁴⁴⁵⁾. Elle possède deux domaines et le rôle joué par chacun, au niveau de la

Figure 7
Page 38

Représentation schématique de la particule virale immature VLP (virion-like particle) et de la production des différentes protéines virales suite à la maturation de la particule, grâce à la protéase virale. Image tirée de : **von** Schwedler, U.K., Stemmler, T.L., Klishko, V.Y., Li, S., Albertine K.H., Davis, D.R., et Sundquist, W.I. 1998. Proteolytic refolding of the HIV-1 capsid protein amino-terminus facilitates viral core assembly. *The EMBO Journal* Vol. 17,pp. 1555-1568 et adaptée pour les besoins de la revue.



morphogénèse de la particule virale, est bien distinct. Le premier domaine, situé à l'extrémité NH₂ de la protéine, est responsable de la forme conique de la capsidie présente chez une particule virale mature. Par contre, ce domaine n'est pas impliqué dans l'assemblage de la particule virale immature. Le second domaine, situé à l'extrémité carboxy-terminale, est responsable de la multimérisation du précurseur Gag et est impliqué dans l'assemblage du virus⁽¹¹²⁾.

3.5.3.3 La protéine de la nucléocapside (NC) p9

Le domaine de la nucléocapside contient deux copies d'un motif "doigt de zinc" requis pour l'encapsidation de l'ARN du génome viral à l'intérieur de la nouvelle particule virale formée⁽²⁷⁾. La capacité de la p9 à lier des acides nucléiques permet l'initiation de la multimérisation de la protéine Gag⁽¹⁵⁵⁾.

3.5.3.4 La protéine p6

La protéine p6 forme l'extrémité COOH du précurseur Pr55^{Gag} et elle est présente seulement chez les rétrovirus de primates (Figure 7). La protéine p6 est essentielle à l'incorporation de la protéine Vpr et elle est impliquée dans le bourgeonnement du virus à la membrane plasmique^(184, 328). Le rôle de la protéine au niveau du bourgeonnement sera discuté à la section 3.7.

3.6 Les glycoprotéines d'enveloppe virales

L'expression du précurseur Pr55^{Gag} permet de former une structure immature communément appelée VLP (virus-like particle) (Figure 7). La VLP n'a toutefois pas la capacité d'infecter une autre cellule puisqu'il lui manque deux éléments essentiels à cette fonction : les glycoprotéines virales. En effet, les deux glycoprotéines virales gp120 et gp41, situées à la surface de l'enveloppe virale, sont requises afin de permettre la liaison entre l'enveloppe virale et la membrane de la nouvelle cellule hôte. Cette section traitera des différentes étapes qui mènent à la maturation des glycoprotéines et de leurs rôles respectifs dans l'infection, principalement au niveau de la fusion, de l'entrée et de l'incorporation.

Il est à noter que l'implication de la glycoprotéine transmembranaire, gp41, dans la relâche virale sera plutôt discutée à la section 3.8.

3.6.1 Synthèse, assemblage et maturation

3.6.1.1 Synthèse

Les rétrovirus possèdent deux glycoprotéines virales qui sont codées par le gène env. Elles sont synthétisées au départ sous la forme d'un précurseur immature, la glycoprotéine gp160, qui est une protéine membranaire intégrale de type I tel que décrit plus bas. Le précurseur est formé à partir d'un ARN génomique épissé auquel les séquences codant pour les gènes gag-pro-pol ont été enlevées. Ceci donne naissance à un premier ARNm de quatre kilobases (kb), qui permet la synthèse du précurseur gp160, des protéines Vif, Vpr et Vpu, et à un second ARNm de deux kb qui sert à la synthèse des protéines TAT, Rev et Nef. Le précurseur est synthétisé à partir de la même machinerie cellulaire normalement utilisée pour d'autres protéines de surface. La traduction du précurseur gp160 est initiée à partir d'un ribosome libre et elle débute par la synthèse d'une courte séquence peptidique d'environ 20 kDa qui contient un peptide signal. Le peptide signal émergeant du ribosome est reconnu par un complexe ribonucléoprotéique, qui est une particule de reconnaissance du signal (SRP)⁽⁴⁵⁴⁾. La liaison du complexe peptide signal - SRP suspend la traduction. Puis le complexe se rapproche de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et se lie à sa face cytoplasmique. Cette liaison lève le blocage de la traduction et la SRP permet la translocation de la chaîne naissante de la protéine d'enveloppe à travers la membrane, jusqu'à la lumière du RE.

Au cours de la traduction, la glycoprotéine virale nouvellement synthétisée subit deux modifications typiquement observées chez la plupart des glycoprotéines cellulaires. La première implique le clivage protéolytique du peptide signal par une protéase cellulaire présente dans le RE. La seconde implique la glycosylation de la protéine native, qui se fait grâce au transfert de blocs d'oligosaccharides pré-assemblés, à partir d'un intermédiaire lipidique, à la protéine. Le bloc se lie de façon covalente à l'azote amide de la chaîne latérale

de l'asparagine (N-glycosylation). Le nombre et la position des sites de glycosylation varient d'un rétrovirus à l'autre. En ce qui concerne l'enveloppe du VIH-1, il y a 24 sites de glycosylation (N-glycosylation) répertoriés⁽¹⁾. Il est à noter que la glycosylation est critique durant les étapes de repliement et de maturation du précurseur^(242, 324).

Lorsque le ribosome arrive à la fin de l'ARNm de l'enveloppe il est possible d'observer une séquence longue et riche en acides aminés hydrophobes suivie par un acide aminé basique. Ces derniers préviennent le relâchement de l'enveloppe dans la lumière du RE.

3.6.1.2 Assemblage

Afin de pouvoir se rendre jusqu'à la surface cellulaire, le précurseur doit être replié correctement et assemblé en structure oligomérique⁽¹¹¹⁾. Le repliement du précurseur gp160 débute pendant sa translocation au RE lors de la traduction. Il est à noter que l'environnement du RE ne facilite pas le repliement adéquat des protéines. Il représente le site où les protéines sont constamment synthétisées et exportées. Mais un bon nombre d'entre elles peuvent être mal repliées et formées des agrégats avec les autres protéines, empêchant ces dernières de quitter le RE. Il est à noter que plus une protéine prendra de temps pour acquérir une conformation adéquate plus elle augmentera ses chances de former des agrégats avec les autres protéines. La glycoprotéine virale du VIH-1, à cause de la longueur et du nombre d'acides aminés de charge positive de son peptide signal, est transportée relativement lentement hors du RE⁽²⁴³⁾. L'environnement réducteur de la lumière du RE, qui favorise la création de ponts di-sulfures entre les cystéines présentes sur les protéines, peut également retarder le départ de la protéine. Il existe des protéines chaperones, présentes dans le RE, qui s'assurent du bon repliement des glycoprotéines présentes dans le RE. Celles que l'on retrouve le plus souvent associées à la glycoprotéine gp160 sont : la protéine BiP, la calréticuline et la calnexine^(118, 319). La protéine gp160 peut donc atteindre un stade où son repliement est adéquat ce qui lui permet de demeurer dans le RE sans interagir avec des protéines nouvellement synthétisées non repliées.

L'oligomérisation du précurseur gp160 se fait dans le RE. Ce processus est lent et il limite souvent le transport de la glycoprotéine virale à la surface de la cellule⁽¹²²⁾. La glycoprotéine d'enveloppe du VIH-1 est présente à la surface de la cellule sous forme d'un trimère⁽⁵⁹⁾. L'assemblage du précurseur en oligomères se fait grâce à la gp41, plus précisément grâce à la présence d'un motif à base de leucine dans une hélice α de l'ectodomaine de la gp41⁽¹⁴⁶⁾. Ce type de motif est également impliqué dans l'oligomérisation de la protéine HA du virus influenza⁽⁴⁷⁷⁾. L'oligomérisation de ce motif serait impliquée dans la formation de l'oligomère gp160 et dans le changement de sa conformation requise pour la fusion⁽¹¹⁵⁾. Il est à noter que des mutations au niveau de ce motif ne permettent plus la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire, ce qui empêche l'entrée du virus. Ceci implique donc que l'oligomérisation est requise pour l'entrée du virus⁽¹³⁷⁾. Ceci soulève la possibilité que des mutants de l'enveloppe puissent agir à titre de mutants trans-dominants négatifs par formation d'hétéro-oligomères avec l'enveloppe sauvage, tel que démontré par le groupe d'Iwatani en 2001⁽¹⁹⁴⁾.

3.6.1.3 Maturation

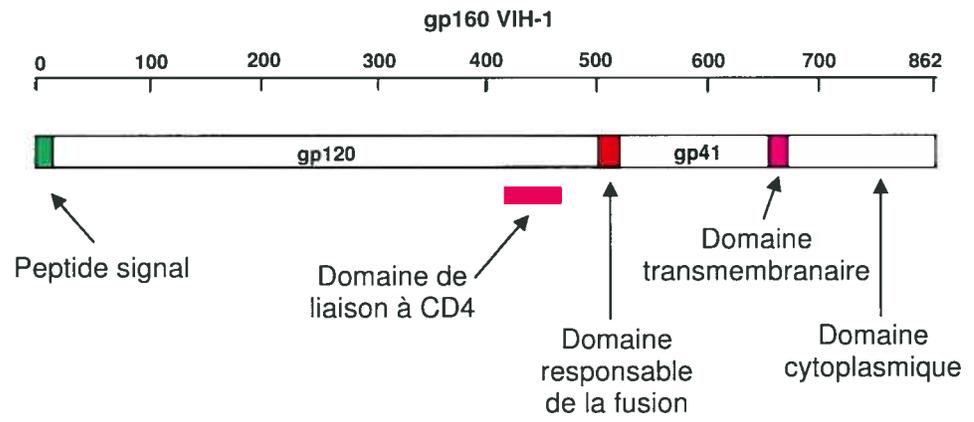
Certaines protéines, comme la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV), possèdent un motif di-acidique (Asp-X-Glu) responsable de l'exportation de la protéine du RE⁽³⁰²⁾. Ce type de motif ne semble pas impliqué dans l'exportation du précurseur gp160 et il semble que le simple fait qu'il soit sous forme oligomérique soit suffisant pour permettre son exportation. Le précurseur quitte le RE sous forme trimérique et se dirige vers l'appareil de Golgi. Il a été démontré que l'oligomérisation du précurseur est essentielle afin de permettre l'infection d'une nouvelle cellule par le virus. Cependant, bien que l'oligomérisation soit suffisante pour permettre la liaison entre de la gp120 et le récepteur CD4, le précurseur doit également être clivé en glycoprotéines gp120 et gp41 afin de permettre à la gp41 d'être pleinement fusogénique (Figure 8)⁽¹⁴⁰⁾.

Contrairement au précurseur Pr55^{Gag}, le précurseur gp160 qui transite au Golgi est clivé par des endoprotéases cellulaires, qui sont présentes dans l'appareil de Golgi, et non par la protéase du virus. Parmi ces protéases

Figure 8

Page 44

Schéma représentant le précurseur de l'enveloppe, la gp160, ainsi que la sous-unité de surface, la gp120, et la sous-unité transmembranaire, la gp41, produites suite au clivage par les protéases cellulaires. Le schéma a été tiré du site internet suivant :
(<http://membres.lycos.fr/neb5000/Virologiel/Retroviridae/Retroviridae%201.htm>)
puis il a été modifié pour les besoins de la revue.



cellulaires figurent la furine ainsi que d'autres convertases reconnues pour cliver le précurseur^(96, 97). Il est à noter que le clivage par les convertases se fait suite à la reconnaissance d'une séquence en acides aminés bien précise (Arg-X-(Lys/Arg)-Arg), qui est présente sur le précurseur gp160, autour de la position 510 de la séquence en acides aminés de la gp120^(113, 276). La structure trimérique, formée par la glycoprotéine de surface gp120 et la glycoprotéine transmembranaire gp41 qui sont liées par un lien non-covalent, est maintenue suite au clivage par les protéases cellulaires, telles la furine ou certaines convertases⁽⁵⁴⁾. Les glycoprotéines virales pourront donc par la suite être incorporées au virus⁽¹¹³⁾.

3.6.2 Rôles et propriétés de la glycoprotéine virale de surface : la gp120

Tel que mentionné précédemment, la glycoprotéine de 120 kDa (gp120) est la sous-unité présente à la surface de la particule virale qui se lie au récepteur CD4 présent sur les différentes cellules cibles. Elle détermine donc le tropisme du virus⁽²¹⁷⁾. La gp120 est également responsable de certains effets cytopathiques associés au VIH-1. Parmi ces effets, il y a la formation de syncytia suite à la liaison de la gp120 au récepteur CD4. Les syncytia sont des cellules géantes multinucléées qui proviennent de la fusion entre plusieurs cellules infectées, qui présentent la gp120 à leur surface, et des cellules qui présentent CD4 à leur surface⁽⁴¹⁰⁾.

L'association entre la gp120 et la gp41 dépend de régions importantes de la protéine gp120. Il est estimé que la moitié de la quantité de gp120 nouvellement synthétisée se libère de la gp41, puisque le lien qui retient les deux protéines est non-covalent et labile. Des études ont montré que deux régions très conservées situées aux extrémités de la gp120 sont importantes pour l'interaction de cette dernière avec la gp41. Il a également été suggéré que des séquences en acides aminés hydrophobes, situées dans les régions conservées (C3 et C4) de la gp120, pourraient influencer l'interaction entre les deux glycoprotéines⁽¹⁷⁰⁾.

3.6.3 Rôle des différents domaines de la glycoprotéine transmembranaire : gp41

La glycoprotéine transmembranaire, gp41, est la seconde sous-unité mature du précurseur gp160. Elle se divise en trois domaines distincts : l'ectodomaine, le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique. Au cours de cette section, il sera possible de résumer l'implication de chacun des domaines dans l'infection au VIH-1. Bien que cette section traitera en majorité des domaines de la glycoprotéine du VIH-1, quelques exemples impliquant d'autres rétrovirus seront cités.

3.6.3.1 Ectodomaine

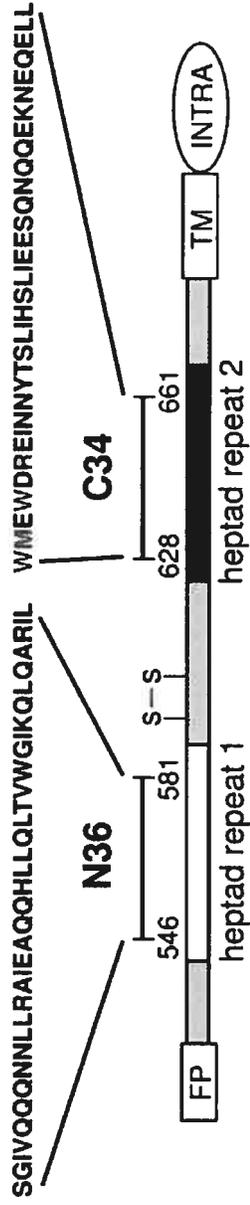
L'ectodomaine de la gp41, en particulier la région située à l'extrémité NH₂, est responsable de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. En effet, cette région contient un peptide fusogénique de 23 acides aminés⁽³⁰⁰⁾. A proximité de ce peptide fusogénique, on retrouve le motif à base de leucine, impliqué dans l'interaction entre la gp120 et la gp41, contenu dans la région correspondant au peptide synthétique N36^(59, 64). Au centre de l'ectodomaine on trouve également une boucle de cystéines, très conservée parmi les glycoprotéines transmembranaires des rétrovirus et essentielle au clivage du précurseur⁽⁹⁸⁾. L'extrémité COOH de l'ectodomaine est représentée par un second peptide synthétique, C34, qui tout comme le peptide N36 a une activité antivirale⁽⁴⁷⁰⁾ (Figure 9).

L'implication de l'ectodomaine dans la fusion de la gp41 a fait l'objet de plusieurs études en rapport avec le développement d'inhibiteurs de la fusion. Il a été démontré que de simples substitutions d'acides aminés dans un motif à base de tryptophane (W(x)₅W(x)₅W) présent dans l'ectodomaine pouvaient affecter la fusion. Ces mutations sont représentées dans le peptide synthétique DP178⁽³⁷⁵⁾. Ce peptide a par la suite été commercialisé, comme agent antiviral, sous le nom de T-20. Ce peptide cible l'extrémité COOH de l'ectodomaine et il agirait à titre de mutant dominant négatif lors des changements de conformation requis permettant la fusion⁽²¹⁰⁾. D'autres études, impliquant la substitution individuelle

Figure 9

Page 48

Représentation des peptides synthétiques N36 et C34 élaborés à partir de deux régions hydrophobes présentes dans l'ectodomaine de la gp41 du VIH-1, ces dernières sont illustrées par les boîtes blanche et mauve. Ce schéma a été tiré et adapté de Chan, D.C., Chutkowski, C.T., et Kim, P.S. 1998. Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15613–15617.



d'acides aminés présents dans l'ectodomaine, ont permis de mettre en relief son rôle dans la fusion par la gp41^(196, 211, 246, 253, 457). Il faut également noter qu'il a été démontré que des changements effectués dans la partie cytoplasmique de la gp41 peuvent avoir une influence sur les fonctions de l'ectodomaine de cette dernière, probablement en entraînant des changements conformationnels⁽¹²⁰⁾.

3.6.3.2 Domaine transmembranaire

La région transmembranaire de la gp41 est comprise entre les acides aminés 684 et 705, qui sont en majorité très hydrophobes. Le rôle premier de cette région est l'ancrage de la glycoprotéine virale à la membrane du virus⁽⁴⁷¹⁾. Il a été montré que des mutations dans la partie transmembranaire de la gp41 peuvent affecter son activité de fusion⁽³²¹⁾. Le rôle de la partie transmembranaire au niveau de la fusion est controversé puisqu'une étude a indiqué que la substitution du domaine transmembranaire de la gp41 par celui d'une protéine cellulaire n'affecte en rien la fusion et l'infectivité du virus⁽⁴⁷¹⁾. En revanche, des études récentes ont montré que la substitution d'acides aminés dans la région du transmembranaire, entre autre au sein d'un motif à base de glycines conservées (GXXXG) parmi les domaines transmembranaires de plusieurs protéines, n'affecte pas la fusion médiée par la gp41. Cependant, la substitution complète de cette région empêche la fusion⁽²⁸⁷⁾. Cet aspect sera discuté plus en détails au chapitre 3.

Il est à noter que le domaine transmembranaire de la glycoprotéine transmembranaire du VIS semble également jouer un rôle important. En effet, des études de mutagenèse ont démontré qu'une partie du domaine transmembranaire de la glycoprotéine peut être enlevée sans trop de conséquences sur les fonctions de cette dernière, cependant la délétion ne pourrait se faire au-delà d'un certain acide aminé. En effet, il semble que la région du domaine transmembranaire située en amont de l'acide aminé en position 187 soit essentielle pour la fusion entre les cellules, pour l'entrée du virus et pour l'infection subséquente⁽⁴⁶⁵⁾.

3.6.3.3 Domaine cytoplasmique

Tel que vu précédemment, le précurseur Pr55^{Gag} est à lui seul suffisant à l'assemblage et au bourgeonnement des particules virales. En absence de la glycoprotéine virale ces particules virales sont non-infectieuses⁽¹⁰³⁾. Il faut donc que la glycoprotéine virale soit incorporée au virion lors de la sortie de ce dernier de la cellule. De plus, il semble que l'incorporation de la glycoprotéine soit influencée par le domaine cytoplasmique de la gp41.

Tout d'abord il est important de mentionner que le domaine cytoplasmique des lentivirus, parmi lesquels figurent le VIH-1, le VIH-2 et le VIS, est très long comparativement à celui des autres rétrovirus. En effet, il est formé de plus de 150 acides aminés, alors que dans le cas des autres rétrovirus le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine transmembranaire est formé de 20 à 50 acides aminés⁽¹¹⁴⁾. Il a également été démontré que le domaine cytoplasmique de certains isolats du VIH-2 et du VIS possède un codon stop, suite à des passages successifs *in vitro* raccourcissant ainsi le domaine à 15 à 20 acides aminés. Le clivage du domaine cytoplasmique augmenterait la capacité du virus à se répliquer, *in vitro*⁽²¹⁶⁾. En ce qui concerne le VIH-1, il ne semble pas y avoir de consensus clair concernant la longueur idéale du domaine cytoplasmique nécessaire à l'incorporation. Certaines études ont montré que la délétion de plus de 19 ou 43 acides aminés, à partir de l'extrémité carboxy-terminale du domaine cytoplasmique de la gp41, réduit à la fois l'incorporation de l'enveloppe à la particule virale et l'infectivité^(115, 488). Cependant, il a également été démontré que lorsque la majeure partie du domaine cytoplasmique de la gp41 est tronqué, cette délétion n'empêche pas l'incorporation de l'enveloppe et n'affecte pas l'infectivité^(138, 139, 250). Il est à noter que la glycoprotéine tronquée est non seulement incorporée à la particule virale du VIH-1 mais également à la celle du MuLV, ce qui n'est cependant pas le cas lorsque le domaine cytoplasmique est complet et où seule l'incorporation spécifique au VIH-1 est observée⁽²⁵⁰⁾. Cependant, il faut souligner que ces études ont toutes été réalisées chez des lignées de cellules non permissives à la propagation virale. En revanche, lorsque les études sont réalisées chez les lymphocytes et les PBMCs, il semble que le domaine cytoplasmique de la gp41 se doit d'être complet afin de permettre l'incorporation

de la glycoprotéine à la particule virale. Ceci implique que la longueur du domaine cytoplasmique requise, permettant l'incorporation de la glycoprotéine à la particule virale, varie selon le type cellulaire utilisé⁽²⁹⁵⁾.

Les plus récentes études réalisées ont permis de définir une région, spécifique au domaine cytoplasmique de la gp41, impliquée dans l'incorporation de l'enveloppe. En effet, il semble que l'hélice $\alpha 1$ et plus précisément le peptide lytique LLP1 serait impliqué dans l'incorporation de la glycoprotéine virale⁽²⁰³⁾. D'autres études ont également montré que la délétion de 12 acides aminés dans la séquence correspondant au peptide lytique LLP1 empêcherait ce dernier à la fois de s'assembler et de se lier à la membrane de la cellule nuisant ainsi à l'infectivité⁽⁶⁵⁾.

Il faut également souligner que l'interaction entre la glycoprotéine transmembranaire virale, la gp41, et la protéine de la matrice semble affecter l'incorporation de glycoprotéine à la particule virale. En effet, il a été démontré que des mutations spécifiques dans la séquence en acides aminés de la protéine de la matrice empêchent l'incorporation au virus de la glycoprotéine virale ayant un domaine cytoplasmique complet. Cependant, cet effet est réversible lorsque le domaine cytoplasmique de la gp41 est tronqué de 104 ou même 144 acides aminés à partir de son extrémité carboxy-terminale. Cette observation implique donc qu'une glycoprotéine dont le domaine cytoplasmique est plus court est incorporée indépendamment de la présence de la protéine de la matrice⁽¹³⁹⁾.

Il est important de mentionner également que chez certains rétrovirus la présence de motifs, dans le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine virale, est essentielle à l'incorporation de cette dernière à la particule virale. Ceci est en effet le cas pour le virus de la leucémie bovine (BLV) et le virus de la leucémie murine (MLV). En effet, il a été démontré que l'oncoretrovirus BLV possède deux motifs à base de tyrosine dans son domaine cytoplasmique qui affectent l'incorporation de la glycoprotéine dans le virus⁽¹⁹³⁾. En ce qui concerne le MLV, un autre oncoretrovirus, un motif à base de tyrosine a également été identifié dans le domaine cytoplasmique de ce dernier et, tout comme pour le BLV, ce motif joue un rôle dans l'incorporation de la glycoprotéine dans la particule virale

⁽⁴²⁵⁾. Cependant, lorsque certaines séquences en acides aminés du domaine cytoplasmique sont mutées, bien que ni la maturation ni l'incorporation de la glycoprotéine ne soient affectées, le virus perd son potentiel infectieux⁽¹⁵⁸⁾.

La maturation de la glycoprotéine du virus MLV est particulière. En effet contrairement aux autres rétrovirus, durant la maturation de la glycoprotéine 16 acides aminés du domaine cytoplasmique sont retirés par la protéase virale. Cette région formée de 16 acides aminés est appelée peptide R et la délétion de ce dernier permet la fusion de la glycoprotéine virale à la membrane de la cellule. Il a également été démontré que des mutations dans la séquence en acides aminés du domaine cytoplasmique de la glycoprotéine du MLV, plus précisément au niveau d'une super-hélice sous forme de trimères, inhibe la fusion. Ces études démontrent donc que le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine du MLV peut avoir une conformation qui permet ou empêche la fusion et par le fait même l'infection par le virus⁽⁴²⁵⁾.

À la lumière de la section 3.6.3 il a été possible de constater le rôle joué par chacun des domaines des glycoprotéines virales lors de l'infection des cellules cibles. De plus, il a été possible de noter l'implication, au niveau de l'infectivité, du domaine cytoplasmique des glycoprotéines. Il est également important de mentionner que ce domaine contient des motifs qui influencent le transport intracellulaire de la glycoprotéine et la sortie de la particule virale, ce qui peut conséquemment affecter la pathogenèse virale. Ces différents aspects seront traités en détails plus loin.

3.7 Assemblage et Bourgeoisement

Tel que décrit à la section 3.5, le précurseur Pr55^{Gag} est considéré comme l'élément principal dans l'assemblage, puisqu'il contient à la fois l'information et les domaines requis à l'assemblage et au bourgeoisement de la nouvelle particule virale non-infectieuse. Suite à sa synthèse dans le cytoplasme, la nouvelle molécule Pr55^{Gag} doit, tout d'abord, être ciblée au bon endroit dans la cellule et interagir correctement et au moment opportun avec d'autres molécules similaires. Lorsque toutes ces conditions sont remplies, la nouvelle particule

virale assemblée pourra alors bourgeonner de la cellule. Les différentes étapes menant à l'assemblage et au bourgeonnement de la particule virale seront décrites dans la prochaine section.

3.7.1 Ciblage à la membrane plasmique : Domaine M

De nombreuses études ont montré que les mutations qui empêchent le ciblage de la protéine Gag à la membrane plasmique préviennent la formation d'une nouvelle particule virale^(232, 414, 493). Le domaine du Pr55^{Gag} responsable du ciblage à la membrane plasmique est le domaine M, situé dans les 31 premiers acides aminés de la protéine MA présente dans le précurseur. Ce domaine nécessite la présence d'acides aminés basiques et doit être myristylé afin de bien remplir sa fonction⁽⁴⁹³⁾. Tel que démontré le myristate, qui remplace la première méthionine du précurseur, s'insère dans la couche bilipidique de la membrane. Les acides aminés basiques interagissent, quant à eux, avec les groupements acides présents sur les phospholipides contenus dans la couche interne de la membrane. Ce sont les interactions à la membrane par le myristate et les acides aminés qui procurent l'énergie nécessaire à l'ancrage du précurseur à la membrane plasmique⁽⁷⁰⁾.

3.7.2 Multimérisation : Domaine I

Suite à son ancrage à la membrane plasmique, le précurseur peut passer à l'étape suivante; la multimérisation. La multimérisation des molécules de Gag est à la base de la structure du virion et elle résulte du contact entre les molécules de Gag. Cette étape requiert la présence du domaine I du précurseur. Le domaine I comprend principalement la protéine NC et il joue un rôle critique dans la localisation intracellulaire de Gag et dans la formation de complexes intracellulaires du précurseur Gag⁽³⁷⁷⁾. La protéine NC a une séquence d'acides aminés cystéine-histidine ainsi qu'un grand nombre d'acides aminés basiques. Il faut préciser qu'elle joue un rôle important dans l'encapsidation de l'ARN génomique grâce à l'interaction entre la région Cys-His et la séquence d'encapsidation (ψ) présente sur l'ARN génomique⁽⁷⁰⁾.

Le rôle joué par d'autres protéines présentes sur le précurseur n'est pas non plus négligeable. En effet, il semble que la protéine MA serait aussi impliquée dans la multimérisation⁽⁴⁹⁾. La protéine MA est trimérique et il semble, bien que ce soit encore controversé, que certaines mutations dans la protéine MA affecteraient le trimère et par le fait même la multimérisation de Gag ce qui pourrait influencer l'assemblage^(2, 131, 141). Une autre protéine présente dans le Pr55^{Gag} et pouvant agir au niveau de la multimérisation de ce dernier est la protéine CA. Des études de cristallographie ont permis de montrer que l'extrémité NH2 de la protéine CA est organisée en anneaux formant des hexamères alors que l'extrémité COOH forme un dimère. C'est ce qui permet la liaison des différents anneaux entre eux⁽²⁴¹⁾. Des mutations dans l'extrémité NH2 affectent la morphologie du virion alors que des mutations à l'extrémité COOH affectent l'assemblage⁽¹¹²⁾. La région MHR (major homology region) présente sur la protéine CA peut également affecter l'assemblage lorsque certains acides aminés sont mutés⁽²⁶²⁾.

Maintenant que le rôle joué par chaque composante a été décrit voyons comment toutes ces composantes peuvent mener à l'assemblage de la particule virale. Il semble que l'assemblage du VIH-1 requiert à la fois une interaction protéines-protéines ainsi qu'une interaction protéines-ARN. L'interaction protéines-protéines implique à la fois les interactions MA-MA et CA-CA et probablement NC-NC puisque des multimères de la protéine NC peuvent se lier à l'ARN⁽²⁸²⁾. L'interaction protéine-ARN fait référence à la liaison entre la protéine NC et l'ARN génomique. En liant l'ARN, la protéine NC concentre les molécules du précurseur Gag sur une ou plusieurs molécules d'ARN, ce processus est la nucléation. La concentration des molécules de Gag favorise les interactions protéines-protéines entre les différents domaines du précurseur Pr55^{Gag} ce qui permet de sculpter la structure de la nouvelle particule. Ce modèle suggère que la liaison NC-ARN agit comme une plateforme qui permet le recrutement des molécules du précurseur⁽⁷⁰⁾.

3.7.3 Bourgeoisement : Domaine L

La dernière étape de l'assemblage implique le bourgeoisement de la particule virale. Des analyses de mutagenèse effectuées sur le précurseur Gag ainsi que des délétions dans la séquence de ce dernier ont permis de définir de courtes séquences requises pour le bourgeoisement adéquat de la particule virale^(156, 184). Ces séquences ou motifs sont maintenant connus sous l'appellation de domaine L (late domain) et ce puisque les mutations stoppent l'assemblage à des étapes tardives⁽³²⁶⁾. Il est intéressant de constater que ces domaines sont non seulement présents chez les rétrovirus mais également chez la majorité des virus à ARN de polarité négative et positive⁽²⁹²⁾.

Jusqu'à ce jour trois classes de domaines L ont été répertoriées. La première est la classe du domaine L représentée par le motif P(T/S)AP. Ce motif a été identifié dans la protéine p6 du précurseur Gag⁽¹⁵⁶⁾. Le domaine L PTAP recrute la protéine cellulaire TSG101 dont le rôle est de cibler les protéines nécessaires à la formation des corps multivésiculaires (MVBs)^(104, 150). Le motif PTAP se lie au domaine UEV situé à l'extrémité amino-terminale de la protéine TSG101, plus précisément dans une cannelure du domaine UEV. Chacun des acides aminés du motif PTAP fait contact avec la cannelure ce qui souligne l'importance de la conservation du motif. L'implication de la protéine TSG101 dans le bourgeoisement a été mise en évidence suite aux études réalisées chez son homologue, la levure. La délétion de cette protéine chez la levure empêche le ciblage des protéines vacuolaires qui sortent du Golgi. Ce processus s'apparente à celui associé au bourgeoisement de la particule virale⁽²⁹²⁾.

La seconde classe de motif du domaine L, qui a été répertoriée, est le motif YP(X)_nL. Ce dernier est présent dans la protéine p6 du précurseur chez le VIH-1 et il est représenté par la séquence en acides aminés suivante : YPLTSL. Ce motif recrute la protéine cellulaire AIP1/Alix qui facilite le bourgeoisement⁽⁴¹⁸⁾. Tout comme TSG101, la protéine AIP1/Alix agit généralement au niveau de la formation des MVB⁽³⁰¹⁾.

La dernière classe de motif du domaine L est, quant à elle, représentée par le motif PPxY. Ce motif est une séquence consensus qui est reconnue par les domaines W W présents dans les protéines et qui permet la liaison de celles-ci au motif⁽²⁵⁷⁾. Le motif PPxY peut lier le domaine W W présent dans les protéines de la famille Nedd4, reconnue pour être impliquée dans le bourgeonnement de plusieurs virus⁽¹³⁶⁾. Cependant, il existe plusieurs protéines associées à la famille Nedd4 chez les cellules animales et aucun consensus général n'a pu être établi en ce qui concerne l'existence d'un partenaire commun capable de lier le domaine L. Malgré cela, il a été observé que les protéines de la famille Nedd4 seraient impliquées dans la formation des MVBs, tout comme les partenaires cellulaires dont il a été question précédemment⁽²⁹²⁾.

3.8 Relâche de la particule virale

L'étape qui finalise le bourgeonnement est la relâche de la particule virale. Suite à cette étape, la nouvelle particule virale aura acquis les glycoprotéines virales nécessaires à l'infection d'autres cellules. La maturation des différentes protéines virales sera complétée peu de temps après la relâche de la nouvelle particule.

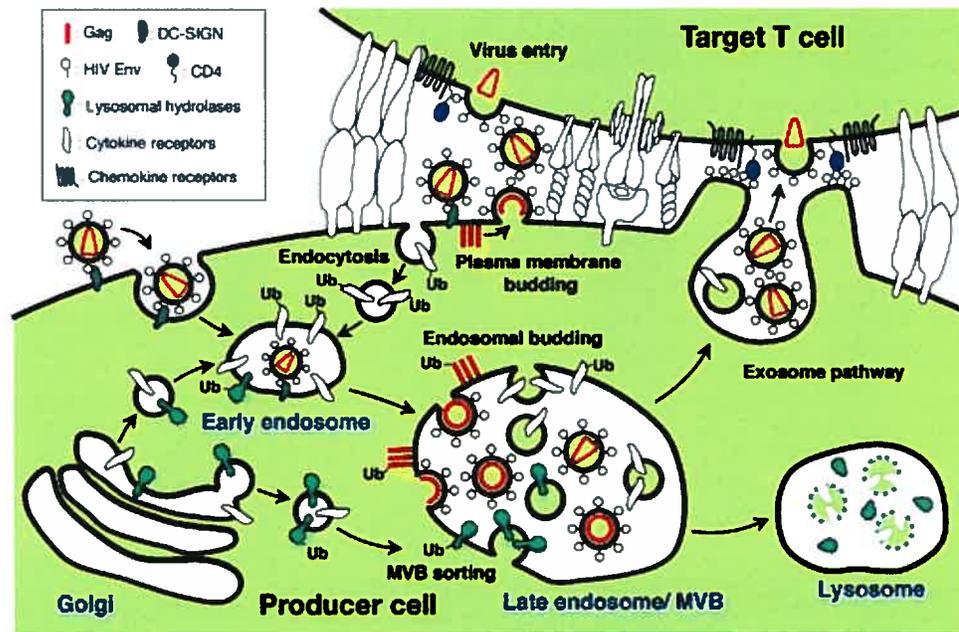
Les lentivirus, dont fait partie le VIH-1, ont longtemps été reconnus pour bourgeonner et être relâchés seulement à la membrane plasmique de la cellule cible. Cependant, dans la section précédente il a clairement été démontré que le domaine L du précurseur Gag, lors de son assemblage, s'associe avec plusieurs éléments impliqués dans la formation des corps multivésiculaires (MVBs). De nombreuses évidences montrent que la relâche du VIH-1 peut également se faire via ces vésicules MVBs⁽¹⁰³⁾. Dans les prochaines sections il sera question des différents éléments associés à la relâche de la particule virale à la membrane plasmique et aux MVBs (Figure 10).

3.8.1 Compartiments intracellulaires : Corps multivésiculaires (MVBs)

Tout d'abord, il convient de définir ce que sont les MVBs avant même de traiter de la relâche virale. Les MVBs sont des structures intracellulaires

Figure 10
Page 58

Représentation de la relâche de la particule virale à la membrane plasmique et de la relâche aux corps multivésiculaires (MVBs). Ce schéma a été tiré de Morita, E., et Sundquist, W.I. 2004. Retroviruses budding. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:395-425, puis il a été adapté pour les besoins de la revue.



retrouvées plus précisément au niveau des endosomes. Les MVBs sont présents chez les cellules eucaryotes et ils sont impliqués dans la voie des exosomes. Les MVBs sont formés suite à l'invagination vers l'intérieur de la membrane de l'endosome et au bourgeonnement de la vésicule dans la lumière de l'endosome. L'accumulation de plusieurs vésicules à l'intérieur de l'endosome forme les MVBs⁽¹⁵⁷⁾. Jusqu'à ce jour plus d'une quinzaine de protéines, impliquées soit dans la formation des MVBs ou dans le ciblage aux MVBs, ont été répertoriées. Parmi ces protéines il y a l'ubiquitine et plusieurs protéines de la classe E.

L'hypothèse du "Cheval de Troie" ("Trojan"), émise récemment, suggère que la relâche du VIH-1 dans les macrophages se ferait à l'intérieur de la cellule et non à la membrane plasmique. Elle suggère également que cette dernière se ferait par la voie des exosomes et qu'elle impliquerait les MVBs⁽²⁹⁸⁾. Il est toutefois important de mentionner que bien que le rôle joué par les MVBs soit plus souvent associé à la relâche du VIH-1 dans les macrophages, leur rôle ne se limite pas qu'à ce type cellulaire. En effet, il est possible que les MVBs soient associés à la relâche du VIH-1 dans les cellules HeLa et les cellules T lorsque le ciblage à la membrane plasmique est altéré. Cependant, il est également possible que le mécanisme de relâche aux MVBs soit toujours utilisé en partie mais qu'il soit masqué par une relâche plus forte à partir de la membrane plasmique⁽³¹²⁾.

3.8.1.1 Rôle de l'ubiquitine

L'ubiquitine est une petite protéine très conservée dont le rôle premier consiste à marquer les protéines pour la dégradation par le protéasome. L'ubiquitine sert également de signal permettant le ciblage des protéines aux endosomes précoces lors de l'endocytose⁽¹⁷⁵⁾. Ceci implique que la majorité des protéines qui pénètrent dans les MVBs sont déjà ubiquitinylées. Bien qu'il existe des mécanismes qui ciblent les protéines aux MVB en absence d'ubiquitine⁽³⁵⁴⁾, l'ubiquitination est nécessaire et suffisante pour cibler la plupart des protéines aux MVBs⁽²⁰⁶⁾. Cette activité serait la responsabilité d'ubiquitine ligases E3.

L'ubiquitination joue également un rôle dans la relâche des virus enveloppés qui utilisent les domaines L P(S/T)AP et PPxY⁽⁴⁵⁰⁾. Bien que le mécanisme exact ne soit pas encore connu, il existe plusieurs arguments en faveur de l'implication de l'ubiquitine dans la relâche du VIH-1. Plusieurs rétrovirus, dont le VIH-1, incorporent un haut niveau d'ubiquitine dans leurs particules virales⁽³¹⁸⁾. La protéine Gag du VIH-1 est mono-ubiquitinylée à plusieurs endroits⁽³¹⁷⁾. Les niveaux d'ubiquitination de Gag varient en fonction de la présence ou de l'absence des domaines L⁽²⁷¹⁾. La présence d'inhibiteurs du protéasome, qui réduisent la quantité d'ubiquitine libre dans la cellule, diminue le nombre de précurseurs Gag mono-ubiquitinylés et entraîne l'arrêt du bourgeonnement⁽³⁹¹⁾. Enfin, l'ubiquitine mutée inhibe le bourgeonnement du virus⁽⁴¹⁹⁾. Cependant, il semble que des mutations dans le précurseur Gag du VIH-1, qui diminuent l'ubiquitination de ce dernier, n'altèrent pas la relâche de façon significative⁽³¹⁷⁾. Le mystère autour de l'incorporation de l'ubiquitine dans les particules virales persiste. Il est possible que l'importance de l'ubiquitination du précurseur Gag diffère selon le domaine L impliqué et qu'elle puisse varier selon le type cellulaire⁽¹⁰³⁾.

3.8.1.2 Rôle des protéines de la classe E

La caractérisation structurale des protéines Vps a mené à la classification des morphologies distinctes des vacuoles. La classe E inclut les compartiments pré-vacuolaires, ayant une taille exagérée, dans lesquels les protéines Vps s'accumulent⁽²⁰⁷⁾. Ces protéines s'attachent à la membrane des endosomes à l'endroit où l'invagination de la membrane vers l'intérieur se produit. Plusieurs protéines Vps s'assemblent en complexes ESCRT-I, II ou III. Cette classe comprend également les protéines Vps4 qui ont une activité enzymatique⁽²⁰⁾. Des mutations dans la protéine Vps4 qui inhibent la liaison à l'ATP inhibent également le ciblage aux MVBs. Les mutants de la protéine Vps4 peuvent également inhiber la relâche des rétrovirus qui bourgeonnent de la cellule via les domaines L⁽¹⁵⁰⁾.

Les protéines HRS font également partie de la classe E et elles sont reconnues pour s'associer avec les protéines ubiquitinylées dans l'endosome précoce. Elles font partie d'un complexe formé des protéines STAM, EPS15 et de

la clathrine. Il n'existe, pour l'instant, aucune évidence démontrant que la protéine HRS soit impliquée directement dans le bourgeonnement des rétrovirus. Cependant, elle permet le recrutement du complexe ESCRT-I. Le complexe ESCRT-I, quant à lui initie la cascade d'événements qui mènent à l'assemblage des protéines de la classe E responsables de la formation des MVBs. Le complexe est recruté suite à l'interaction entre les protéines HRS et TSG101⁽²⁹²⁾. Le second complexe recruté est le complexe ESCRT-II qui est également essentiel au ciblage des protéines ubiquitinyliées aux MVBs, cependant aucun lien direct n'a pu être établi entre sa présence et le bourgeonnement. Le dernier complexe majeur recruté à la membrane de l'endosome est le complexe ESCRT-III⁽¹⁹⁾. Les cellules humaines comprennent un total de dix protéines reliées au complexe ESCRT-III. Ces protéines se nomment CHMP et elles ont chacune un rôle bien spécifique. Ces protéines sont associées à la relâche virale puisque des mutants dominants-négatifs représentant ces protéines inhibent la relâche du VIH-1⁽²⁷²⁾.

La classe E regroupe également la protéine AIP1/Alix. Cette protéine interagit avec la protéine TSG101, par le motif PTAP, et avec une classe de protéines CHMP de complexe ESCRT-III. La protéine AIP1/Alix joue un rôle dans la relâche aux MVBs en favorisant la courbature de la membrane de l'endosome. Cette protéine peut également lier le motif YP(x)_nL du domaine L permettant ainsi l'accès des virus aux MVBs⁽²⁹²⁾.

Il est maintenant clair que les domaines L présents chez les rétrovirus doivent interagir avec les protéines de la classe E pour assurer la relâche. Il est également important de mentionner que le point d'entrée aux MVBs dépend de l'interaction spécifique entre les protéines de classe E et les domaines L. Dans le cas du VIH-1, le motif P(T/S)AP est impliqué dans la relâche du virus qui se fait suite à l'interaction entre le complexe ESCRT-I et la protéine TSG101 au niveau des MVBs⁽¹⁰³⁾. Il est connu que le domaine L catalyse le pincement final ("pinching-off"), qui doit se faire à la membrane, afin de permettre le relâchement de la particule virale⁽¹⁵⁶⁾. Cependant, il reste à déterminer les facteurs cellulaires associés au pincement final⁽¹⁰³⁾.

3.8.2 Relâche à la membrane plasmique

3.8.2.1 Relâche aux domaines apical et basolatéral

Bien qu'il a été démontré à la section précédente que le précurseur Pr55^{Gag} du VIH-1 soit la seule protéine rétrovirale requise pour la relâche efficace de la particule virale, la relâche peut être influencée par l'expression d'autres protéines virales. La relâche des particules virales sans glycoprotéines virales, se fait à la fois à la surface apicale et à la surface basolatérale des cellules épithéliales polarisées. Toutefois, lorsque la glycoprotéine d'enveloppe est exprimée, la particule virale est alors ciblée à un endroit bien spécifique de la cellule polarisée, plus précisément à la surface basolatérale. Ce ciblage spécifique dépend d'un motif présent dans la région cytoplasmique de la gp41^(248, 249, 322). L'influence du motif à base de tyrosine est également observable lors de la relâche virale dans les lymphocytes⁽¹⁰⁷⁾. Le rôle de ce motif sera discuté plus en détails à la section 4. Il semble que la présence de la glycoprotéine virale à un endroit spécifique de la cellule influence l'interaction avec Gag sans cibler pour autant la relâche virale à cet endroit. En effet, il a été démontré que lorsque la glycoprotéine virale est retenue au RE, Gag est redirigé vers le RE. Ceci a pour effet de retarder le bourgeonnement qui se fait tout de même à la membrane plasmique et non à la membrane du RE^(376, 447). Ce point sera repris plus en détails au cours du chapitre 4. C'est cependant l'incorporation des glycoprotéines virales, présentes à la surface des cellules, qui permettra à la nouvelle particule virale relâchée d'être infectieuse. Le rôle des glycoprotéines au niveau de la pathogenèse sera traité à la section 6.

Lors de la relâche de la particule il n'y pas que la glycoprotéine virale qui est incorporée. Une des particularités du VIH-1 est qu'il peut incorporer des glycoprotéines appartenant à d'autres rétrovirus ou des facteurs associés à la cellule cible, tels HLA-DR, LFA-1 et ICAM-1^(24, 434). En ce qui concerne la molécule d'adhésion ICAM-1, son incorporation chez le VIH-1 augmente à la fois l'avidité entre la cellule hôte et le virus, lors de la fusion entre les deux membranes, et l'entrée du virus dans la cellule⁽³⁵⁸⁾. Bien que le rôle précis de l'incorporation des protéines cellulaires dans l'infection par les rétrovirus reste à

déterminer, il semble que le domaine cytoplasmique de la protéine transmembranaire virale soit impliqué dans l'incorporation de ces dernières. En effet, des études réalisées avec le VIS ont démontré que les niveaux d'incorporation des protéines HLA-I et HLA-II, chez le VIS, sont nettement plus élevés lorsque le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine est de pleine longueur⁽⁴⁵³⁾. Chez le VIH-1, l'incorporation de la molécule HLA-I se fait que la glycoprotéine virale soit présente ou non. Il a également été possible de constater que l'incorporation de cette dernière peut se faire en présence d'une glycoprotéine dont le domaine cytoplasmique est tronqué en autant que les 42 premiers acides aminés soient présents⁽³⁴¹⁾. Des études réalisées par le groupe de Michel Tremblay ont également montré que la glycoprotéine du VIH-1 est dispensable à l'incorporation des molécules HLA-DR et ICAM-1^(269,372).

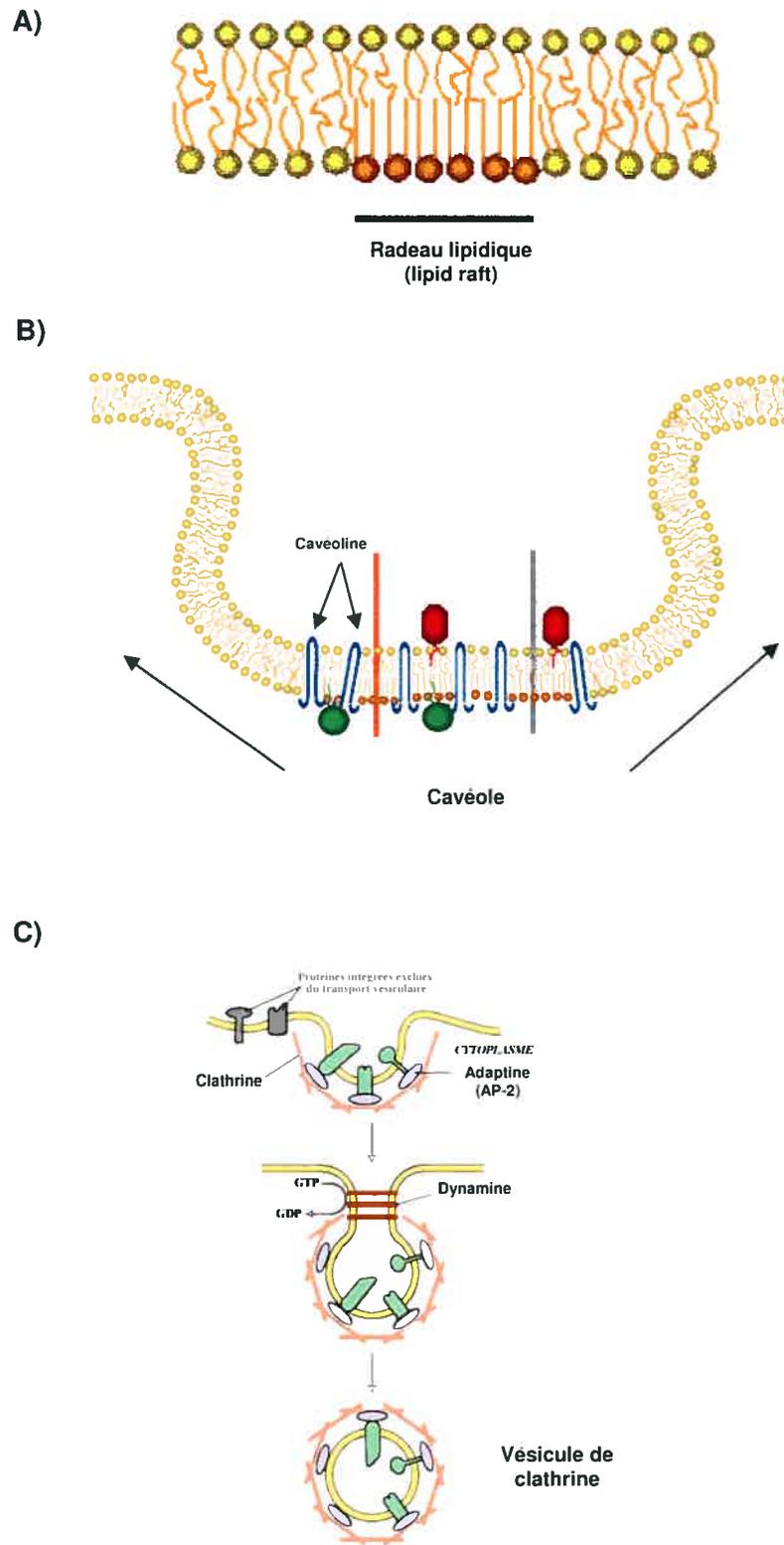
L'expression de la protéine rétrovirale Vpu joue également un rôle au niveau de la relâche virale. La présence de la protéine Vpu fait augmenter la relâche virale d'environ sept fois chez les cellules humaines⁽³⁷⁾. Les particules virales qui ne possèdent pas la protéine Vpu s'accumulent à l'intérieur de la cellule ou à la membrane plasmique⁽²¹⁵⁾. Chez le VIH-2, où la protéine Vpu est absente, le rôle de cette dernière est joué par l'enveloppe virale⁽³⁶⁾.

3.8.2.2 Radeaux lipidiques (lipid rafts)

Des études récentes ont montré que la relâche virale du VIH-1, à la membrane plasmique, pouvait se faire dans des microdomaines riches en cholestérol et en glycosphingolipides, domaines connus sous le nom de radeaux lipidiques (Figure 11A). L'association des protéines virales, tel le précurseur Pr55^{Gag}, aux radeaux lipidiques pourrait favoriser les interactions protéines-protéines lors de l'assemblage, augmenter la transmission virale lors d'un contact cellule à cellule et augmenter l'infectivité des virions libres⁽¹⁰³⁾. Le VIH-1 se sert des radeaux lipidiques lors de son assemblage et de son bourgeonnement. En effet, il est possible d'observer un enrichissement des molécules ou des protéines associées aux radeaux lipidiques à l'intérieur des particules virales^(299, 313). De plus, il est possible d'isoler certaines protéines du VIH-1 (Pr55^{Gag}, la gp41 et Nef) dans les fractions membranaires qui résistent aux traitements par certains

Figure 11
Page 65

Représentation schématique d'un radeau lipidique (A), d'une cavéole (B) et d'une vésicule de clathrine (C). Les figures ont été tirées et adaptées de Simons, K. et Ikonen, E. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387 : 569-572; Anderson, R. G. W. 1998. The caveolae membrane system. *Ann.Rev.Biochem.* 67: 199-225; Alberts, B. 1999. *Essentiel de la Biologie Cellulaire*, Édition Garland.



détergents, ce qui est une caractéristique associée aux radeaux lipidiques^(179, 370, 456). Finalement, une déplétion du cholestérol, qui est la composante essentielle des radeaux lipidiques, inhibe la relâche virale⁽⁵⁰⁾. Pour l'instant, il semble que le rôle le plus généralement associé aux radeaux lipidiques dans la relâche virale soit de concentrer les facteurs nécessaires à l'assemblage et à la relâche.

4. Mécanismes d'internalisation des protéines membranaires

L'accumulation des glycoprotéines cellulaires ou virales à la surface des cellules est régulée par des mécanismes présents chez la cellule. Ces mécanismes font en sorte que les glycoprotéines synthétisées soient recyclées ou dégradées afin d'éviter un encombrement à la surface de la cellule pouvant nuire à certaines fonctions exercées par certaines protéines cellulaires ou virales. Parmi ces mécanismes, l'internalisation par les vésicules de clathrine est le plus connu. C'est sur cet aspect essentiel que sera mise l'emphase au cours de cette section. Les éléments et les motifs associés à l'internalisation des glycoprotéines, en particulier par les vésicules de clathrine (Figure 11C), seront donc examinés plus en détails.

4.1 Clathrine vs Cavéoles

Il existe une ou plusieurs formes d'internalisation chez la majorité des cellules eucaryotes. Ce processus permet entre autre à la cellule de maintenir un équilibre en récupérant les protéines et les lipides, amenés à la membrane plasmique, par une activité sécrétoire constante. Ce maintien s'effectue, de façon spécifique, lors de la transmission de signaux au niveau neuronal, et de façon plus générale à la majorité des membranes cellulaires. Cette activité d'internalisation permet également à l'organisme de réguler les interactions avec le monde externe et de bâtir une défense contre des agents pathogènes. Paradoxalement, plusieurs agents infectieux manifestent leurs effets après avoir été internalisés par la cellule hôte, démontrant ainsi leur capacité d'adaptation.

L'endocytose par les vésicules de clathrine, qui sera discutée de façon exhaustive un peu plus loin, représente la voie d'internalisation la plus étudiée. Il

existe cependant d'autres voies dites clathrine indépendante : une première voie nommée macropinocytose et une autre voie impliquant les cavéoles.

Les cavéoles sont en fait des puits présents à l'intérieur de la membrane plasmique qui ont été identifiés, au départ, dans les cellules endothéliales et adipeuses^(11, 334). Les cavéoles sont riches en cholestérol et en sphingolipides (Figure 11B). Elles peuvent être détruites par les mêmes agents qui permettent d'extraire le cholestérol et sont insolubles au Triton X-100. De ce fait, elles sont une sous-classe de domaines membranaires riches en cholestérol et résistants aux détergents, que l'on nomme également radeaux glycolipidiques^(11, 145, 163, 408). Le côté cytoplasmique de la cavéole se distingue par la présence de striations qui seraient formées par l'accumulation d'une protéine membranaire; la cavéoline⁽³⁶⁸⁾. La formation de cavéoles dans l'endothélium est associée à la transcytose, contrairement aux vésicules de clathrine, qui elles, sont associées au transport via les endosomes et les lysosomes^(153, 284). Le rôle joué par la cavéole dans d'autres types cellulaires demeure par contre plus obscur. Il en est de même en ce qui concerne certaines fonctions qui lui sont associées tel le ciblage polarisé dans les cellules épithéliales et la transduction de signaux^(12, 245). L'endocytose impliquant la cavéole a été mise en évidence entre autre pour la toxine du choléra liée au ganglioside GM1, pour SV40 ainsi que pour le récepteur AMF (autocrine motility factor)^(224, 236, 290, 333, 398, 432).

Il existe un autre mode d'endocytose, indépendant de la clathrine, nommé macropinocytose qui est utilisé par les macrophages, les cellules dendritiques et les fibroblastes. La macropinocytose permet le transfert passif de macromolécules dans les macropinosomes qui seront par la suite livrées aux lysosomes ou recyclées^(349, 350, 416). Cependant, tout comme pour l'internalisation par les cavéoles, le rôle exact joué par la macropinocytose n'est pas très clair.

4.2 Clathrine

Pour la plupart des types cellulaires de mammifères, l'internalisation de ligands liés à des récepteurs, ou l'internalisation de fluide extracellulaire se fait suite à la formation de vésicules de clathrine. Les vésicules de clathrine ont été

identifiées pour la première fois dans le cerveau et associées à l'endocytose de la membrane pré-synaptique, suite à l'exocytose des vésicules synaptiques⁽³³¹⁾.

4.2.1 Structure et assemblage

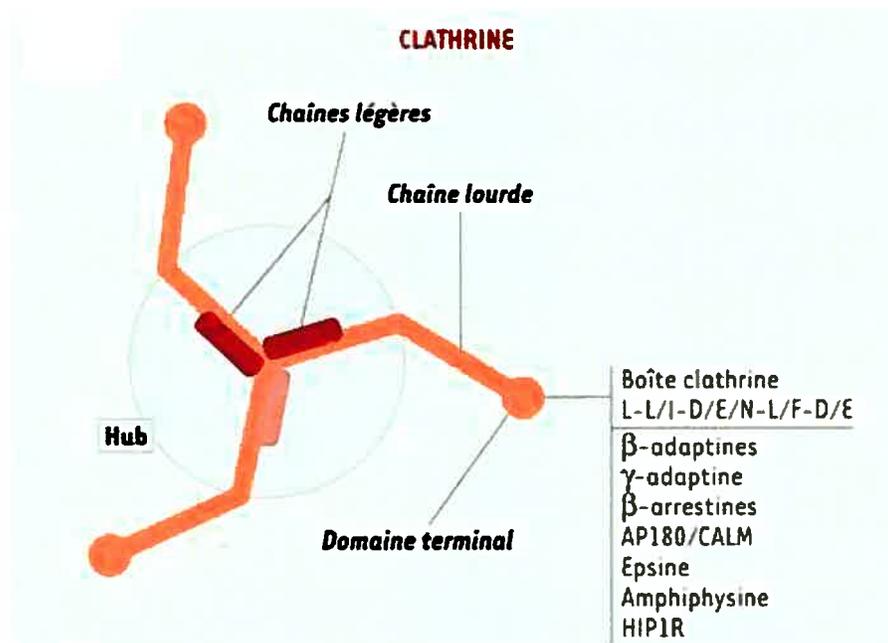
Le manteau des vésicules est formé d'un treillis d'hexagones et de pentagones de protéines de clathrine. Chaque unité fonctionnelle de clathrine est formée d'un triple squelette composé de 3 chaînes lourdes de 180 kDa chacune en complexe avec une chaîne légère de 30-35 kDa (Figure 12)⁽³³¹⁾.

La chaîne lourde s'exprime chez tous les types de cellules eucaryotes avec un très haut degré d'homologie entre la protéine des cellules de mammifères et celle de la levure *Saccharomyces cerevisiae*⁽³²⁹⁾. La chaîne légère est quant à elle plus polymorphique et il est en effet possible d'observer un bon nombre de différences de séquence en acides aminés entre la protéine chez les cellules de mammifères et celle de la levure⁽⁴⁰²⁾. Bien que le rôle de la chaîne lourde soit connu, puisqu'elle procure la charpente du treillis de manteau de clathrine, il semble que celui de la chaîne légère reste largement à définir. En effet, sa présence ou son absence ne nuit en rien à l'assemblage des chaînes lourdes ni à la stabilité du manteau chez les cellules de mammifères⁽³⁸⁴⁾. Cependant chez les levures, l'absence des chaînes légères affecte la structure de la même façon que l'absence des chaînes lourdes⁽⁶⁹⁾. Il semble également que la chaîne légère soit responsable de la phosphorylation d'une des sous-unités de l'adaptine AP-2, dont le rôle sera discuté plus loin⁽³²⁷⁾.

Chaque portion du triple squelette est composée de trois régions distinctes. Un premier long segment proximal de 17nm séparé par un coude d'un second segment distal de 25nm. Ce dernier est lui-même suivi d'un domaine globulaire composé de la partie amino-terminale de la chaîne lourde de la clathrine⁽²¹³⁾. La région amino-terminale est liée à un court domaine flexible qui permet au domaine globulaire d'être replié vers l'intérieur du triple squelette⁽¹⁷⁴⁾. Les chaînes légères de la clathrine se lient aux chaînes lourdes le long du segment proximal^(44, 214). Afin de former un manteau de clathrine complet il faut un total de 12 pentagones et un nombre variable d'hexagones⁽⁸⁵⁾.

Figure 12
Page 70

Représentation schématique de la clathrine et de ses différentes chaînes. Le schéma a été tiré de Benmerah, A. et Lamaze, C. 2002. Endocytose : chaque voie compte ! Médecine Sciences Vol18 (11), puis il a été adapté pour les besoins de la revue.



Il peut sembler difficile d'envisager qu'une structure formée d'un triple squelette d'hexagones s'assemble en un treillis courbé constitué à la fois d'hexagones et de pentagones. En fait, ce réarrangement devient possible grâce à des molécules chaperones, qui ne sont pas des composantes stables des vésicules de clathrine, ou grâce à l'effet de GTP sur l'invagination des puits de clathrine⁽⁵¹⁾. Les molécules chaperones ou adaptines seront traitées dans la prochaine section.

4.3 Adaptines

4.3.1 Structure et types

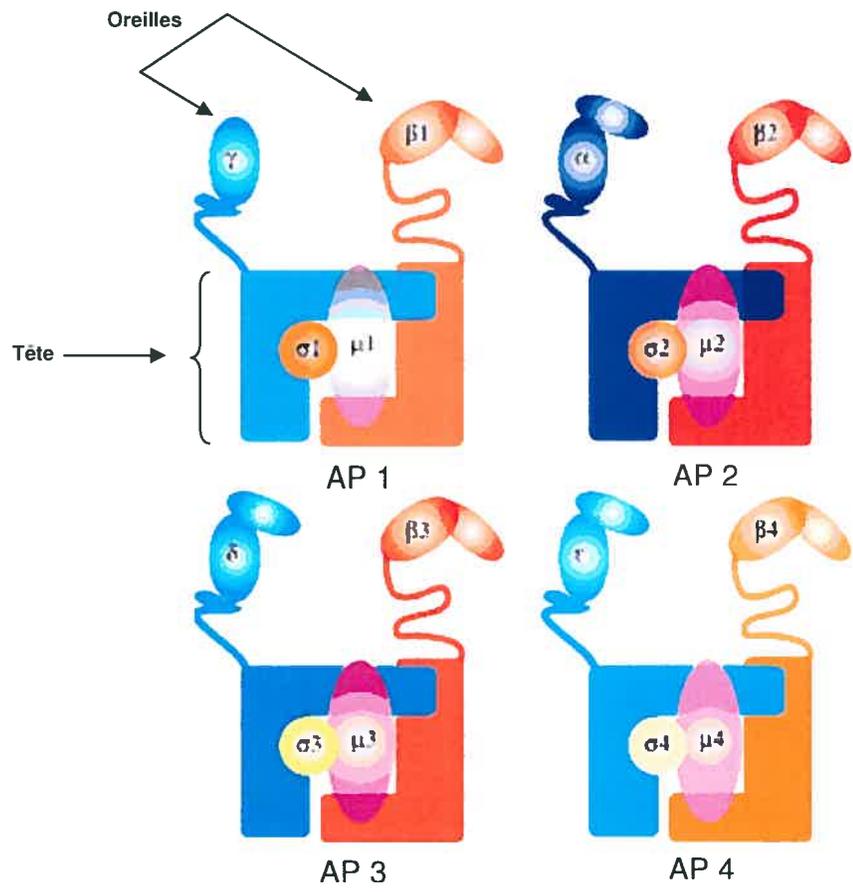
Tel que mentionné précédemment, durant l'assemblage du manteau de clathrine et de l'invagination de la membrane plasmique, la clathrine entre en contact avec plusieurs protéines dont certaines sont directement liées au recrutement de molécules dites "cargo". Elles sont appelées adaptines puisqu'elles font le pont entre le manteau de clathrine et le ciblage du cargo⁽²¹²⁾.

Il existe deux types d'adaptines, les monomériques et les multimériques. Pour les besoins de cette revue seules les adaptines multimériques seront discutées plus en détails. Mentionnons simplement que l'internalisation par les vésicules de clathrine peut également nécessiter l'aide des adaptines monomériques ayant une simple sous-unité capable de lier les domaines des sous-unités α et β de l'adaptine AP-2. Dans cette classe figurent les protéines dites accessoires : les protéines Eps15, l'epsine, l'amphiphysine, l'AP180 ainsi que la β -arrestine^(251, 256, 344, 433, 464).

Les adaptines multimériques regroupent une famille d'adaptines (AP) constituées de complexes hétérotétramériques ayant une taille de 300 kDa. Cette famille comprend les adaptines AP-1 à AP-4 (Figure 13)⁽²¹²⁾. Chaque complexe est formé de deux chaînes lourdes γ 1 et β 1 pour l'AP-1, α 2 et β 2 pour l'AP-2, δ 3 et β 3 pour l'AP-3 et ϵ 4 et β 4 pour l'AP-4. Chaque complexe contient également une chaîne moyenne; μ 1 à μ 4 ainsi qu'une petite chaîne; α 1 à α 4 pour les adaptines AP-1 à AP-4. Les chaînes lourdes ont un poids moléculaire de 100

Figure 13
Page 73

Représentation schématique des quatre familles d'adaptines et de leurs différentes sous-unités. Le schéma a été tiré et adapté de McMahon, H.T. Neurobiology Division, Laboratory of Molecular Biology (http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/NB/McMahon_H/group/Adaptors/).



kDa, les chaînes moyennes ont, quant à elles, un poids de 50 kDa alors que les petites chaînes ont un poids moléculaire d'environ 20 kDa⁽²¹²⁾. Visuellement le complexe hétérotétramérique est constitué d'un corps ayant la forme d'une tête flanqué de deux oreilles disposées de façon symétrique et reliées à la tête par une queue possiblement flexible⁽¹⁷⁷⁾. Bien que l'organisation des adaptines soit connue il existe peu de données sur l'assemblage du complexe et sur les interactions entre les différentes sous-unités durant la formation du complexe. Des études de double-hybride chez la levure ont démontré que les sous-unités α et γ interagissent avec les sous-unités β et σ et que les sous-unités β peuvent également interagir avec les sous-unités μ ⁽³²³⁾.

4.3.2 Fonction du complexe et des sous-unités

Les adaptines jouent un rôle durant l'assemblage du manteau de clathrine. En effet, même si le manteau de clathrine peut s'assembler en absence d'adaptines il a été observé que la présence d'adaptines durant l'assemblage permet d'obtenir un manteau de taille uniforme favorisant l'assemblage dans des conditions plus physiologiques⁽⁴⁹¹⁾. Il a également été proposé que les adaptines favorisent la liaison de la clathrine à la membrane en se positionnant entre le treillis de clathrine et la membrane de la vésicule. Lorsqu'on enlève la clathrine du manteau par traitement chimique ou en incubant avec l'ATPase Hsc70, il est possible d'observer des adaptines à la membrane de la vésicule^(382, 467). Malgré le mauvais ciblage de l'AP-2 aux endosomes, suite à l'ajout de GTP γ S, il est possible d'observer la présence de la clathrine aux endosomes⁽¹⁷⁷⁾.

Les adaptines peuvent également se lier aux domaines cytoplasmiques des protéines membranaires, ce qui permet la concentration de ces dernières dans les vésicules de clathrine. Cette fonction de triage lors des différentes étapes de transport et d'internalisation des protéines est sans doute la principale fonction des adaptines. Le récepteur M6P (mannose 6-phosphate) se retrouve en grande concentration dans les vésicules de clathrine, au niveau du TGN ("Trans Golgi Network") et de la membrane plasmique. Il forme des agrégats avec l'adaptine AP-2 et constitue le premier exemple de liaison possible entre une protéine cargo et les adaptines⁽³³⁰⁾. D'autres études ont permis de démontrer que

les adaptines interagissent avec la queue de plusieurs récepteurs tant au niveau de la membrane plasmique qu'au niveau du TGN.

Bien que les sous-unités des adaptines soient liées entre elles de façon très serrée elles ont quand même des fonctions bien distinctes. En effet, les sous-unités β sont impliquées dans la liaison aux molécules de clathrine alors que les sous-unités μ sont quant à elles impliquées dans la reconnaissance des signaux de ciblage présents dans les protéines ainsi que dans la liaison subséquente⁽¹⁷⁷⁾. Cette fonction sera discutée à la section 4.5. De plus, la liaison des sous-unités des adaptines à certains motifs, présents dans la partie cytoplasmique des protéines et liés aux signaux de ciblage, permet le ciblage des glycoprotéines à des endroits spécifiques chez les cellules polarisées. Il est à noter que cette fonction sera discutée plus en détails à la section 5.

4.4 Dynamine

4.4.1 Structure et rôle

Il est bien connu que l'ajout de protéines, capables de lier la GTP, et de composantes nécessaires à la formation du manteau de certaines vésicules peut entraîner le bourgeonnement de celles-ci. C'est d'ailleurs le cas des vésicules recouvertes des protéines COPI et COPII, qui dirigent le transport des protéines entre le RE et le Golgi^(22, 316). En ce qui concerne les vésicules de clathrine, la dynamine serait nécessaire au bourgeonnement de ces dernières. La dynamine fait partie de la super famille des GTPase. Cependant sa taille (100 kDa), sa faible affinité pour la GTP et sa grande capacité à hydrolyser la GTP en font un membre non conventionnel⁽³⁸⁶⁾. La dynamine a été découverte la première fois chez la drosophile et il a été possible d'identifier par la suite trois isoformes chez les mammifères : dynamine-1 qui est spécifique aux neurones, la dynamine-2 qui s'exprime de façon ubiquitaire et la dynamine-3 qui est spécifique aux testicules^(297, 412).

La dynamine contient trois domaines distincts : un domaine catalytique de liaison à la GTP en N-terminal, un domaine central homologue à la pleckstrine

(PH) probablement impliqué dans les interactions phospholipides-protéines et un dernier en C-terminal riche en résidus proline et arginine (PRD). Ce dernier comprend quelques domaines de liaison homologue au domaine Src 3 (SH3)^(311, 400). Des études démontrent que la sur-expression d'un mutant dominant négatif de la dynamine-1, de domaines fonctionnels de la dynamine ou de son partenaire l'amphiphysine inhibent l'endocytose des vésicules de clathrine. Ceci a permis de définir le rôle joué par la dynamine dans l'internalisation^(88, 401). De plus, il semble que le domaine central PH soit nécessaire à l'endocytose dépendante des vésicules de clathrine en médiant la liaison entre la dynamine et les phosphoinositides⁽³⁾. La dynamine serait également impliquée dans le bourgeonnement de la cavéole, puisque le bourgeonnement de celle-ci nécessite l'hydrolyse de la GTP^(173, 389). De plus, tout comme pour les vésicules de clathrine, la sur-expression de mutants de la dynamine-1 entraîne l'accumulation de la cavéole à la surface de la cellule⁽³⁰⁵⁾.

La dynamine serait également impliquée dans le transport des vésicules intracellulaires au même titre que les protéines vsp1p et dnm1p, qui sont des membres de la famille des dynamines chez *Saccharomyces cerevisiae*^(148, 476). Chez les mammifères, la dynamine-2 serait impliquée dans le bourgeonnement des vésicules qui se forment au niveau du TGN⁽⁸⁸⁾.

Il existe un modèle, généralement reconnu, pouvant expliquer comment la dynamine peut entraîner l'internalisation des vésicules de clathrine. Tout d'abord, au cours des étapes de liaison et d'assemblage, la dynamine sous forme d'homodimère ou d'homomultimère serait ciblée à un compartiment spécifique de la membrane. Ce ciblage est rendu possible grâce à la liaison de sa portion PDR à un domaine SH3 présent sur une protéine ciblée à la membrane. Cette liaison protéine-protéine entraîne l'association entre la portion PHD de la dynamine et une surface lipidique chargée négativement. Suite à cette liaison, la dynamine s'assemble d'elle-même en une structure sous forme de spirales qui a pour effet de resserrer la surface membranaire en tubules⁽²⁸⁰⁾. L'assemblage de la dynamine augmente son activité GTPase ce qui entraîne un changement de conformation de la dynamine. Il se peut que ce changement soit difficile à gérer par la couche bilipidique, puisqu'il dépasse la quantité de courbures normalement

permises et qu'il provoque un pincement de la membrane ou des brisures à des endroits spécifiques sur celle-ci. Finalement, le changement de conformation de la dynamine et le relâchement de la vésicule libère la GDP, hydrolysée par l'activité GTPase de la dynamine, et la Pi. Ces dernières se dissocient en petits oligomères et se détachent de la surface de la membrane. La dynamine peut quant à elle demeurer associée à la vésicule nouvellement synthétisée et assurer le transport vers une autre surface membranaire⁽²⁸⁰⁾.

4.5 Internalisation des glycoprotéines

4.5.1 Glycoprotéines cellulaires

L'internalisation des protéines présentes à la membrane plasmique via les vésicules de clathrine dépend de courtes séquences retrouvées la plupart du temps dans les portions cytoplasmiques des protéines⁽⁴³⁶⁾. Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier deux classes de signaux associés à l'internalisation des protéines. Une première classe qui se caractérise par la présence d'acides aminés aromatiques, la plupart du temps impliquant une tyrosine⁽²²⁸⁾ et une seconde classe dans laquelle il est possible d'inclure le motif di-leucine (L-L) ou le motif isoleucine-leucine (I-L)^(186, 238).

Bien que la présence de la tyrosine soit, elle-même, critique pour l'internalisation, il n'existe aucun consensus sur la séquence exacte requise chez les motifs à base de tyrosine afin que l'internalisation soit efficace. Il doit donc exister plusieurs sous-classes de signaux à base de tyrosine⁽²⁹⁶⁾. Cependant, afin d'obtenir une interaction maximale entre les motifs à base de tyrosine et la sous-unité $\mu 2$ de l'AP-2, il est préférable que la tyrosine soit suivie d'une arginine en position Y+2 et d'une leucine en position Y+3⁽³²⁾. De plus des études de cristallographie, réalisées sur la sous-unité $\mu 2$ liée au motif à base de tyrosine de la protéine TGN38, ou à celui du récepteur du facteur de croissance, ont permis de démontrer que la tyrosine ne doit pas être phosphorylée et que le motif doit adopter une conformation en feuillet β . Cette spécificité est conférée par la présence de poches hydrophobiques qui lient la tyrosine ainsi que la leucine. La conformation adoptée par le motif fait que seul le motif à base de tyrosine peut

lier la sous-unité $\mu 2$ ⁽³²⁰⁾. D'autres analyses ont révélé que bien que les sous-unités $\mu 1A$ et $\mu 1B$ ainsi que les sous-unités $\mu 3A$ et $\mu 3B$ peuvent lier les motifs à base de tyrosine, l'interaction est plus faible⁽³⁵⁾. Une interaction plus faible peut toutefois demeurer significative si les protéines sont concentrées à des régions spécifiques de la cellule.

Les protéines à internaliser sont concentrées à des endroits de la membrane qui sont recouverts de clathrine. Ces dernières interagissent avec les protéines adaptines grâce aux signaux présents dans leur portion cytoplasmique. Les adaptines les plus fréquemment impliquées dans l'internalisation des protéines sont les adaptines AP-1 et AP-2 (Tableau II). L'AP-1 est restreinte aux vésicules présentes au niveau du TGN et est impliquée dans le transport aux endosomes. L'adaptine AP-2 se retrouve, quant à elle, au niveau de la membrane plasmique et est impliquée dans le transport au TGN ou aux lysosomes⁽¹⁶⁷⁾.

La liaison *in vitro* à la sous-unité $\mu 2$ des motifs à base de tyrosine présents dans la portion cytoplasmique de protéines membranaires, tel que la protéine lamp-1⁽⁴⁷⁴⁾, H2-Mb⁽⁶⁸⁾, CD68⁽¹⁸⁰⁾ et TGN38⁽³⁰⁹⁾ a été démontrée. Cette liaison permet le transport de la membrane plasmique aux compartiments lysosomaux dans le cas des trois premières protéines mentionnées plus haut et au TGN dans le cas de la protéine TGN38⁽³⁰⁹⁾. Le récepteur des LDL contient également un motif à base de tyrosine (NPVY) dans sa partie cytoplasmique^(92, 209) tout comme le récepteur de la transferrine (YTRF). Ces derniers sont tous deux internalisés par l'entremise des vésicules de clathrine^(162, 191). Il semble que la présence d'ATP faciliterait l'internalisation de ces récepteurs dans la cellule⁽³⁸⁵⁾. La phogrine est une glycoprotéine qui se localise au niveau des granules sécrétrices tel les DCV (dense-core vesicles) présentes chez plusieurs types cellulaires neuronales et endocriniens^(460, 490). Elle a également un motif à base de tyrosine capable de se lier à la sous-unité $\mu 2$ de l'AP-2 afin de permettre son internalisation dans la cellule ainsi que sa localisation subséquente aux DCV⁽⁴⁵⁹⁾. La portion cytoplasmique de la protéine CD3 γ ainsi que celle du récepteur de l'insuline possèdent quant à elles un motif d'internalisation di-leucine^(161, 238).

Tableau II

Page 80

Résumé des différentes fonctions remplies par les adaptines AP-1 et AP-2 et leurs sous-unités lors de l'internalisation des protéines cellulaires ou virales. Hirst, J., et al. 1999. Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell*, **10**(8): 2787-2802.

Adaptines et sous-unités	Motifs reconnus	Fonctions
AP-1		Ciblage aux endosomes à partir du Golgi via les vésicules de clathrine
Gamma (γ)	DFGxØ DFxDF	Se lie à la membrane du Golgi via Arf1 Recrute des facteurs qui interagissent avec AP-1 (ex : Epsine)
Beta 1 (β 1)	LLNLD présent chez la clathrine [DE]xxxL[LI] présent chez la protéine cargo	Se lie à la membrane du Golgi via Arf1 Se lie à la clathrine Reconnaît les protéines cargos
Mu 1 A et B (μ 1A/ μ 1B)	YxxØ présent chez la protéine cargo	Reconnaît les protéines cargos Interagit avec la membrane du Golgi
Sigma 1 (σ 1)		Stabilise l'adaptine en facilitant l'interaction entre les sous-unités
AP-2		Responsable de l'internalisation des protéines ou des récepteurs situés à la membrane plasmique, via les vésicules de clathrine
Alpha A et C (α A/ α C)	DxF, FxDxF et WVxF	Se lie à la membrane plasmique Recrute des facteurs qui interagissent avec AP-1 (ex : Epsine)
Beta 2 (β 2)	LLNLD présent chez la clathrine [DE]xxxL[LI] présent chez la protéine cargo	Se lie au motif dileucine présent chez la protéine cargo Se lie à la clathrine
Mu 2 (μ 2)	YxxØ présent chez la protéine cargo WVxF	Reconnaît les protéines cargos Interagit avec la membrane plasmique
Sigma 2 (α 2)		Stabilise l'adaptine en facilitant l'interaction entre les sous-unités

4.5.2 Glycoprotéines virales

Tel que déjà mentionné, l'internalisation des glycoprotéines virales de la surface cellulaire jouerait un rôle important dans la biologie du virus. Tout comme dans le cas des protéines cellulaires, les adaptines sont également impliquées dans l'internalisation de ces dernières.

La glycoprotéine de surface hémagglutinine (HA) du virus Influenza est un bon exemple. L'ajout d'un résidu tyrosine en position 543 de la portion cytoplasmique de la protéine HA a permis de mettre en évidence l'importance de la tyrosine dans l'internalisation des protéines à l'aide des vésicules de clathrine⁽²²⁷⁾. De plus, la substitution des acides aminés qui suivent la tyrosine, par des acides aminés critiques et reconnus pour recréer le motif d'internalisation idéal, a également permis d'améliorer l'internalisation de la protéine HA⁽²¹⁹⁾. Un motif tyrosine, permettant l'internalisation des glycoprotéines, a également été identifié chez la glycoprotéine d'enveloppe gB du virus de la pseudo-rage⁽¹²⁶⁾, chez la glycoprotéine transmembranaire du virus du sarcome de Rous qui contient également un motif tyrosine dans sa partie cytoplasmique⁽³⁰⁴⁾ tout comme celle du virus de singe Mason-Pfizer⁽⁴¹¹⁾.

Le virus Nipah de la famille des Paramyxoviridae possède deux glycoprotéines virales, les protéines F et G. Bien que les deux soient internalisées, il semble que seule la glycoprotéine F possède un signal à base de tyrosine qui favorise son internalisation dans la cellule⁽⁴⁴⁹⁾. Le virus de la varicelle, possède deux motifs à base de tyrosine ainsi qu'un motif di-leucine dans la partie cytoplasmique de sa glycoprotéine gB. Parmi ces trois motifs, il a été possible d'attribuer des rôles aux deux motifs à base de tyrosine. Le motif proximal au domaine transmembranaire est responsable de l'internalisation alors que le second est responsable de la localisation au Golgi⁽¹⁶⁸⁾. La glycoprotéine B5R du virus de la vaccine possède un résidu tyrosine ainsi qu'un motif di-leucine dans sa portion cytoplasmique. Bien que la tyrosine ne semble pas faire partie d'un motif classique, il semble que la substitution de cet acide aminé ainsi que des substitutions au niveau du motif di-leucine entraîne l'accumulation de la glycoprotéine B5R à la surface de la cellule⁽⁴⁵⁸⁾. La protéine Us9 du virus de la

pseudo-rage possède un motif di-leucine dans sa portion cytoplasmique qui est également responsable de l'internalisation de la protéine⁽⁴¹⁾.

Il existe également une classe de glycoprotéines virales dont l'internalisation dépend de signaux indépendants de ceux mentionnés plus haut. Le paramyxovirus SV5 possède une glycoprotéine hémagglutinine-neuraminidase HN dont l'internalisation dépend de sept acides aminés présents dans l'ectodomaine. Il est à noter que cette dernière dépend surtout de la présence du glutamate (E37) qui définit possiblement la frontière entre l'ectodomaine et le domaine transmembranaire de la protéine HN⁽²³⁷⁾. La glycoprotéine gB du cytomégalovirus possède une région riche en acides aminés ayant une chaîne latérale acide dans sa partie cytoplasmique⁽⁴³⁹⁾. Bien que l'internalisation soit possible par d'autres signaux non-conventionnels elle requiert dans les deux cas la présence des vésicules de clathrine.

4.5.2.1 Protéines rétrovirales

Les virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et simien (VIS) possèdent également un motif à base de tyrosine dans la portion cytoplasmique de leurs glycoprotéines transmembranaires responsable de l'internalisation de la glycoprotéine virale présente à la surface de la cellule^(121, 222, 371, 380). La tyrosine fait partie d'une région composée de six acides aminés. Elle est invariante parmi les isolats de la clade B et très conservée chez les autres isolats⁽¹²¹⁾. De plus, plusieurs études ont clairement démontré que la sous-unité $\mu 2$ de l'adaptine AP-2 se lie avec la tyrosine présente dans le motif proximal au domaine transmembranaire de la protéine gp41 du VIH-1 et permet l'internalisation de la glycoprotéine présente à la surface de la cellule. Ces études ont été effectuées avec une protéine chimérique où seul le domaine cytoplasmique de la gp41 a été conservé⁽³⁰⁶⁾. D'autres études, cette fois-ci *in vivo*, ont permis de démontrer une interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe et l'adaptine AP-2 chez les cellules infectées⁽³¹⁾. Des études effectuées par ce même groupe ont également permis de démontrer, à l'aide de peptides synthétiques, que la sous-unité $\mu 2$ se lie avec la tyrosine présente en position 712 du domaine cytoplasmique de la gp41. De plus, il semble qu'une glycine adjacente à la tyrosine soit également impliquée,

conjointement avec la tyrosine, dans la liaison à la sous-unité $\mu 2$ de l'AP-2 et dans l'internalisation subséquente de la glycoprotéine virale présente à la surface de la cellule⁽³¹⁾. Il est à noter que ce sont également des études réalisées *in vitro* qui ont permis de démontrer que le motif tyrosine présent dans la glycoprotéine transmembranaire gp41, chez le VIS et le VIH-1, peut également se lier à la chaîne $\mu 1$ de l'adaptine AP-1 présente au niveau du TGN et des endosomes^(28,39).

Certaines études ont également permis de mettre en évidence la présence d'un autre signal d'internalisation dans la portion cytoplasmique des glycoprotéines virales. Dans le cas du VIS, si la tyrosine est mutée et que la portion cytoplasmique de la glycoprotéine transmembranaire n'est pas tronquée il est possible de constater que l'internalisation de l'enveloppe présente à la surface de la cellule est toujours possible. Ceci a permis d'identifier un second signal, di-leucine, dans la partie carboxy-terminale de la queue cytoplasmique de la glycoprotéine⁽³⁹⁾. La même observation a pu être faite dans le cas du VIH-1. En effet, un motif di-leucine présent dans la partie carboxy-terminale de la portion cytoplasmique de la gp41 peut également se lier à l'adaptine AP-1. Ce signal serait également responsable de la distribution adéquate de l'enveloppe dans certains compartiments intracellulaires. La liaison des motifs, respectivement à l'AP-1 et à l'AP-2, serait responsable de la quantité finale d'enveloppe présente à la surface des cellules infectées⁽⁴⁸²⁾.

Une autre protéine rétrovirale, qui a fait l'objet de plusieurs études au niveau des mécanismes d'internalisation, est la protéine Nef. Cette protéine est présente chez le VIS et le VIH-1 et elle permet l'internalisation de la protéine CD4 ainsi que des molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH I), présentes à la surface des cellules. Chez le VIH-1, il est bien connu que Nef co-localise avec l'adaptine AP-2 suite à l'interaction avec le motif di-leucine présent dans sa portion cytoplasmique^(83,159). Cependant, des études impliquant le système double-hybride ont permis de démontrer que le motif di-leucine présent dans la protéine Nef se lie de façon plus efficace avec les adaptines AP-1 et AP-3⁽⁸⁴⁾. Ce n'est que tout récemment que l'interaction entre la protéine Nef du VIH-1 et du VIS et l'adaptine AP-2 a été démontrée et reliée à l'internalisation de la protéine CD4 présente à la surface des cellules. Il semble que le motif di-

leucine présent dans la portion cytoplasmique de Nef serait capable d'interagir avec le complexe AP-2/Eps15 entraînant par la suite l'internalisation de CD4⁽¹⁹⁹⁾. En ce qui concerne l'internalisation du CMH I par la protéine Nef, il semble que, contrairement à l'internalisation de CD4, la présence d'une tyrosine dans la courte portion cytoplasmique du CMH I soit requise⁽²³¹⁾. Il semblerait que la présence de Nef entraîne la liaison du CMH I à la protéine PACS I, qui est impliquée dans le recyclage des protéines entre les endosomes et l'appareil de Golgi (455), ce qui a pour effet d'internaliser le CMH I et de promouvoir son trafic vers le Golgi⁽³³⁷⁾.

Les signaux d'internalisation à base de tyrosine ou de di-leucine présents chez un bon nombre de protéines, tant cellulaires que virales, peuvent aussi agir comme signaux de ciblage dans les cellules épithéliales polarisées. Cette fonction sera discutée à la prochaine section.

5. Polarisation

Les deux premières sections de cette revue ont permis de démontrer l'importance de la machinerie cellulaire dans le processus d'infection par les virus. Cette dernière est non seulement essentielle lors de la formation des particules virales mais elle favorise également la transmission du virus en ciblant de façon spécifique les glycoprotéines virales dans les cellules dites "polarisées". Cette section permettra de se familiariser avec les différents types de cellules polarisées et le ciblage des protéines virales dans ces cellules. Il sera donc également question de l'importance des cellules épithéliales polarisées au niveau du transport intracellulaire des protéines cellulaires et virales ainsi que de leur implication dans la transmission des virus.

5.1 Cellules polarisées

La polarisation est un état dans lequel se trouve une cellule et qui lui permet d'acquérir une structure ou des domaines spécifiques. Il existe plusieurs types de cellules qui peuvent être polarisées. La prochaine section traitera donc de ces différents types cellulaires et des caractéristiques associées à la

polarisation de ces derniers. L'emphase sera mise sur les cellules épithéliales qui représentent le modèle de cellules polarisées le plus étudié.

Le phénomène de polarisation est observé dès les premiers stades de développement embryonnaire. En effet, chez la drosophile, les axes postérieur-antérieur et dorsal-ventral sont formés durant l'oogenèse et selon la localisation asymétrique des ARNm. Il est à noter que la localisation des transcrits dépend de l'organisation polarisée du cytosquelette de l'oocyte. Au fur et à mesure que les protéines, les ARNm, le centrosome et les mitochondries se déplacent de l'axe antérieur vers l'axe postérieur, l'oocyte devient polarisé. Cette étape est facilitée par la présence de la kinase PAR-1 également impliquée dans la polarisation de *C. elegans*⁽¹⁸⁹⁾.

5.2 Types de cellules polarisées

Parmi les cellules polarisées plus primitives on retrouve les levures. En effet, la levure choisit l'axe de son bourgeonnement (axial ou bipolaire) et ce dernier correspond à une polarisation de la croissance cellulaire et à un partage d'organelles entre la cellule mère et le bourgeon. La polarisation est dans ce cas liée à une réorganisation du cytosquelette d'actine. Il est à noter que cette réorganisation implique la présence d'une petite protéine G de la famille des Rho: la GTPase Cdc42⁽⁶⁰⁾.

Chez les mammifères, les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes sont également des cellules polarisées. Ces cellules peuvent passer d'une structure sans forme précise à un état de cellules polarisées et ce suite à une stimulation cellulaire par des cytokines. Par exemple, la polarisation des neutrophiles est décrite comme un changement morphologique associé avec la chemotaxie de ces derniers et la polymérisation de l'actine, et ces deux étapes sont stimulées par la présence de plusieurs cytokines (TNF, GM-CSF et G-CSF), activées par les MAP kinases⁽²²¹⁾. Chez les macrophages, il semble que ce soit l'activation du proto-oncogène BCL6 qui favoriserait la polarisation. En effet, l'inactivation de ce dernier entraîne la sur-expression de la GTPase RhoA qui fait partie de la famille des Rho. Cette sur-expression diminue l'expression du facteur

CSF1, responsable de l'organisation de l'actine et de la polarisation du macrophage⁽³³⁸⁾. Dans le cas des lymphocytes, il semble que la présence de la protéine Notch et de l'interféron soit essentielle à leur différenciation et à leur polarisation⁽⁴⁵¹⁾. De plus, il semble que la protéine ZAP-70 contrôle l'orientation des microtubules chez les lymphocytes qui se dirigent vers la cellule présentatrice de l'antigène (CPA). Cette polarisation permet la mise en place d'une synapse immunitaire fonctionnelle qui se caractérise par la relocalisation du lymphocyte et le ciblage des protéines vers la CPA. La protéine Cdc42, en présence de la protéine CD28, serait également responsable de l'organisation de l'actine durant ce processus⁽³⁷³⁾.

Parmi les cellules polarisées, il ne faut pas oublier les neurones qui sont sans contredit les cellules les plus polarisées de l'organisme. Chaque neurone est composé d'un corps cellulaire avec des prolongements cytoplasmiques appelés neurites. Les neurites sont soit l'axone ou les dendrites. Les neurones sont bipolaires lorsque l'axone, dont les terminaisons libèrent les neurotransmetteurs, et les dendrites, qui permettent de détecter les neurotransmetteurs libérés par ses voisins, sont situés à des côtés opposés du corps cellulaire du neurone. Le cytosquelette du neurone est formé des trois composantes suivantes : les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Ce sont les microtubules qui permettent de définir la polarisation du neurone.

En résumé, les microtubules sont formés par l'assemblage de polymères de tubuline α et de tubuline β . Il est à noter que les deux extrémités des microtubules s'assemblent à des vitesses différentes. Ce phénomène nécessite la présence de GTP et permet de définir une polarité aux microtubules, avec une extrémité se polymérisant plus rapidement (+) et une extrémité se polymérisant plus lentement (-)⁽¹⁶⁶⁾. En ce qui concerne les axones, la polarité des microtubules est uniforme et toutes les extrémités sont positives, et ce contrairement à ce qui est observé pour les dendrites. De plus, il faut souligner qu'il existe des protéines qui sont nécessaires à l'assemblage et à la stabilisation des microtubules, c'est le cas de la protéine MAP-2 et de la protéine tau. De plus, des études récentes montrent que la glycogène synthase kinase-3, une kinase déjà impliquée dans la

migration des astrocytes et la protéine CRMP-2, responsable de la polymérisation des microtubules interviennent dans l'établissement et le maintien de la polarité neuronale^(123, 487).

Il existe donc plusieurs types de cellules dites "polarisées". Le type cellulaire qui est de loin le plus étudié fera l'objet des prochaines sections, il s'agit des cellules épithéliales des organes tels que les reins, le foie, les intestins, les poumons et le vagin. Il devient donc pertinent de traiter de la structure, des domaines et de certains modèles de cellules épithéliales polarisées utilisés en laboratoire.

5.3 Cellules épithéliales polarisées

5.3.1 Structure

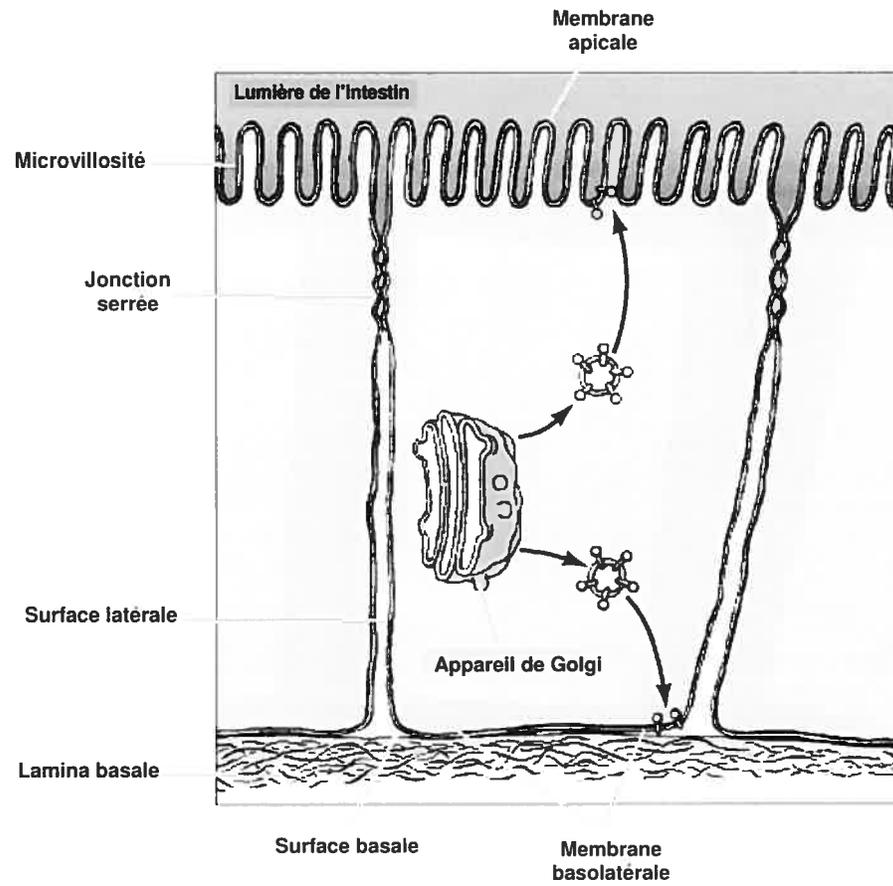
Afin de passer à l'état de cellule polarisée, les cellules épithéliales doivent présenter certaines caractéristiques (Figure 14). En effet, une cellule épithéliale seule, sans interaction avec une autre cellule ou sans contact avec un support est considérée comme non-polarisée. Ce contact est nécessaire afin de permettre la distribution polarisée des protéines ou des marqueurs associés aux domaines membranaires apical et basolatéral. Il est à noter que le domaine apical se définit comme étant le domaine qui fait face à la lumière d'un organe alors que le domaine basolatéral fait, quant à lui, face à la circulation sanguine. Le contact entre les cellules épithéliales est favorisé par la présence de la protéine E-cadhérine, qui est un membre de la superfamille des cadhérines dépendantes de la présence du calcium, alors que le contact entre la cellule épithéliale et le support se fait grâce au récepteur de la superfamille des intégrines. C'est l'interaction spécifique entre ces récepteurs et leurs ligands extracellulaires qui permet de définir les points de contact présents sur la membrane plasmique⁽⁴⁸⁵⁾.

Il est bien connu que chez les cellules épithéliales polarisées, le cytosquelette d'actine s'associe à la fois avec les récepteurs des cadhérines et

Figure 14

Page 89

Représentation schématique d'un modèle classique de cellule épithéliale provenant de l'intestin et de ses différentes composantes. L'image a été tirée de Cooper, G.M. 2000. *The Cell : A molecular approach*. Second edition, Sinauer Associates, Inc. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>).



des intégrines. Cette association permet d'abord de solidifier les contacts cellule-cellule et cellule-support puis de recruter et de lier des protéines qui seront nécessaires à la formation des différents domaines membranaires. Cette association entraîne également la formation de structures physiques qui empêchent le mélange entre les protéines apicales et basolatérales nouvellement synthétisées. Parmi ces structures, il existe ce que l'on appelle une unité de ciblage spécifique. En effet, afin de maintenir la polarisation des cellules il doit y avoir formation rapide d'un réseau de vésicules de transport, qui transporte les protéines aux régions où il y a contact entre les cellules et également à celles où il n'y a pas de contact entre les cellules, c'est ce réseau de vésicules de transport qui représente l'unité de ciblage. Ceci implique que la reconnaissance, l'ancrage et la fusion des vésicules aux bons domaines membranaires doit se faire de façon spécifique afin d'éviter un mauvais ciblage des protéines. Des études ont donc suggéré que chaque domaine possède son unité de ciblage qui lui est spécifique⁽⁴⁸⁵⁾. Cette notion sera discutée plus en détails à la section 5.3.2.

Le contact entre la cellule et le support se fait grâce à la lamina basale. Cette dernière est une matrice qui soutient la couche de cellules épithéliales et qui supporte le tissu en ancrant les cellules à une base solide. La lamina basale est composée de laminine, de collagène IV et de protéoglycans. La lamina basale n'est pas une constituante cellulaire mais elle contribue grandement au maintien de la structure cellulaire⁽⁴⁰⁴⁾.

La jonction serrée (zonula occludens) est également une structure importante des cellules épithéliales polarisées. Elle se situe plus au niveau du domaine apical que du domaine basal et elle agit comme une barrière perméable et sélective dans l'espace paracellulaire⁽¹⁰⁸⁾. Elle empêche la diffusion latérale entre les cellules, ce qui prévient le mixage entre les lipides et les protéines spécifiques à chaque domaine⁽⁴⁴³⁾. La microscopie électronique a permis de montrer la jonction serrée comme un réseau continu de brins parallèles interconnectés, qui délimite le sommet de la membrane latérale des cellules adjacentes⁽⁷³⁾. Jusqu'à maintenant, les protéines intégrales occludine et claudine sont les seules protéines de la jonction serrée à avoir été identifiées sans équivoque⁽¹⁵⁴⁾. Cependant il a été démontré que plusieurs protéines dont

certaines kinases (tyrosine kinases, protéine kinase C), des protéines G hétérotrimériques et la phospholipase C sont impliquées dans la régulation de la jonction serrée et qu'elles ont toutes une cible commune, l'actine. Il a été proposé que ces dernières pourraient agir au niveau de la perméabilité de la jonction serrée⁽²⁵⁸⁾.

Tel que mentionné précédemment, l'asymétrie ou la polarisation conduit à la formation des domaines apical et basolatéral et ce suite à l'adhésion entre les cellules. Le domaine apical est libre de tout contact alors que la formation du domaine basolatéral nécessite un contact. Il existe peu d'informations sur la formation du domaine apical. Il a été proposé que la formation de ce dernier résulterait de l'exocytose d'un compartiment luminal intracellulaire déjà formé suite à la ré-organisation du cytosquelette. La ré-organisation de l'actine mène à l'assemblage d'une structure unique, présente au domaine apical, nommée microvillosité. À titre d'exemple, les cellules épithéliales intestinales qui possèdent cette structure absorbent les nutriments présents et les redistribuent dans l'organisme par la circulation sanguine⁽⁴⁸⁵⁾.

Suite à l'adhésion, les microtubules sont également ré-organisés dans le cytoplasme des domaines apical et basolatéral. Cette ré-organisation coïncide avec la localisation aux différents domaines de certains compartiments dont l'appareil de Golgi et les endosomes apicaux au domaine apical et les endosomes basolatéraux au domaine basolatéral⁽⁴⁸⁵⁾.

5.3.2 Domaines membranaires des cellules épithéliales polarisées

Afin de maintenir les cellules dans un état polarisé, les protéines nouvellement synthétisées sont ciblées à l'appareil de Golgi et aux endosomes, ce qui leur permettra d'être acheminées aux différents domaines. Le ciblage des protéines aux différents domaines membranaires implique trois étapes bien distinctes. Les protéines doivent tout d'abord être ciblées dans les vésicules de transport présentes dans les différents compartiments, puis les vésicules doivent par la suite être ciblées aux domaines membranaires spécifiques et finalement elles doivent s'ancrer et se fusionner avec le domaine membranaire. Ces étapes

sont facilitées par l'organisation de l'appareil sécrétoire et des microtubules. L'ancrage et la fusion des vésicules au domaine membranaire approprié est également assuré par des unités de ciblage qui sont créées suite à l'adhésion des cellules⁽⁴⁸⁵⁾.

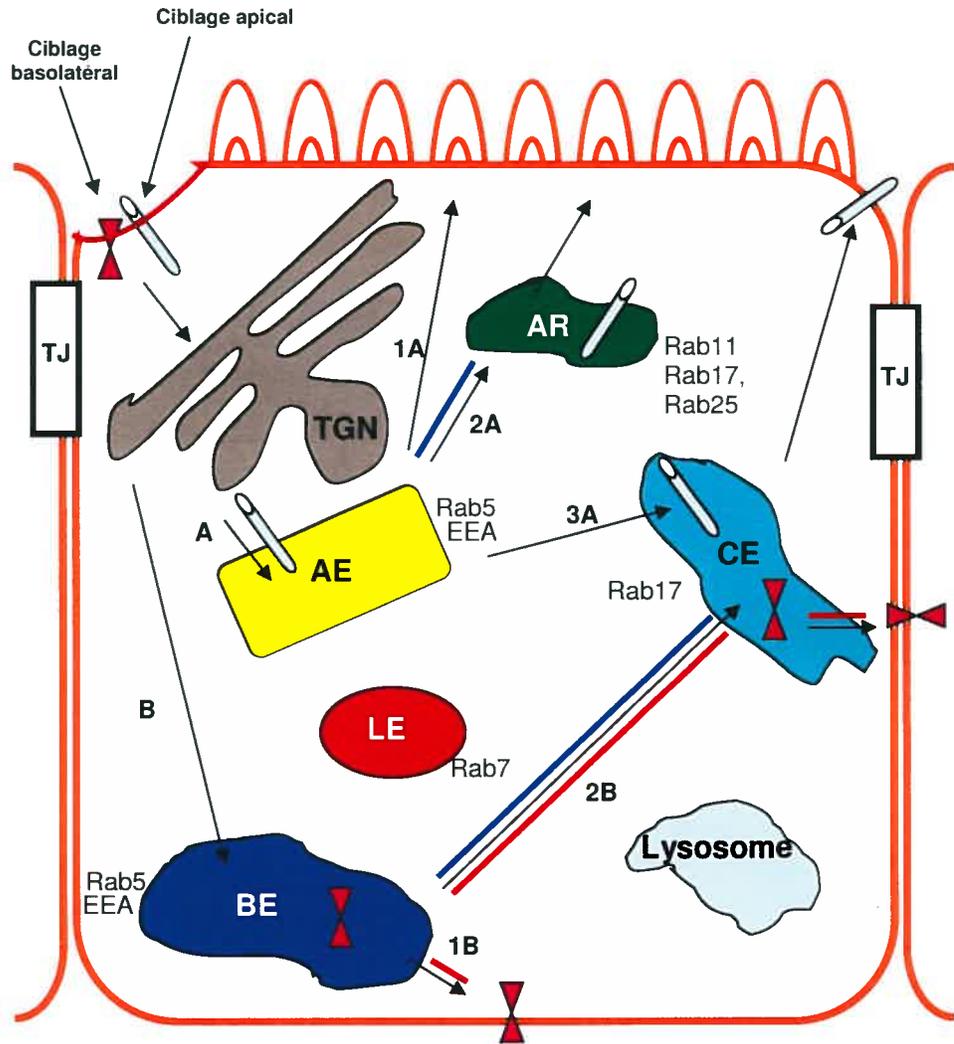
Suite à la sortie des protéines des endosomes et de l'appareil de Golgi, celles qui sont destinées au domaine apical sont ciblées grâce à la présence de structures ou d'un contexte particulier associés à l'ectodomaine ou au domaine transmembranaire des protéines. En ce qui concerne les protéines ciblées au domaine basolatéral, la présence de motifs dans la partie cytoplasmique de ces protéines est essentielle au bon ciblage. Ces différents motifs feront l'objet de la section 5.4.

Pour l'instant, il ne sera fait mention que des différentes vésicules associées à chaque domaine. Il sera tout d'abord question des vésicules impliquées dans le ciblage au domaine apical. Les protéines destinées au domaine apical passent par le Golgi et ensuite elles peuvent se rendre directement au domaine ou alors passer par une voie indirecte qui implique les endosomes (Figure 15). Les protéines qui utilisent la voie indirecte peuvent soit être recyclées ou elles peuvent être transportées au domaine opposé par transcytose ou bien elles peuvent être dirigées vers l'endosome tardif, d'où elles seront relocalisées aux lysosomes pour y être dégradées⁽²⁹³⁾. Dans le cas des protéines qui sont recyclées, elles sont d'abord ciblées aux endosomes précoces apicaux et par la suite elles sont re-localisées soit aux endosomes apicaux de recyclage ou à un endosome commun et ce avant de se diriger au domaine apical de la membrane. Cette étape de transport entre les endosomes précoces apicaux et les endosomes de recyclage requiert la présence des microtubules. Il est à noter également, que chaque compartiment possède des protéines GTPase spécifiques nommées protéines Rab. En ce qui concerne les endosomes précoces apicaux on note la présence de la protéine Rab5, alors que pour les endosomes de recyclage ce sont les protéines Rab 11, 17 et 25 qui sont présentes⁽¹⁴⁾. Il n'existe rien de très clair dans la littérature en ce qui concerne l'endosome commun mais il semblerait que la protéine Rab17 pourrait être associée à ce compartiment.

Figure 15

Page 94

Représentation schématique de la voie directe et de la voie indirecte qu'empruntent les protéines pour se rendre soit au domaine apical ou au domaine basolatéral des cellules épithéliales polarisées. Les voies directes pour les protéines qui sont ciblées aux domaines apical (A) et basolatéral (B) sont représentées par les voies 1A et 1B alors que les voies indirectes sont représentées par les voies 2A, 3A, 2B et 3B. Le schéma a été tiré et adapté de Apocada, G. 2001. Endocytic traffic in polarized epithelial cells : Role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2: 149-159.



Légende:

 Microtubules	Endosome de recyclage apical (AR)
 Actine	Endosome tardif (LE)
Jonctions serrées (TJ)	Endosome commun (CE)
Endosome basolatéral (BE)	Appareil de Golgi (TGN)
Endosome apical (AE)	Endosome précoce apical (EEA)

Certaines protéines destinées au domaine apical transitent par des endosomes précoces basolatéraux avant d'être relocalisées au domaine apical, ce phénomène se nomme transcytose. Ces protéines quittent les endosomes précoces basolatéraux pour se rendre à l'endosome commun et cette étape est facilitée par l'actine et les microtubules. Les protéines sont par la suite ciblées aux endosomes apicaux de recyclage et elles sont transportées au domaine apical⁽¹⁴⁾.

Le ciblage des protéines au domaine basolatéral peut se faire par voie directe ou par voie indirecte (Figure 15). En ce qui concerne les protéines qui empruntent la voie indirecte, il est à noter que ces dernières sont ciblées aux endosomes précoces basolatéraux avant de se rendre au domaine basolatéral. Quant aux protéines destinées au domaine apical et qui sont transportées par transcytose elles sont également ciblées aux endosomes précoces basolatéraux avant de se rendre au domaine apical. Les endosomes précoces basolatéraux sont associés à la protéine Rab5⁽¹⁴⁾. Il semble également que la GTPase Cdc42 soit associée au ciblage des protéines au domaine basolatéral⁽²¹⁸⁾.

Lorsque les protéines quittent le Golgi ou leurs endosomes respectifs, elles doivent se déplacer à travers le cytoplasme qui a une consistance visqueuse qui ne facilite pas leur transport. Ce sont les microtubules aidés par la présence de l'actine qui facilitent le transport jusqu'aux domaines membranaires. Par la suite, l'interaction entre la protéine et le domaine serait facilitée par la présence du complexe SNARE. La vésicule SNARE reconnaît et se lie à son récepteur, qui est présent à la membrane plasmique. Cette liaison est très spécifique et elle facilite l'interaction entre la protéine, associée à la vésicule SNARE, et le récepteur présent au domaine membranaire^(252, 293).

Lors du transport des protéines à l'un ou l'autre des domaines, il arrive que ces dernières soient ciblées aux endosomes tardifs pour être ensuite dirigées vers les lysosomes où elles seront dégradées⁽²⁹³⁾.

5.3.3 Modèle de cellules polarisées utilisées

Afin de mieux comprendre la polarisation des cellules épithéliales, plusieurs études *in vitro* avec différents types cellulaires ont été effectuées. Il a donc été observé que lorsque ces cellules sont mises en culture elles prolifèrent jusqu'à la formation d'une monocouche étanche. Cette monocouche est formée de jonctions serrées qui permettent la distribution spécifique des protéines et des lipides aux différents domaines et elle devient par le fait même une couche de cellules polarisées. La culture sur support solide ne permet pas l'échange des éléments nutritifs entre le domaine basolatéral et le domaine apical. L'utilisation de membranes semi-perméables corrige cette situation puisque ces dernières permettent l'échange entre le domaine basolatéral et le domaine apical tout en maintenant la différenciation complète des domaines. Ces membranes permettent de recréer *in vitro* l'épithélium natif⁽⁵⁵⁾.

Parmi les cellules épithéliales les plus utilisées, *in vitro*, il y a les cellules MDCK, les cellules VeroC1008, les cellules Caco-2, les cellules HT-29, les cellules LLC-PK1 et les cellules ME-180. Les cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney) ont été très bien caractérisées du point de vue de leur morphologie, de leur résistance électrique et de la composition respective de leurs domaines membranaires apical et basolatéral. Cette lignée de cellules provient d'une tumeur du tubule distal rénal prélevée chez une chienne épagneule. Dans la littérature, il est mentionné que ces cellules doivent passer par quatre stades de développement durant la polarisation. Au premier stade, les cellules ne sont pas confluentes et les jonctions serrées s'établissent au fur et à mesure que les cellules interagissent entre elles. Le second stade est, quant à lui, représenté par une monocouche confluyente avec un réseau de jonctions serrées complet qui le demeurera tout au long des autres stades. Ce stade est suivi du stade III où il y a un réarrangement complet du cytosquelette et où on peut dénombrer un nombre constant de cellules. Au dernier stade, la monocouche s'amincit et commence à se détacher de la membrane semi-perméable. Tout au long de son développement la monocouche de cellules MDCK maintient une résistance transépithéliale entre 200 et 350 $\Omega \text{ cm}^2$ ⁽³⁶⁹⁾. Il existe deux clones de cellules MDCK, il s'agit du clone I et du clone II. Ces

derniers se distinguent par leur morphologie, la distribution de leurs sphingolipides et par leur résistance transépithéliale qui semble plus élevée pour le clone I. C'est ce qui pourrait expliquer que le clone I soit le clone le plus utilisé lors des études portant sur la polarisation des cellules MDCK^(21, 437).

Il existe une autre lignée de cellules épithéliales polarisées de rein mais cette dernière provient du singe vert d'Afrique, il s'agit des cellules VeroC1008. Cette dernière est également très utilisée lors des études sur la polarisation. Les cellules VeroC1008, tout comme les cellules MDCK, forment une monocouche étanche sur une membrane semi-perméable ce qui leur permet de bien polariser. Il est à noter que la polarisation se mesure également en comparant la résistance électrique obtenue entre les deux chambres représentant les domaines apical et basolatéral^(259, 483).

Les cellules Caco-2 sont également des cellules épithéliales polarisées mais elles proviennent, cette fois-ci non pas des reins, mais d'une tumeur du côlon⁽¹²⁹⁾. Cette lignée est hétérogène et elle représente le modèle, *in vitro*, qui se rapproche le plus de l'épithélium de l'intestin. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'elle est utilisée surtout lors d'études qui doivent mettre en relief le pouvoir d'absorption de l'intestin⁽¹⁷⁶⁾. Ces dernières sont des cellules qui peuvent se différencier très rapidement en entérocytes polarisés avec des hydrolases qui ont une bordure en brosse et qui possèdent un complexe de jonctions serrées bien développé. Les cellules HT-29 sont également des cellules épithéliales polarisées qui proviennent d'une tumeur du côlon⁽²⁸⁶⁾.

Il existe d'autres lignées de cellules épithéliales qui sont polarisées et qui sont également utilisées lors d'études *in vitro*. Parmi celles-ci il y a les cellules de reins de porc, qui sont les cellules LLC-PK1⁽³⁴⁸⁾ ainsi que les cellules ME-180 qui sont des cellules épithéliales provenant du col de l'utérus chez l'humain⁽²⁰⁴⁾. Cependant, puisque la majorité des travaux effectués au cours de mon projet ont été réalisés avec les cellules MDCK et VeroC1008, seuls les mécanismes de ciblage des protéines membranaires associés à ces deux types cellulaires seront traités à la section suivante. En raison du grand nombre d'études portant sur les cellules MDCK, l'emphase sera mise principalement sur ces dernières.

5.4 Ciblage des protéines membranaires dans les cellules épithéliales polarisées

Tel que mentionné précédemment, les protéines membranaires présentes à la surface cellulaire possèdent des motifs qui leur permettent d'être internalisées dans la cellule. Dans la plupart des cas, ces motifs sont également responsables du ciblage des protéines membranaires aux différents domaines présents dans la cellule épithéliale polarisée. Il faut également noter que selon le domaine de la protéine sur lequel le motif est présent, cette dernière sera ciblée vers l'un ou l'autre des domaines membranaires. La prochaine section permettra de décrire plus en détails les motifs qui sont associés au domaine apical et ceux qui sont associés au domaine basolatéral. Il sera également question d'un autre modèle de ciblage à travers la cellule, la transcytose, qui permet aux macromolécules de passer du domaine apical au domaine basolatéral, et vice-versa, et qui ne requiert apparemment aucun motif spécifique^(34, 404).

5.4.1 Motifs associés au domaine apical

Tel que décrit à la section 5.3.2, le ciblage des protéines membranaires aux domaines apical ou basolatéral se fait par voie directe, suite à la sortie des protéines du Golgi, ou par voie indirecte suite à leur sortie cette fois-ci des endosomes. La distribution des protéines à l'un ou l'autre des domaines ne se fait pas de façon aléatoire et elle implique la présence de motifs spécifiques chez les protéines.

Le ciblage des protéines vers le domaine apical dépend des motifs qui peuvent être présents soit dans l'ectodomaine ou le domaine transmembranaire de la protéine. Certaines protéines membranaires sont ancrées à la couche bilipidique de la membrane par un groupement glycosylphosphoinositol (GPI). Chez les cellules MDCK, il semble que le groupement GPI soit impliqué dans le ciblage apical^(45, 244). Cependant, il est à noter que cette structure n'agit pas comme motif de ciblage au domaine apical chez toutes les cellules épithéliales. En effet, chez les cellules épithéliales de la thyroïde le groupement serait responsable du ciblage des protéines au domaine basolatéral⁽⁴⁹⁵⁾. En général, il

est compliqué de désigner un motif précis comme étant responsable du ciblage des protéines membranaires au domaine apical. Il semble en fait que le signal qui cible les protéines au domaine apical serait distribué à travers l'ectodomaine des protéines. Ceci a été démontré grâce aux études réalisées avec des protéines chimériques chez qui on a enlevé le domaine cytoplasmique et chez qui le ciblage se fait exclusivement au domaine apical^(281, 366). Il a été également démontré, chez les cellules MDCK, que la présence unique de l'ectodomaine soluble des protéines entraîne le ciblage de ces dernières au domaine apical et ce même dans le cas des protéines qui sont généralement ciblées au domaine basolatéral^(448, 486). Cependant, aucun motif avec une séquence en acides aminés précise n'a pu être identifié chez ces protéines.

Le ciblage des protéines au domaine apical impliquerait également la formation des radeaux lipidiques au Golgi⁽⁴⁰⁵⁾. En effet, certaines protéines destinées au domaine apical se rassemblent aux radeaux lipidiques durant leur transport à travers le Golgi. Cette concentration des protéines aux radeaux lipidiques peut se faire par l'entremise des domaines transmembranaires des protéines qui sont ciblées au domaine apical^(220, 381). Cependant, tel qu'énoncé précédemment, le ciblage des protéines au domaine apical peut également se faire indépendamment de la présence des radeaux lipidiques. Ceci implique qu'il existerait chez les cellules MDCK plus d'une façon de cibler les protéines au domaine apical⁽¹⁶⁾.

5.4.2 Motifs associés au domaine basolatéral

Le scénario, en ce qui concerne les protéines ciblées au domaine basolatéral, est bien différent. En effet, il existe plusieurs motifs présents dans le domaine cytoplasmique des protéines qui sont essentiels au ciblage du côté basolatéral de la membrane. Parmi ces motifs il faut souligner les motifs à base de tyrosine, NPXY et YXXØ où X peut être représenté par n'importe quel acide aminé alors que Ø implique la présence d'un acide aminé avec une chaîne latérale hydrophobe. Il est à noter que ces motifs sont également impliqués dans l'internalisation des protéines présentes à la surface de la cellule. Chez les cellules MDCK les motifs à base de tyrosine sont responsables du ciblage au

domaine basolatéral de plusieurs protéines. Parmi celles-ci il y a le récepteur des LDL^(187, 273), la phosphatase acide lysosomale⁽³⁴⁶⁾, la protéine LAMP-1⁽¹⁸¹⁾, les glycoprotéines virales des virus VSV et VIH-1^(249, 428) ainsi que la glycoprotéine du virus influenza ayant subi un changement d'acide aminé dans sa partie cytoplasmique⁽⁴⁰⁾. Les motifs à base de tyrosine YXXØ peuvent cibler un bon nombre de protéines au domaine basolatéral, cependant la spécificité du ciblage peut être affectée par différents facteurs. Parmi ces facteurs notons la séquence en acides aminés qui entoure le motif et qui peut être responsable d'autres fonctions de signalisation dans la cellule⁽²⁷⁴⁾. Il y a également la proximité du motif avec le domaine transmembranaire de la protéine, puisque certaines protéines ont un motif qui doit respecter une certaine distance avec le domaine transmembranaire afin d'assurer le ciblage de ces dernières au domaine basolatéral⁽³⁶⁴⁾. Finalement, il semble que la phosphorylation de certains acides aminés présents dans le motif soit également un facteur susceptible d'influencer le ciblage⁽²³⁰⁾.

Le motif di-leucine (L-L) est également un motif associé au ciblage des protéines au domaine basolatéral. Tout comme dans le cas du motif à base de tyrosine, la spécificité du ciblage peut être influencée par certains facteurs qui sont reliés dans ce cas-ci à la capacité d'oligomérisation de la protéine⁽¹⁵⁾.

Les motifs de ciblage YXXØ et di-leucine se lient aux adaptines AP-1 et AP-2^(32, 362). Il a été clairement démontré que les motifs à base de tyrosine se lient à la chaîne μ des complexes AP-1 et AP-2⁽³⁰⁸⁾. Bien que les deux types de motifs puissent lier les adaptines AP-1 et AP-2, *in vitro*, il semble que les protéines qui possèdent un motif à base de tyrosine n'entraient pas en compétition avec d'autres protéines qui elles présenteraient le motif di-leucine. Des études ont en effet suggéré que des mécanismes distincts seraient responsables du ciblage engendré par la présence de l'un ou l'autre de ces motifs⁽²⁶⁸⁾. De plus, il semblerait que le motif di-leucine s'associe préférentiellement avec la chaîne β du complexe des adaptines⁽³⁵²⁾. Cependant, bien que les motifs à base de tyrosine et les motifs di-leucine interagissent avec les adaptines AP-1 et AP-2 et que ces dernières soient impliquées dans l'internalisation des protéines présentes à la surface, et ce par l'entremise des vésicules de clathrine, il n'y a à

ce jour aucun mécanisme connu pouvant expliquer l'implication des adaptines AP-1 et AP-2 au niveau du ciblage des protéines au domaine basolatéral. Tel qu'énoncé précédemment, certaines protéines destinées au domaine basolatéral quittent le TGN pour se rendre aux endosomes précoces avant d'être ciblées au domaine membranaire. La présence de l'adaptine AP-1 au TGN pourrait constituer une preuve indirecte de son implication dans le ciblage basolatéral. Il est à noter que cette affirmation ne s'applique pas dans le cas de toutes les protéines. En effet, le récepteur de la transferrine, qui est ciblé au domaine basolatéral, ne lie pas la chaîne $\mu 1$ de l'AP-1 présente au TGN⁽³⁰⁸⁾. Cependant, il a été possible de répertorier deux catégories d'adaptine AP-1 : l'AP-1A et l'AP-1B. En ce qui concerne l'AP-1B il a été démontré que la chaîne $\mu 1B$ est présente chez les cellules épithéliales polarisées⁽³¹⁰⁾. De plus, la chaîne $\mu 1B$ est située à proximité des vésicules de clathrine présentes au TGN⁽¹³⁰⁾ et elle serait impliquée dans le ciblage au domaine basolatéral des récepteurs des LDL et de la transferrine, suite à leur sortie des endosomes précoces⁽¹⁴⁹⁾.

Tout comme l'AP-1, l'adaptine AP-3 existe sous deux types; l'AP-3A et l'AP-3B. L'AP-3 interagit également avec les motifs à base de tyrosine et de dileucine et des études récentes ont démontré que la chaîne $\beta 3A$ de l'AP-3A s'associe avec les vésicules de clathrine présentes au TGN et aux endosomes^(101, 417). La chaîne $\mu 3A$ de l'AP-3 est, quant à elle, impliquée dans le ciblage des protéines aux lysosomes⁽²²⁹⁾. La chaîne $\mu 3B$ de l'AP-3B peut se lier à plusieurs motifs à base de tyrosine cependant il n'existe à ce jour aucune évidence démontrant que cette chaîne puisse être impliquée dans le ciblage des protéines au domaine basolatéral (Tableau III)⁽³⁰⁷⁾.

L'AP-4 est la dernière des adaptines à avoir été identifiée. Cette adaptine est exprimée de façon ubiquitaire⁽¹⁰²⁾. Il a été démontré que la sous-unité $\mu 4$ reconnaît les motifs à base de tyrosine présents dans la protéine LAMP-2⁽⁴⁾. D'autres études ont démontré que, chez les cellules MDCK, l'AP-4 se lie aux motifs responsables du ciblage au domaine basolatéral de la furine, du récepteur des LDL, du récepteur de la transferrine et de la protéine MPR46 (Tableau III)⁽⁴⁰³⁾.

Tableau III

Page 103

Résumé illustrant les différentes fonctions des adaptines AP-1, AP-3 et AP-4 et de leurs sous-unités lors de l'internalisation des protéines cellulaires ou virales. Hirst, J., et al. 1999. Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell*, **10**(8): 2787-2802; Simmen, T., Honing, S., Icking, A, Tikkanen, R. et Hunziker, W. 2002. AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* **4**:154-9.

Adaptines et sous-unités	Motifs reconnus	Fonctions
AP-1B		Ciblage des protéines chez les cellules épithéliales polarisées
Mu 1B (μ 1B)	YxxØ présent chez la protéine cargo	Se lie aux protéines cargos qui sont à proximité du Golgi Impliquée dans le ciblage des protéines au domaine basolatéral chez les cellules épithéliales polarisées
AP-3A		Ciblage intracellulaire des protéines ou des récepteurs
Beta 3A (β 3A)	YxxØ et di-leucine (L-L) présents chez la protéine cargo	S'associe avec les vésicules de clathrine présentes au TGN et aux endosomes
Mu 3A (μ 3A)	YxxØ présent chez la protéine cargo	Cible les protéines aux lysosomes
AP-3B		Inconnue
Mu 3B (μ 3B)	YxxØ présent chez la protéine cargo	Inconnue
AP-4		Ciblage des protéines au domaine basolatéral Ciblage aux endosomes à partir du Golgi
Mu 4 (μ 4)	YxxØ présent chez la protéine cargo	Reconnaît la protéine cargo

Le ciblage aux domaines apical et basolatéral se fait grâce à la présence de motifs ou d'un contexte spécifique dans les différents domaines des protéines. Il existe un autre mécanisme qui permet de cibler une protéine ou un virus directement du domaine apical au domaine basolatéral et vice-versa. Ce mécanisme de ciblage se nomme transcytose et sera l'objet de la prochaine section.

5.4.3 Transcytose

La transcytose est un mode de transport vectoriel intracellulaire présent chez différents types cellulaires (Figure 16). Elle est impliquée dans le transport des protéines présentes dans l'endothélium des poumons et du cœur. Elle est également impliquée dans le transport d'hormones et de vitamines présentes dans l'endothélium du cerveau, du foie, de la thyroïde et des reins^(99, 182, 265, 266). La transcytose est également responsable du transport des protéines et des virus chez les cellules épithéliales polarisées. Pour les besoins de cette revue de littérature le mécanisme de la transcytose sera décrit uniquement chez les cellules épithéliales polarisées.

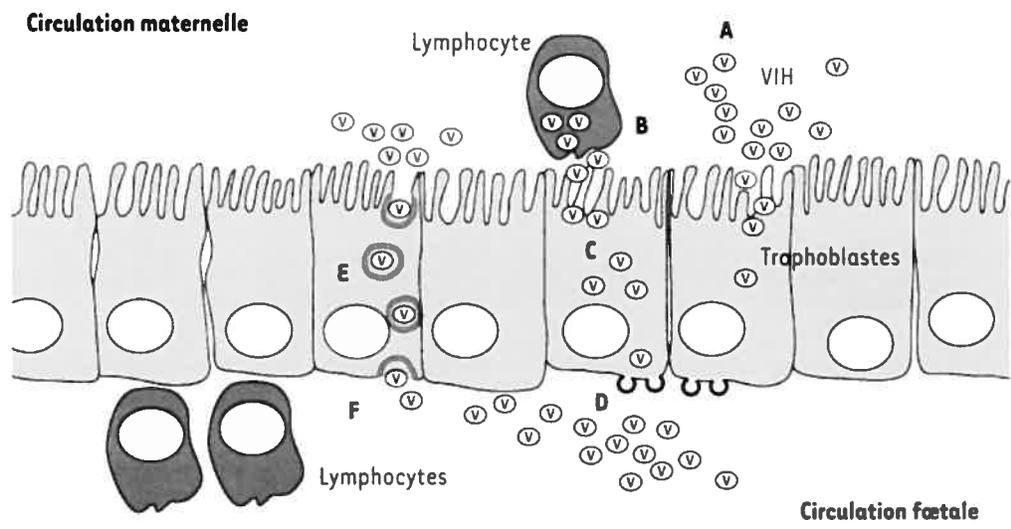
Chez ces dernières la transcytose peut être décrite comme un mouvement de protéines qui se fait d'un domaine à l'autre de la cellule polarisée. Les protéines sont en quelque sorte un cargo qu'il est possible de transporter d'un endroit à l'autre dans la cellule polarisée. Ce cargo est encapsulé dans des vésicules transcytotiques qui empêchent tout contact avec le contenu cytoplasmique de la cellule épithéliale⁽³³⁾. Dans certains cas, la transcytose est associée à l'endocytose des protéines présentes à la surface de la cellule, via les vésicules de clathrine. Elle permet aux protéines internalisées d'être ciblées progressivement loin de la voie d'internalisation vers d'autres destinations cellulaires plus appropriées à leur bon fonctionnement⁽⁴⁴⁰⁾.

Tout d'abord, il faut souligner qu'afin de pouvoir étudier la transcytose, certaines conditions doivent être respectées. En effet, le modèle idéal pour l'étude de la transcytose est le même que celui décrit pour l'étude du transport des protéines d'un domaine à l'autre dans les cellules épithéliales polarisées, et

Figure 16

Page 106

Représentation des mécanismes de transmission *in utero* du VIH. Des virions libres (A) ou des cellules lymphocytaires infectées (ou des macrophages) (B) présents dans la circulation maternelle viennent en contact avec des cellules trophoblastiques. Puis le VIH pénètre dans les cellules trophoblastiques (C), par le biais de mécanismes encore hypothétiques : fusion des virions avec la membrane ou internalisation par endocytose. Le VIH se réplique à l'intérieur des cellules trophoblastiques et le bourgeonnement de nouveaux virions se produit au pôle basolatéral (circulation foetale) (D). Le VIH pourrait également pénétrer dans les trophoblastes par endocytose (E) puis être transporté du pôle apical vers le pôle basolatéral sans qu'il y ait infection des cellules trophoblastiques : c'est le processus de transcytose. Dans les deux cas (infection des cellules trophoblastiques ou transcytose), le VIH atteint les cellules sous-jacentes, notamment les lymphocytes et les macrophages foetaux, pour les infecter (F). Schéma tiré de Vidricaire, G. et Tremblay, M.J. 2004. Vers une compréhension du mécanisme de transmission du VIH *in utero*. Médecine Sciences Vol 20 (8-9).



ce puisque la transcytose se fait également dans des cellules polarisées. La présence d'une monocouche de cellules épithéliales polarisées sur un support qui possède une membrane semi-perméable est requise. Cette dernière peut être recouverte de substances, par exemple le collagène, afin de favoriser l'adhésion des cellules. Ce support est composé de deux chambres individuelles qui baignent dans un milieu de culture propre à chaque type cellulaire utilisé. Il est à noter qu'il est important d'utiliser une membrane semi-perméable de porosité adéquate. L'utilisation de membranes de porosité inférieure à un micron représente généralement un choix idéal, puisque ces dernières préviennent le passage des cellules à travers le filtre, les empêchant ainsi de se fixer à l'envers du filtre et de fausser les résultats⁽⁴³⁸⁾. La concentration des cellules à ensemercer sur la membrane se révèle également un facteur important. En effet, lors de la croissance de la monocouche des cellules épithéliales polarisées il est impératif d'obtenir une monocouche non seulement homogène mais il faut également que la confluence se produise de façon synchronisée. Finalement, comme pour la polarisation, l'intégrité de la monocouche est essentielle pour l'étude de la transcytose. Cette intégrité peut être vérifiée en mesurant la résistance transépithéliale de la monocouche⁽⁴⁴⁰⁾.

Les cellules épithéliales polarisées MDCK sont celles qui ont été utilisées le plus fréquemment dans la majorité des études qui ont permis de mieux comprendre la voie de transport qu'est la transcytose du domaine basolatéral au domaine apical. L'étude portant sur le transport du récepteur pIgR lié à l'IgA du domaine basolatéral au domaine apical en est un bon exemple. Le récepteur pIgR est transporté, de façon constitutive, par transcytose en absence de l'IgA. Cependant il est à noter que, lorsque l'IgA est présente, la liaison de l'IgA avec le récepteur stimule la transcytose de ce dernier. Ceci permet à la cellule de réguler la transcytose au fur et à mesure que la quantité d'IgA augmente suite à la stimulation de la réponse immunitaire. La liaison du récepteur à l'IgA engendre une cascade de signaux qui sont responsables de la formation de dimères du récepteur pIgR et de la phosphorylation des tyrosines présentes sur les protéines, entre autre la phospholipase $C\gamma 1$ ^(255, 406). La phosphorylation active la protéine kinase C et augmente la quantité de calcium intracellulaire, ce qui stimule l'exocytose du complexe récepteur-IgA. Sous certaines conditions

expérimentales, la liaison entre le récepteur pIgR et l'IgA provoque l'extension de longs tubules, à partir des endosomes précoces basolatéraux, ce qui permet à la cellule d'acquérir la morphologie nécessaire à la transcytose du complexe du domaine basolatéral au domaine apical⁽²⁹³⁾.

Les notions concernant la transcytose d'un récepteur du domaine apical au domaine basolatéral se sont précisées avec la publication de l'étude réalisée, en 2002, par le groupe de Ramalingam⁽³⁵¹⁾, sur le récepteur Fc. Ces études ont démontré que la transcytose est impliquée lors du transfert passif des anticorps (IgG) de la mère au fœtus ou au nouveau-né permettant, de ce fait, à ce dernier d'acquérir une immunité humorale. La transmission de l'IgG se fait à l'aide d'un récepteur Fc, présent chez le nouveau-né, qui est associé à une molécule de classe I. Des études réalisées chez les rongeurs ont permis de démontrer que le récepteur Fc, situé au domaine apical des entérocytes de l'intestin, se lie aux IgG présents dans le lait maternel. Le domaine apical étant plus acide il permettrait la liaison entre le récepteur Fc et l'IgG. Finalement les IgG sont escortées à travers l'épithélium de l'intestin et elles sont par la suite relâchées dans la circulation sanguine à partir du domaine basolatéral grâce à la transcytose⁽¹⁵²⁾. La différence de pH entre le domaine apical et le domaine basolatéral des cellules épithéliales de l'intestin assure donc le transport unidirectionnel de l'IgG⁽³⁶¹⁾.

Il semble qu'il n'y ait pas que les récepteurs qui utilisent la transcytose pour se déplacer d'un domaine à l'autre dans la cellule. En effet, des études ont démontré que certains virus, dont le VIH-1, utilisent ce mode de transport pour passer du domaine apical au domaine basolatéral. Dans le cas du VIH-1, les tractus gastro-intestinal, ano-rectal et génito-urinaire sont considérés comme les principales voies naturelles de l'infection par le virus⁽²⁸⁵⁾. Il est à noter que ces muqueuses sont recouvertes d'une couche de cellules épithéliales polarisées. Les différentes sécrétions, qui représentent des vecteurs de la transmission du VIH-1, contiennent des cellules mononucléées infectées par le virus. Ces dernières peuvent se lier avec la surface apicale des cellules épithéliales. C'est cette liaison qui induit le bourgeonnement du virus au site de contact puis les virions sont par la suite internalisés par la cellule épithéliale polarisée dans des endosomes⁽³³⁾. Une étude récente a permis de démontrer que la transmission du

VIH-1 des PBMCs infectés aux cellules épithéliales se ferait grâce à la formation d'une synapse virologique. En effet, il semble que le contact entre les cellules infectées et les cellules épithéliales intestinales entraînerait la ségrégation et la concentration de molécules d'adhésion ainsi que le recrutement des radeaux lipidiques au site de contact entre les cellules⁽⁶⁾. De plus, par l'intermédiaire de la gp41, le virus s'attache à l'agrine, qui est un récepteur présent à la surface apicale des cellules épithéliales. L'agrine entraîne également le recrutement du récepteur cellulaire galactosyl céramide (GalCer) aux radeaux lipidiques. Le récepteur GalCer, qui est reconnu pour agir à titre de récepteur cellulaire alternatif pour l'infection par le VIH-1, se lie à la gp120 et c'est ce qui stabilise la présence de ce dernier aux radeaux lipidiques. Ces différentes étapes mènent à la transmission par transcytose du VIH-1 des PBMCs infectées aux cellules épithéliales^(6, 178).

D'autres études effectuées *in vitro* avec des cellules épithéliales trophoblastiques, provenant de la barrière qui protège le fœtus, ont permis de démontrer que la transmission mère-enfant du VIH-1 se fait par transcytose. Il a été possible de démontrer que le contact entre les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) et le côté apical des cellules épithéliales trophoblastiques polarisées a deux conséquences. Premièrement, ce dernier permet le bourgeonnement rapide du VIH-1 au site de contact et sa transcytose à travers la barrière du trophoblaste, et ce sans réplication du virus. Ce contact permet également la fusion entre les PBMC infectées et les cellules trophoblastiques, ce qui entraîne la réplication du virus et la production de nouveaux virions au pôle basolatéral de la monocouche de cellules trophoblastiques (Figure 16)^(223, 446).

À la lumière de cette section, il est possible de constater que le mode de transport des glycoprotéines dans les cellules épithéliales polarisées est complexe. Ce transport peut être associé à la présence de motifs qui influencent le ciblage des protéines vers l'un ou l'autre des domaines présents dans la cellule polarisée ou à ce mode de transport particulier qu'est la transcytose. Cette dernière peut influencer non seulement le ciblage des récepteurs et des protéines mais également celui des virus présents dans les vésicules, qui permettent le

transport direct d'un pôle à l'autre de la cellule. Dans le prochain chapitre, nous examinerons l'influence que peuvent avoir certains motifs de ciblage, présents dans les différentes glycoprotéines virales, sur la pathogenèse des virus. De plus, il sera question de l'importance de certains domaines des glycoprotéines qui sont impliqués dans l'incorporation de ces dernières à la particule virale et du rôle qu'ils jouent dans l'infectivité des virus.

6. Implication des domaines transmembranaire et cytoplasmique des glycoprotéines virales dans l'infectivité et la pathogenèse virale

Tel que déjà mentionné, l'incorporation des glycoprotéines virales est nécessaire à la formation d'une particule virale infectieuse. En ce qui concerne les virus à ARN, l'incorporation des glycoprotéines se fait lors de la relâche de la particule virale à la membrane plasmique. Il a été possible de constater, à la section 4.5, que la présence de motifs dans les glycoprotéines cellulaires affectent le transport de ces dernières dans les cellules épithéliales polarisées. Il en est de même en ce qui concerne les glycoprotéines virales. Il est également à noter que le contact entre les cellules, assuré par les glycoprotéines virales présentes à la surface des cellules, favorise la transmission du virus dans les cellules épithéliales polarisées. Cette section fera donc un survol de l'influence des domaines transmembranaire et cytoplasmique des glycoprotéines sur l'infectivité et la pathogenèse virale. Il faut souligner que la majorité de cette section sera consacrée aux rétrovirus, bien que certains exemples pertinents relatifs à d'autres virus, tels les paramyxovirus et les filovirus, seront également cités.

6.1 Paramyxovirus : virus Sendai, virus de la rougeole et virus respiratoire syncytial (RSV)

6.1.1 Virus Sendai

Il semble que la capacité d'un virus à bourgeonner, du domaine apical ou basolatéral des cellules épithéliales polarisées, joue un rôle important dans la pathogenèse et la propagation des virus. Le virus Sendai en est un bel exemple.

Il est bien connu que ce paramyxovirus est exclusivement pneumotropique chez la souris et que le tropisme et la pathogénèse du virus Sendai chez la souris sont déterminés par la distribution, à certains organes, des protéases responsables du clivage de la glycoprotéine de fusion (F). De plus, le fait que le bourgeonnement du virus sauvage se fasse au domaine apical des cellules expliquerait que le virus se retrouve en majorité à la surface du tractus respiratoire mais aucun motif spécifique n'a été identifié dans la glycoprotéine F^(422, 423). Cependant, selon la littérature, il existe un mutant de la glycoprotéine F, le mutant F1-R, qui entraîne le bourgeonnement du virus Sendai à la fois aux domaines apical et basolatéral. C'est ce qui permettrait au virus d'envahir les tissus sous la couche de cellules épithéliales et de se propager aux autres organes^(421, 422).

Des études réalisées avec le système de culture sur membrane semi-perméable des cellules épithéliales polarisées MDCK ont démontré que lorsque le virus Sendai est recueilli du côté basolatéral de la membrane semi-perméable et que des souris sont inoculées avec le virus, la pathogénèse semble atténuée comparativement au virus sauvage⁽⁵⁾. Bien que le virus soit atténué, il est évident qu'un changement au niveau du ciblage de la glycoprotéine entraîne un changement dans le tropisme du virus, ce qui peut modifier significativement sa pathogénèse.

6.1.2 Virus de la rougeole

Le virus de la rougeole est un paramyxovirus qui possède à sa surface deux glycoprotéines virales, la protéine de fusion (F) et la protéine hémagglutinine (H). Il a été démontré que chacune de ces glycoprotéines possède un motif à base de tyrosine dans sa partie cytoplasmique et que ce motif est responsable du ciblage de ces dernières au domaine basolatéral des cellules polarisées MDCK^(288, 289). De plus, il semble que lorsque la tyrosine de l'un ou l'autre des motifs présents dans les glycoprotéines F et H est mutée, ces dernières sont redirigées vers le domaine apical des cellules MDCK. Il a également été observé que lorsque les glycoprotéines se retrouvent au domaine apical, le virus de la rougeole ne peut plus se propager d'une cellule à l'autre suite à la formation de syncytium, *in vitro*. Des études plus approfondies dans un

modèle animal ont montré que lorsque la tyrosine présente dans les glycoprotéines est mutée, le virus demeure au niveau de l'épithélium du tractus respiratoire et ne peut plus se propager aux tissus lymphatiques et assurer ainsi la propagation systémique de l'infection⁽²⁸⁹⁾. D'autres études ont également démontré que lorsque le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine F est altéré le virus de la rougeole se propage au cerveau des patients infectés ce qui jouerait un rôle important dans le développement de la panencéphalite sous-aigue sclérosante (SSPE)^(52, 383).

6.1.3 Virus respiratoire syncytial (RSV)

Le dernier paramyxovirus dont il sera question est le virus respiratoire syncytial (RSV). Ce virus cause des problèmes respiratoires importants chez les enfants. L'importance de la glycoprotéine F au niveau de la pathogenèse, à cause de son implication dans la formation des syncytia, a été bien démontrée. Bien qu'aucun motif spécifique n'ait pu être identifié dans la glycoprotéine F virale il semble que la présence de cette dernière entraînerait la localisation du virus aux radeaux lipidiques, situés au domaine apical des cellules épithéliales polarisées, ce qui faciliterait la formation de la particule virale. Au même titre que ce qui est observé dans le cas du VIH-1, il semble que les glycoprotéines F sont localisées à un endroit précis des radeaux lipidiques favorisant l'interaction avec des protéines cellulaires. Cette interaction mène à la formation et au bourgeonnement de la particule et permet la formation des syncytia. Il est également à noter que lorsque ces radeaux lipidiques sont altérés ou que les protéines cellulaires ou virales ne sont pas incorporées cela peut influencer la pathogenèse du virus respiratoire syncytial⁽²⁷⁷⁾. Des études plus récentes ont permis de démontrer que le domaine transmembranaire de la glycoprotéine F du RSV semble impliqué à la fois dans le ciblage de la glycoprotéine et dans le ciblage du virus au domaine apical des cellules épithéliales polarisées⁽⁴³⁾.

6.2 Rétrovirus : oncoretrovirus et lentivirus

6.2.1 Oncoretrovirus

6.2.1.1 Virus de la leucémie bovine (BLV)

Les motifs qui influencent le ciblage diffèrent selon le domaine de la glycoprotéine où ils sont présents. Tel que décrit à la section 5.4 il existe des structures ou des motifs qui ciblent les glycoprotéines soit au domaine apical ou au domaine basolatéral des cellules épithéliales polarisées. En ce qui concerne les rétrovirus, la majorité de ces motifs sont situés dans le domaine cytoplasmique des glycoprotéines virales et ils sont représentés par la séquence suivante : YXXØ. En effet, il est possible d'observer la présence de motifs à base de tyrosine, trois pour être plus précis, dans le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine transmembranaire de l'oncoretrovirus BLV. Lorsque la tyrosine du second motif est mutée il est possible de constater que le virus perd son potentiel infectieux. De plus, lorsque la tyrosine du premier motif est mutée le virus demeure infectieux mais sa propagation, *in vivo*, est grandement affectée. Les motifs à base de tyrosine présents dans la glycoprotéine du BLV sont donc importants pour l'infection et pour la propagation du virus⁽⁴⁷²⁾.

6.2.1.2 Virus de la leucémie à cellule T humaine de type 1 (HTLV-1)

Il existe un autre rétrovirus dont la glycoprotéine transmembranaire possède un motif à base de tyrosine dans son domaine cytoplasmique il s'agit de l'oncoretrovirus HTLV-1. Ce virus possède une glycoprotéine transmembranaire qui a un domaine cytoplasmique de 24 acides aminés, qui est plus court que celui des lentivirus. Il est bien connu que la transmission du HTLV-1 se fait en majorité suite à un contact cellule à cellule et ce autant *in vitro* qu'*in vivo*. De plus des études de mutagenèse ont démontré que le motif à base de tyrosine présent dans le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine transmembranaire est essentiel à la transmission du virus⁽¹⁰⁰⁾. Le contact entre cellules est nécessaire pour la propagation du HTLV-1 surtout lors de l'infection des lymphocytes qui produit une quantité infime de virus libres. En effet, suite à l'infection de la cellule

par le HTLV-1 il y aurait polarisation du cytosquelette de la cellule infectée lorsque cette dernière entre en contact avec une cellule cible non-infectée. Le virus s'accumule au point de contact entre les deux cellules ce qui favoriserait la propagation du HTLV-1⁽¹⁹²⁾.

6.2.1.3 Virus de la leucémie murine (MLV)

Il a été rapporté dans la littérature que les domaines transmembranaire et cytoplasmique de la glycoprotéine transmembranaire du virus de la leucémie murine (MLV), qui est un autre rétrovirus, jouent un rôle essentiel dans l'infectivité du virus. Il est déjà connu que le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine transmembranaire de la souche écotropique Cas-Br, de l'oncoretrovirus MLV, possède un motif à base de tyrosine qui est responsable du ciblage de cette dernière au domaine basolatéral dans la cellule⁽²⁴⁷⁾. De plus, il a été démontré que lorsque la tyrosine de ce motif est mutée ou délétée le ciblage au domaine basolatéral des cellules épithéliales polarisées MDCK du virus est perdu. Il a également été démontré que cette mutation ou délétion entraîne un retard dans l'apparition de la maladie chez les souris inoculées avec le virus et qu'elle change complètement la pathologie car une hypertrophie du thymus et des ganglions lymphatiques est observable chez les animaux inoculés avec les virus mutés⁽⁸⁹⁾. Ce point sera approfondi au chapitre 4.

6.2.2 Lentivirus

6.2.2.1 Virus de l'immunodéficience simienne (VIS)

Tel qu'énoncé précédemment à la section 3.6.3.3, le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine transmembranaire des lentivirus est beaucoup plus long que celui des autres rétrovirus. Dans le cas du VIS, il a été démontré que la présence d'un codon stop, suite à des passages cellulaires successifs, pouvait favoriser la réplication du virus *in vitro*⁽²¹⁶⁾. D'autres études ont cependant démontré que la présence de deux codons stop dans le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine de la souche VISmac1A11 rend cette dernière non-pathogénique. Il a également été démontré que lorsque des macaques sont

inoculés avec cette souche la progression de la maladie et l'augmentation de la charge virale coïncide avec la réversion des deux codons stop et l'expression d'une glycoprotéine avec un domaine cytoplasmique complet⁽²⁵⁴⁾. Des études similaires ont été réalisées avec une autre souche de VIS, la souche VISmac-M4. Ces études ont également démontré que la présence de codons stop dans le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine transmembranaire du VIS sont responsables de l'atténuation de la maladie chez les macaques Rhésus⁽³⁹³⁾.

Il est également à noter que des études réalisées dans les cellules épithéliales polarisées de reins de singes verts d'Afrique, les cellules VeroC1008, ont montré que malgré la présence de deux codons stop la souche VISmac1A11 bourgeonne au domaine basolatéral des cellules polarisées. Puisque le premier codon stop est situé au niveau de l'acide aminé 733 du domaine cytoplasmique de la glycoprotéine et que cela n'empêche pas le virus VISmac1A11 de bourgeonner au domaine basolatéral de la cellule, tout comme c'est le cas lorsque le domaine cytoplasmique est complet, ce qui n'est pas étonnant puisque le ciblage du VIS être attribué à la tyrosine proximale (position 723) au domaine transmembranaire de la glycoprotéine⁽¹⁸⁵⁾. De plus il est à noter que la mutation de la tyrosine en position 723 dans la glycoprotéine de la souche VISmac239 réduit la pathogénèse du VIS chez les macaques Rhésus.

Ces études ont également démontré que lorsque la tyrosine et la glycine, qui précède la tyrosine, sont délétées il est possible de noter une réduction des symptômes de la maladie chez une partie des macaques inoculés. Cependant il a été possible d'observer une augmentation de la charge virale et l'apparition des symptômes de la maladie chez certains macaques qui peut s'expliquer par la réversion de la mutation de la tyrosine. Il faut souligner que les animaux qui ont été inoculés avec le VIS, dont la glycine et la tyrosine ont été enlevées, ont développé des mutations compensatoires dans le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine qui ont permis de rétablir la pathogénèse du VIS⁽¹⁴³⁾. Ces différentes études ont permis de démontrer l'importance, au niveau de la pathogénèse du VIS, du domaine cytoplasmique et de la présence dans ce dernier d'un motif intact à base de tyrosine.

6.2.2.2 Virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1)

La présence d'un motif à base de tyrosine dans le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine transmembranaire gp41 dirige le ciblage du VIH-1 au domaine basolatéral des cellules épithéliales polarisées. Ceci a été démontré autant dans les cellules VeroC1008 que dans les cellules MDCK^(248, 322). Il est à noter que le motif à base de tyrosine influence également le ciblage du VIH-1 à un pôle spécifique des lymphocytes CD4⁺ ce qui favorise la transmission du virus lorsqu'il y a un contact entre deux cellules⁽¹⁰⁷⁾. Ce contact direct entre les cellules représente un mécanisme de dissémination virale entre les cellules infectées par le VIH-1 et la cellule cible, suite à la formation d'une synapse virologique entre les deux cellules. Il a également été démontré que l'infection des lymphocytes par le VIH-1 entraînerait la formation de jonctions serrées stables nommées synapses, contenant plusieurs complexes formés par la glycoprotéine virale et le récepteur CD4 qui faciliteraient, avec les molécules d'adhésion, l'infection des cellules cibles⁽²⁰⁰⁾. Il est également à noter que le recrutement des différentes molécules à la synapse polarisée est possible seulement si la glycoprotéine virale se lie au récepteur CD4 et au co-récepteur CXCR4 et s'il y a restructuration du cytosquelette d'actine⁽²⁰⁰⁾. Il faut souligner que l'intégrité des radeaux lipidiques doit également être maintenue pour qu'il y ait formation de la synapse virologique⁽²⁰¹⁾. Ces études sont complémentaires aux premières études réalisées, *in vitro*, sur l'infection des cellules épithéliales par des lymphocytes infectés par le VIH-1.

En effet, ces études mettaient en évidence la transmission du VIH-1 suite à un contact entre deux types cellulaires et plus précisément entre des cellules épithéliales de l'intestin et des lymphocytes infectés. Ces études, réalisées *in vitro*, mettaient également en relief la transmission du virus à travers un épithélium intact⁽³³⁶⁾. Il est à noter que d'autres études du même genre ont été effectuées mais cette fois-ci sur les cellules épithéliales de l'utérus. Il a alors été démontré que la transmission du VIH-1 se fait le plus souvent de l'homme à la femme. De plus, il semble que le virus se propage à travers l'épithélium du système reproducteur de la femme. Les différentes études effectuées ont également démontré que lorsque les cellules épithéliales de l'utérus sont infectées par le VIH-1 il existe deux mécanismes probables de transmission. Un

premier mécanisme pourrait entrer en jeu très tôt suite à l'infection des cellules épithéliales et permettre la transmission des particules virales libres aux leucocytes situés sous l'épithélium. Quant au second mécanisme il pourrait se mettre en branle un peu plus tard au cours de l'infection et il impliquerait, quant à lui, un contact entre la cellule épithéliale infectée et le leucocyte situé sous l'épithélium, permettant ainsi la transmission du virus⁽¹⁸⁾.

Des études ont également démontré que lorsque la tyrosine, située dans le domaine cytoplasmique de la gp41, est mutée il semble que l'infectivité du VIH-1 diminue et ce même en présence de la protéine Nef⁽⁹³⁾. Cependant, il est à noter que ces résultats contredisent ceux obtenus dans notre laboratoire⁽⁵⁷⁾. Cet aspect sera repris plus en détails dans la discussion générale.

Dans le cas du VIH-1, il n'y a pas que dans le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine transmembranaire gp41 que l'on retrouve un motif qui est impliqué dans la pathogenèse virale. En effet, il est possible d'identifier un autre motif, cette fois-ci à base de di-leucine, présent dans le domaine cytoplasmique de la protéine Nef, qui est requis pour l'infectivité optimale du VIH-1⁽⁸³⁾.

6.3 Filovirus : Marburg et Ebola

Il est à noter, tel que mentionné précédemment, que la transmission d'un virus d'une cellule à l'autre se fait, dans la majorité des cas, à l'endroit où est située la glycoprotéine virale sur la cellule. Cependant les filovirus Marburg et Ebola font exception à cette règle. Ces deux virus sont des pathogènes très sérieux qui causent des fièvres hémorragiques sévères chez les patients infectés. Il est intéressant de constater que les glycoprotéines virales de ces deux virus sont ciblées au domaine apical des cellules épithéliales polarisées alors que la relâche des virions se fait, quant à elle, au domaine basolatéral de ces mêmes cellules⁽³⁷⁸⁾. En effet dans le cas du virus Marburg, et ce contrairement aux autres virus cités précédemment, il semble que le ciblage au domaine basolatéral soit associé avec la présence à ce domaine de la protéine de la matrice (VP40). Il est à noter que cette dernière possède un motif à base de tyrosine qui est impliqué dans le bourgeonnement de la particule virale et qui pourrait influencer la relâche

du virus à ce domaine⁽¹⁹⁷⁾. Cependant, à ce jour aucune association n'a pu être mise en évidence entre la protéine de la matrice VP40 et la relâche au domaine basolatéral du virus Ebola puisqu'il semblerait que ce soit la seconde protéine de la matrice, VP24, qui serait responsable de son bourgeonnement et de plus aucun motif à base de tyrosine n'a pu être identifié dans la séquence de la protéine VP24⁽¹⁰⁾.

En résumé, en ce qui concerne les rétrovirus, il est bien connu que la présence de la glycoprotéine virale n'est pas essentielle à la relâche de la particule virale. Cependant, lorsque la glycoprotéine est présente elle semble influencer la relâche de la particule virale en dirigeant cette dernière vers un domaine cellulaire spécifique. Il doit donc exister des mécanismes spécifiques qui permettent la concentration de la glycoprotéine à l'endroit où la particule virale est relâchée. Le mécanisme qui assure le ciblage spécifique de l'enveloppe est associé avec la présence de structures ou de motifs dans certains domaines de la glycoprotéine virale. Il est à noter que dans les cellules épithéliales polarisées, la présence de ces motifs influence grandement la pathogenèse, en favorisant la transmission cellule à cellule, et elle influence également le tropisme du virus⁽⁴²²⁾.

7. Problématique et buts du projet de recherche

Tout au long de cette revue de la littérature, il a été possible de constater que la glycoprotéine transmembranaire virale, gp41, du VIH-1 est une des protéines virales qui joue un rôle primordial lors de l'infection des cellules par le virus. En effet, la gp41 est non seulement impliquée dans les étapes précoces de l'infection, notamment la fusion entre la membrane cellulaire et l'enveloppe virale, mais également dans les étapes plus tardives. Différentes études ont également démontré que le domaine cytoplasmique de la gp41 jouerait un rôle important dans l'incorporation de la glycoprotéine virale^(115, 294, 453). La présence de la gp41 au domaine basolatéral des cellules épithéliales polarisées entraîne la relâche à ce domaine de la particule virale, favorise le ciblage à un pôle des lymphocytes infectés ainsi que la transmission cellule à cellule^(107, 248, 322). Le domaine cytoplasmique de la gp41 est impliqué dans le ciblage au domaine basolatéral et ce grâce à la présence dans ce domaine d'un motif à base de tyrosine YXXØ. Ce

motif est proximal au domaine transmembranaire de la glycoprotéine gp41 et il est non seulement très conservé chez plusieurs isolats du VIH-1 et du VIS mais il est également présent chez d'autres rétrovirus, ayant un domaine cytoplasmique plus court, dont le MLV et le HTLV-1^(247, 249). Différentes études ont également démontré que le motif à base de tyrosine influence la pathogénèse des virus VISmac239 et MLV^(89, 143).

Il a également été démontré que le motif à base de tyrosine est impliqué lors de l'internalisation de la glycoprotéine virale. Ce dernier peut en effet lier la sous-unité μ 2 de l'adaptine AP-2. Cette dernière recrute les molécules de clathrine, ce qui mène à la formation des vésicules de clathrine et entraîne l'invagination de la membrane plasmique permettant ainsi l'internalisation de la glycoprotéine dans la cellule^(222, 306, 371, 380).

Il a été clairement démontré que la tyrosine comprise dans le motif YXXØ joue un rôle autant dans l'internalisation des glycoprotéines que dans le ciblage de ces dernières au domaine basolatéral, cependant la séquence exacte en acides aminés responsable du ciblage basolatéral ou de l'internalisation n'a pas encore été identifiée. L'identification des séquences responsables permettrait de mieux comprendre le rôle du ciblage basolatéral et de l'internalisation des glycoprotéines virales dans la réplication du VIH-1 et plus spécifiquement dans l'assemblage du virus. **Le premier objectif de ce projet visait donc à séparer les déterminants moléculaires associés au ciblage polarisé et à l'internalisation de la glycoprotéine gp41 et ce en substituant les acides aminés flanquant la tyrosine impliquée dans les deux phénomènes.** Ce travail, sous forme d'un article soumis pour publication, est présenté au chapitre 2. Ce travail a été facilité par l'utilisation d'une lignée de cellules MDCK infectables par le VIH, qui a préalablement été développée au laboratoire. L'article auquel j'ai participé, décrivant cette lignée, est présenté en appendice.

La gp41 est impliquée dans les étapes plus précoces de l'infection. Cette protéine transmembranaire est produite par la maturation du précurseur gp160 ce qui donne également la glycoprotéine de surface virale, gp120. Le rôle de la gp120 est de lier les récepteurs et les co-récepteurs cellulaires CD4 et

CXCR4/CCR5^(379, 441) alors que celui de la gp41 est de permettre la fusion entre l'enveloppe bilipidique virale et la membrane cellulaire, ce qui permet l'entrée du virus⁽⁴⁶⁹⁾. Alors que de nombreuses études ont démontré l'importance de l'ectodomaine de la gp41 dans le processus de fusion virale^(196, 211, 246, 253, 457), le rôle joué par le domaine transmembranaire de cette dernière demeure quant à lui moins bien défini. Bien que le rôle premier qui lui est attribué soit l'ancrage de la glycoprotéine virale à la membrane du virus, son implication dans la fusion virale et dans l'infectivité du virus demeure controversée^(287, 471). Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire ont permis d'établir qu'une délétion de l'acide aminé isoleucine en position 642 de l'ectodomaine (mutant $\Delta I642$) ou la substitution du domaine transmembranaire de la gp41 par celui de la protéine hémagglutinine (HA) du virus influenza (mutant TM-HA), enrayent tous deux l'infectivité virale. **Le second objectif de ce projet visait à déterminer si ces glycoprotéines mutantes pouvaient inhiber l'infectivité conférée par la glycoprotéine sauvage et par quel mécanisme.** Ce travail, sous forme d'un article à être soumis sous peu, est présenté au chapitre 3.

CHAPITRE 2 :

ARTICLE 1

Le motif à base de tyrosine joue un rôle autant dans l'internalisation des glycoprotéines que dans le ciblage de ces dernières au domaine basolatéral. Cependant, la séquence exacte en acides aminés responsable du ciblage basolatéral ou de l'internalisation n'a pas encore été identifiée. L'identification des séquences responsables permettrait de mieux comprendre le rôle du ciblage basolatéral et de l'internalisation des glycoprotéines virales dans la réplication du VIH-1 et plus spécifiquement dans l'assemblage du virus. Le but de ce travail visait donc à séparer les déterminants moléculaires associés au ciblage polarisé et à l'internalisation de la glycoprotéine gp41 et ce en substituant les acides aminés flanquant la tyrosine impliquée dans les deux phénomènes. Cet article a été soumis dans le journal *Retrovirology*.

Sequence Context Modulates Activity of the Dual Basolateral/Endocytosis YXXØ Signal of HIV-1 Gp41 Intracytoplasmic Domain

MÉLANIE WELMAN¹, ÉRIC A. COHEN^{1,2} AND GUY LEMAY^{1*}

¹*Département de Microbiologie et immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7;* ²*Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Québec, Canada*

Running title: ACTIVITY OF YXXØ SIGNAL OF HIV-1 Gp41

Word count: Abstract: 249
 Text: 6381

*Corresponding author. Mailing address: Département de Microbiologie et immunologie, Université de Montréal, P.O. Box 6128, Station Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7. Phone: (514)-343-2422. Fax: (514)-343-5701. Electronic mail address: XXXXXXXXXX

ABSTRACT

The intracytoplasmic domain of the HIV-1 gp41 glycoprotein harbors a tyrosine-based YXXØ signal involved in targeting of the glycoprotein at specific cell-surface membrane subdomains and in downmodulation of the glycoprotein from the cell surface via endocytosis. The dual activity of the signal renders complex the analysis of its role in viral replication and assembly. An alanine scan mutagenesis was performed on the glycoprotein intracytoplasmic region, adjacent to the YXXØ signal, in an effort to separate determinants of the signal required for endocytosis or targeting to the basolateral domain of polarized epithelial cells. Substitution of the glycine residue, preceding the tyrosine, increased steady-state levels of the glycoprotein at the cell surface, suggesting a loss of endocytic signal, while basolateral targeting remained unaffected. In contrast, other amino acids substitutions, except that of the critical tyrosine residue, resulted in a loss of targeting while level of envelope glycoprotein at the cell surface was essentially unaffected. Capsid protein (p24) was found to harbor a punctate intracellular distribution only when virus budding was targeted to the basolateral surface. Interestingly, basolateral targeting of the envelope glycoprotein was observed without polarization of budding in one mutant, and this also resulted in a loss of punctate distribution of the capsid protein. All viruses encoding mutant envelope glycoproteins were infectious and able to replicate in human Jurkat T-cell line. Overall, these results indicate that it is possible to separately alter the different phenotypes conferred by the YXXØ motif to further examine their roles in HIV-1 replication and pathogenesis.

INTRODUCTION

The last step of every productive viral multiplication cycle is capsid assembly followed by virus release. In enveloped viruses, such as the retrovirus human immunodeficiency virus (HIV-1), this is accompanied by incorporation of viral envelope glycoproteins (Env) inserted in the lipid envelope of the budding virions⁽²¹⁾.

It is now generally accepted that most cell types exhibit a specific distribution of their membrane proteins and that not all cell surfaces exhibit the same lipid and protein composition. This is not unexpected since this different protein composition reflects the role of differentiated membrane surfaces. This is especially evident in “polarized” epithelial cells although other cell types use similar mechanisms to generate distinct membrane domains or functional poles^(43,46,48,59). Since synthesis and transport of viral proteins relies on the cellular machinery, it is thus not surprising that some viruses also exhibit a polarized phenotype of insertion of their membrane “envelope” glycoproteins and/or polarization of viral budding^(15,74).

Accordingly, since pioneering studies performed 25 years ago⁽⁶⁰⁻⁶²⁾, viruses have been instrumental in the study of protein targeting at specific membrane domain in polarized epithelial cells. In HIV-1, the membrane glycoprotein is specifically transported at the basolateral surface of epithelial cells in culture⁽⁵²⁾. Basolateral targeting of the glycoprotein restricts viral budding at this membrane surface^(37,53), although viral glycoproteins are not necessary for viral budding in retroviruses^(21,31); this directional budding of HIV-1 requires the interaction of Env gp41 with the MA domain of the Gag polyprotein precursor (Pr55gag) and the resulting incorporation of Env into viral particles^(37,53). Other retroviral glycoproteins, such as those of human T-cell leukemia virus (HTLV-I) and murine leukemia virus (MuLV), can substitute for that of HIV-1 to promote basolateral budding of HIV-1 virions^(16,36). The budding of other retroviruses (MuLV, HIV-2 and SIV) is also targeted to the basolateral surface via a signal present in the intracytoplasmic domain of their respective envelope glycoproteins^(4,16).

Considering that other cell types, in addition to epithelial cells, exhibit some form of polarized distribution of their cell surface molecules, it was logical to assume that polarized release could be extended to other cells. This was actually shown to be the case in HIV-infected lymphocytes where virus assembly of capsid protein underneath the cell surface is targeted at a distinct cell pole^(19,32). This is consistent with various observations showing virus release directed toward cell-to-cell contact zones. This directional release of virus budding was shown to favor virus propagation in infected cell culture for both HTLV-I and HIV-1^(18,19). It has also been proposed that the directional release of virus from an infected mononuclear cell to an epithelial cell could favor cell-to-cell viral transmission^(8,54-56,69,70). This original idea has attracted more attention recently with the rising concept of targeted viral egress that has now been shown with different viruses⁽²⁷⁾. Hence, several studies have shown that targeting and accumulation of specific viral and cellular components at distinct subdomains of the cell surface results in the formation of the so-called “virological synapse” that favors transfer of retroviruses from an infected to an uninfected cell, either during contact between lymphocytes, dendritic cells and lymphocytes, or between lymphocytes and epithelial cells^(1,3,26,28,29,42).

Site-directed mutagenesis studies have established that a membrane-proximal tyrosine-based motif, the classical YXXØ motif (where Ø is a large hydrophobic amino acid residue), is responsible for basolateral targeting in at least 4 different retroviral envelope glycoproteins (Moloney-MuLV, Cas-Br-E-MuLV, HIV-1, and HTLV-I)^(16,36,38), as well as for polarized release of HIV-1 in lymphocytes⁽¹⁹⁾.

The situation is, however, rendered complex by the fact that the same YXXØ motif could also act as an endocytosis signal, resulting in downmodulation from the cell surface, in multiple proteins. This was actually shown to be the case in retroviruses such as SIV and HIV-1^(5,7,9,20,32,64,67,80,81). Downmodulation of envelope glycoprotein from the cell surface could have a role in lentiviral pathogenesis by reducing the amount of unassembled envelope glycoprotein present at the cell surface, thus limiting the likelihood that the host immune system could recognize and destroy these infected cells^(39,40). The situation is probably even more complex in retroviruses such as HIV since it is also

suspected that the motif interacts, directly or functionally, with viral accessory proteins, Nef and Vpu^(13,14).

The importance of polarized budding and/or endocytosis in viral replication or pathogenesis is well supported by experimental evidence. In the case of Sendai virus, a loss of viral polarized release, that is not directly due to an altered targeting signal of the viral envelope glycoprotein⁽⁷¹⁾, changes the pathology in experimental mice from a localized respiratory tract infection to a systemic viremia with a high percentage of death in inoculated animals^(51,72). In measles virus, reversal of polarization from basolateral to apical results from substitution of the critical tyrosine residue of a YXXØ motif; in this case, infection by the mutant virus is limited to the respiratory tract in an animal model, while measles virus normally spreads systemically in this same model⁽⁴⁴⁾.

In retroviruses, simian immunodeficiency virus mutants harboring amino acids substitution in the YXXØ motif displayed reduced pathogenicity in macaques; mutations also had a tendency to revert, suggesting that there is a strong selective pressure to keep the motif intact⁽²²⁾. However, in these experiments, it was impossible to determine whether reduced pathogenicity was associated to a defect in targeting of Env at specific domain(s) of the cell surface or to a defect in its downmodulation from the cell surface via endocytosis. In murine leukemia viruses, the tyrosine-based motif seems to act solely as a targeting signal, rather than a dual polarization/endocytosis motif^(16,24). Altering the tyrosine-based motif in such a virus did not clearly reduce its pathogenic potential but rather affected the profile of the disease that was induced in mice. In absence of the motif, the virus seems to have an altered tissue distribution in the organism: while the wild type virus was limited to the spleen, the mutant produced thymomas and hypertrophy of the lymph nodes in a significant percentage of inoculated animals⁽¹⁶⁾.

Although tyrosine-based motifs can act both as a polarization and endocytosis motif when present on various viral and cellular proteins, it has been shown in numerous cases that the surrounding sequence context can modulate the activity of either basolateral or endocytosis motif^(2,34,35,41,49,57). This will determine if a given motif will solely act as basolateral signal, endocytosis signal,

or both, likely through differential interaction with different cellular adaptins^(6,25,45,47,50).

In the present study, the region surrounding the tyrosine-based motif of HIV-1 Env glycoprotein was submitted to alanine-scan substitution mutagenesis and the resulting mutants were expressed to trans-complement an Env-negative proviral clone or introduced in a complete infectious proviral clone. Detailed characterization of the resulting mutants in terms of Env basolateral localization, polarized viral budding and Env endocytosis indicates that it is possible to separately alter and modulate the different phenotypes conferred by the intracytoplasmic domain of HIV-1 envelope glycoprotein.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines. Human HEK293T cells expresses the large T antigen of SV40, allowing replication of plasmid harboring the SV40 replication origin. MAGI CCR5 (P4-R5) cells used in the multinuclear activation of β -galactosidase infectivity (MAGI) assay were obtained from the NIH Aids Research and Reference Reagent program (cat # 3522). Polarized Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) were originally obtained from the Department of Biochemistry of Université de Montréal while the polarized clone of african green monkey kidney cells (Vero C1008) was obtained from the American Type Culture Collection. The MDCK cell clone transfected to stably express both CD4 and CXCR4 (MDCK-T4/R4) was previously described (manucript under revision⁽¹⁴⁾). Human lymphocytic cells expressing CD4, Jurkat-TA, were previously described⁽¹²⁾. All adherent cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin). Jurkat cells were maintained in RPMI-1640 medium with 15% FBS and antibiotics. All cells were grown at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere and routinely tested for the absence of Mycoplasma contamination using a PCR protocol, as recommended by the manufacturer (Stratagene, LaJolla, CA, USA).

Plasmids. The HXBH10 envelope-negative (*gag+*, *pol+*, *vif+*, *vpr-*, *tat+*, *rev+*, *vpu+*, *env-*, *nef-*) proviral construct of HIV-1 was previously described^(73,78), as well as the envelope expression vector, pSVIII*env*⁽²³⁾, used to express the HIV-1 wild type envelope glycoprotein and to construct the various mutant envelope glycoproteins. Plasmid expression vector for *Tat*, was pSV-CMV-*Tat*, where *Tat* is placed under the transcriptional control of the CMV promoter.

Site-directed mutagenesis. The various single-substitution alanine-scan mutants, were produced using the megaprimer (3-primers) PCR-directed mutagenesis strategy⁽⁷⁵⁾, as in previous study⁽³⁸⁾. The high-fidelity *Pfu* DNA polymerase (InVitrogen) was used for all PCR reactions. Mutants harboring substitution of tyrosine 712 to serine, as well as substitution of proline 714 to alanine, were previously described⁽³⁸⁾. Mutagenic primers used were the following, with mutations underlined.

5'-GTGAATAGAGCCAGGCAGGGATATTC-3' (for V708A);

5'-GAATAGAGTTGCCCAGGGATATTCACC-3' (for R709A);

5'-ATAGAGTTAGGGCCGGATATTCACC-3' (for Q710A);

5'-GTTAGGCAGGCCTATTCACCATTATCG-3' (for G711A);

5'-GCAGGGATATGCACCATTATCG-3' (for S713A);

5'-GATATTCACCAGCTTCGTTTCAGAC-3' (for L715A);

5'-TTCACCATTAGCTTTTTCAGACCC-3' (for S716A);

5'-ACCATTATCGGGCGCAGACCCACC-3' (for F717A) and

5'-CATTATCGTTTGAGACCCACCTC-3' (for Q718E).

Mutated fragments obtained were subcloned in the pSVIII*env* expression vector, as previously described⁽³⁸⁾. The following mutants (Q710A, G711A, S713A, P714A and L715A) were cloned at the *HindIII*-*BamHI* sites in a pSP64-derived plasmid containing the *Vpu* gene between the *SalI*-*KpnI* sites. *SalI*-*BamHI* fragments were then recovered from this intermediate plasmid to be subcloned in the BH10 *Vpu+* proviral construct⁽⁷⁸⁾ to generate isogenic proviruses. The Y712S proviral construct was previously described⁽¹³⁾.

Expression of mutant viral envelope glycoproteins. Initial characterization of the various singly-substituted envelope mutants was done by transient expression in HEK293T cells. The envelope expression vectors (8 μ g) were co-transfected with the *Tat* expression vector (4 μ g) using the classical calcium-phosphate co-precipitation procedure. Pulse-chase experiments were done 48 hours post-transfection. Briefly, cells were starved in serum and methionine-free medium for 30 minutes, scraped from the petri dish, and resuspended for metabolic radiolabeling in 0.5 ml of serum and methionine-free medium for one hour in the presence of 600 μ Ci/mL of Tran³⁵S-Label (1175 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences). Cells were then washed 3 times in "cold" medium (3X methionine and cysteine and 2.5% FBS) and resuspended in the same medium. A chase period of 1, 3 and 6 hours was done, cells were recovered, washed in PBS, and lysed in RIPA buffer (25mM Tris-HCl pH 7.2, 5mM EDTA, 50mM sodium fluoride, 0.02% sodium orthovanadate, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% SDS, and a cocktail of protease inhibitors according to the manufacturer instructions (Roche Applied Science). Cell lysates were clarified by centrifugation at 12 000 rpm for 20 minutes in a refrigerated Sorvall centrifuge. A pre-clearing step was then performed using normal human serum and protein-A sepharose beads for 20 minutes at 4°C. Cell-associated proteins were then analyzed by immunoprecipitation in the same buffer using a serum from a HIV-1 seropositive individual, followed by recovery of antigen-antibody complexes with protein-A sepharose, as previously described⁽³⁸⁾. Immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

Determination of cell surface expression of viral envelope glycoprotein by FACS. Expression of the mutant viral glycoproteins at the cell surface was measured by FACS analysis of either transiently-expressing HEK293T cells or at the surface of infected Jurkat cells. In HEK293T cells, analysis was performed 48 hours post-transfection. For the analysis in Jurkat cells, these were transfected with proviral DNA constructs using DEAE-dextran, as described⁽⁷⁹⁾. The presence of viral glycoprotein was measured at day 9 posttransfection at which time most cells were found to be infected. The technique used for FACS analysis was identical for both cell lines as already described⁽⁷⁹⁾, with minor changes. Cells were incubated 45 minutes at 4°C with an anti-gp160/gp120 polyclonal antibody (NIH AIDS Research Program, catalog

#188) diluted 1/100 in a PBS-5%FBS followed by an incubation of 20 minutes at 4°C with a FITC-conjugated swine anti-goat-IgG (Cedarlane) diluted 1/200 in PBS-FBS. Cells were washed three times with PBS between incubations, fixed in 2% paraformaldehyde (PFA) and analyzed using a FACStar cytofluorometer (Beckton Dickinson).

Viral infectivity measurements using the MAGI assay. Viral infectivity was determined using the classical MAGI assay⁽³⁰⁾, modified to use P4-R5 cells. The different viral stocks were quantitated for total viruses using a reverse transcriptase assay. Similar amounts of viruses (2 cpm/cell and 10 cpm/cell), was then applied onto P4-R5 reporter cells. Virus inoculum was left to adsorb for 2 hours in 150 µL of medium, 100 µL of fresh medium was then added. Cells were fixed 48 hours post-infection, positive (blue) cells were then counted under the microscope. As previously reported, the assay was found to be linear under the conditions used and thus adequately represents the amount of infectious virus present⁽¹³⁾.

Polarization of viral budding. MDCK or Vero C1008 cells were seeded onto semipermeable membrane filters (Millicell-HA, 0.45 µM sterilized culture plate insert, 30 mm; BD Biosciences, Bedford, MA, USA). Polarized viral budding was examined using previously described techniques with some modifications⁽³⁸⁾. Envelope-negative proviral DNA (1 µg) was co-introduced by lipofection with envelope expression vector (4 µg) for either wild type or various mutants at 48 hours, at which times they were confluent and exhibited maximal electrical resistance (1000 ohms·cm², as measured with a Millicell-ERS electrical resistance system from Millipore). Each day, for a total of 3 days post-lipofection, supernatants were recovered and released virus quantitated using a p24 ELISA assay (Coulter Diagnostic, Miami, FL, USA), as previously described⁽³⁷⁾. Results obtained for the different mutants were compared with wild type and Y712S for statistical significance, using the non-parametrical Mann-Whitney test with the help of the SPSS software (version 13).

Immunofluorescence (IF) of infected epithelial MDCK cells. Polarized MDCK cells stably expressing both the primary HIV-1 receptor (CD4) and co-receptor for T-tropic viruses (CXCR4) were previously established and will be referred to as MDCK-T4/R4 cells (manuscript under revision⁽¹⁴⁾). Cells were

seeded at 1.5×10^4 cells per chamber in 8-chamber LabTek slides. Infectious virus stocks (10 cpm/cell), recovered from the supernatant of transiently-transfected HEK293T cells 48 hours following transfection with the various proviral DNAs, was used to infect these cells. Medium was replaced at 16 hours post-infection; cells were then incubated until they reached confluence. The infected cells were then processed for IF either directly, or following treatment with 5mM EGTA (ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N'-tetraacetic acid) in calcium-free PBS for a maximum of 5 minutes at 37°C in order to disrupt tight junctions between cells, by calcium chelation, and to allow access of the antibody to the basolateral surface^(11,52,63,68). Cells were then incubated with a 1/50 dilution of polyclonal goat anti-envelope (gp160/120) antibody in PBS-milk for 2 hours at 4°C, washed with PBS, fixed with 2% PFA that was then removed by washing before incubation with Alexa488-conjugated donkey anti-goat-IgG (Molecular Probes, Oregon) for 40 minutes at 4°C using a 1/100 dilution in PBS-milk. For localization of intracellular Gag proteins, cells were fixed in 4% PFA, permeabilized in 0.2% Triton X-100 for 10 minutes at room temperature and then quenched for 10 minutes in 50mM ammonium chloride. Cells were then incubated for 60 minutes at 37°C with a rabbit anti-p24 antiserum (NIH AIDS Research Programs) diluted 1/100 with PBS-milk. After being washed in PBS, cells were incubated with a 1/500 dilution of an Alexa594-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Oregon) for 40 minutes at room temperature. Slides were examined with a Carl Zeiss Axiovert 200M (Germany) equipped with a Plan Neofluar 100X/1.30 oil Ph3 DIC lens. Images were acquired as 0.45µM thick section using nearest neighbour parameters.

Viral replication kinetics. Viral replication kinetics was determined in Jurkat-TA cells. Briefly, approximately 5×10^5 cells were infected with viruses recovered from transfected HEK293T cells, with the same amount of reverse transcriptase activity (corresponding to an approximate MOI between 0.01 to 0.001, as judged by MAGI assay). Cells were maintained thereafter at a concentration of 10^6 viable cells/mL by appropriate dilution every 3 days at which times small aliquot (50 µL) of cell supernatant was recovered to perform a reverse transcriptase assay to detect virus production⁽³³⁾.

RESULTS

Rationale. To determine if it is possible to separate the tyrosine-based targeting (basolateral) signal from downmodulation (endocytosis) signal, alanine scan mutagenesis was performed to individually substitute amino acids. In addition to the four amino acids that are directly part of the YXXØ signal (YSPL), the 4 amino acids preceding the signal on its amino side (membrane proximal, VRQG) and the 3 distal amino acids following the signal at its carboxyl-terminal end (SFQ) were substituted by alanines. Although preliminary characterization of the substituted proteins was done using expression vectors for the envelope glycoprotein alone, some of the mutations which appeared most interesting and representative were then also introduced in the context of a proviral DNA. This contrasts with many reports where targeting signals are examined in the context of chimeric proteins for sake of simplicity and ease of detection; these proteins generally harbor the external and transmembrane domain of a well characterized "reporter" protein fused to portions of the intracytoplasmic domain of the viral glycoprotein. However, in order to assess the different properties associated with the envelope intracytoplasmic domain, we chose to proceed in the context of authentic viral envelope glycoproteins and with proviral constructs. This is especially of importance considering that endocytosis signal are known to be modulated by the presence of the Gag capsid proteins⁽²⁰⁾ or by the presence of the distal part of the intracytoplasmic domain of the envelope glycoprotein^(5,9,64,80).

Expression and maturation of mutant viral envelope glycoproteins.

The synthesis and stability of the different mutants of the viral envelope glycoprotein was first verified by transient expression following transfection of expression plasmids in HEK293T. Most mutant proteins were expressed at levels similar to the wild type, as judged by immunoblotting experiments (data not shown). Under these expression conditions, the viral envelope glycoprotein molecules were mostly detected under the form of gp160 precursor. There was apparently a small decrease in total accumulation for the P714A and L715A mutants and a further decrease for the mutants with an alanine substitution in amino acid 716 to 718. A pulse chase experiment was also performed by metabolic radiolabeling of the protein, followed by various period of incubation

with an excess of unlabeled amino acids and immunoprecipitation of the radiolabeled glycoprotein (Fig. 1). In each case, the gp160 protein was converted to gp120, although this was largely incomplete in the time period examined in this expression system which overexpresses the glycoprotein in absence of other viral proteins. Representative examples, including the mutants that will be more extensively characterized in the following sections, are presented. Again, there was only a small apparent decrease in the amount of P714A and L715A and a more important decrease in the amount of the S716A, F717A and Q718E mutants; all other mutants appeared to behave as the wild type in this assay.

Cell surface expression of mutant viral envelope glycoproteins.

Having established that the different mutant envelope viral glycoproteins are expressed at normal or near-normal levels, their presence at the cell surface was next examined to determine if their ability to be downmodulated from the cell surface was altered. Cell surface steady-state levels of the different mutant glycoproteins was thus examined by FACS analysis of transiently transfected HEK293T cells. Using this approach, all mutants were found to be expressed at the cell surface. Nevertheless, there was a clear increase in the cell surface levels of mutants G711 and Y712 (Fig. 2A). All the other mutants that were analyzed were essentially identical to the wild type. Representative examples are presented with only very slight changes (Q710A, S713A, P714A and L715A) in the surface expression (Fig. 2B).

Infectivity conferred by mutant viral envelope glycoproteins.

The ultimate test for the function of the viral envelope glycoprotein is its ability to promote viral infection by binding to cell surface receptor and allowing fusion of viral lipid envelope to host cell membrane. The different vectors for expression of mutant viral envelope glycoproteins were thus co-transfected with a complete envelope-negative provirus and the resulting trans-complemented viruses were harvested from transfected HEK293T cell supernatants. The specific infectivity of the different viruses was then examined with the classical MAGI assay, comparing levels of reverse transcriptase activity with the number of positively infected cells, via transactivation of β -galactosidase expression in the reporter cells. Compared to the wild type virus, there was an apparently lower infectivity for viruses harboring substitution of amino acids in a membrane-proximal

position, amino acids 708-711, but it was only a modest change, these viruses exhibiting a range of infectivity varying between 60% and 75% compared to the wild type (Fig. 3). There was no apparent change in infectivity for the different mutants located after the tyrosine-based motif (amino acid 716-718) nor with the amino acids 713 and 714 (the SP amino acids of the YXXØ motif). The decrease in infectivity was similar to that of the membrane-proximal residue in the case of the leucine-715 residue, the hydrophobic Ø in YXXØ. The most apparent change was noticed with substitution of the tyrosine residue itself with an infectivity that was still, however, at least 40% that of the wild type.

Polarized viral release. Since the different forms of envelope glycoprotein appear to promote normal or near normal infectivity, they are thus incorporated to the virions and could be examined for their ability to target virus budding to the basolateral surface of polarized epithelial cells. A protocol was previously established to determine if a given viral envelope glycoprotein is able to target budding of HIV virions at the apical or basolateral domains of the plasma membrane of polarized epithelial cells⁽³⁶⁻³⁸⁾. Expression vectors encoding each of the mutant alanine-substituted glycoprotein were co-transfected with an envelope-negative provirus DNA; initiator AUG was mutated and a deletion at the beginning of the gene results in a frameshift to ensure that there is no synthesis of the glycoprotein from the provirus DNA. Plasmids were introduced by transfection in either a polarized monkey epithelial cell line (Vero C1008) or in Madin-Darby canine kidney cells (MDCK), two standard cellular models previously used in the study of retroviral polarized budding with similar results^(4,16,36,37,53). Both cell types were grown onto semipermeable filters and viruses were recovered and quantitated by immunoassay, as described in Materials and Methods. At three days post transfection, cells were polarized and significant differences in the ratio of released virus from apical and basolateral surfaces was observed between wild type and the Y712S mutant. Given that similar results were obtained with both Vero C1008 and MDCK cells, analysis was performed with pooled results independently of the cell line. As previously shown, substitution of the tyrosine residue at position 712 in YXXØ abolishes basolateral targeting of virus budding; as a result, HIV virions were released in similar amount through both apical and basolateral domains of the plasma membrane. Substitution of most amino acids surrounding the tyrosine in or

around the YXXØ motif (R709A, Q710A, S713A, P714A, L715A, S716A) also abolished basolateral targeting, with statistically significant difference between the apical/basolateral ratio observed with these mutants compared to the wild type virus (0.024, using the non-parametric Mann-Whitney test). The most membrane proximal (V708A) apparently retained partial basolateral targeting while only the G711A immediately preceding the tyrosine-based motif retained normal, or even most complete, basolateral targeting of viral budding. There was an apparent reversal of polarization in the case of Q710A. Since there was an important variation from experiments to experiments with this particular mutant, the only conclusion is that basolateral targeting of viral budding was lost with this mutant.

Expression of mutant envelope glycoproteins at the surface of infected cells. Following the characterization by transient expression of the different mutants, the analysis was pursued for some of the mutants in the context of provirus DNA after subcloning of the appropriate mutated fragments, as described in Materials and Methods. Analysis of cell surface expression of mutant Env glycoproteins in a context of an infectious proviral clone is more likely to be representative given that Gag protein, which are known to influence Env internalization, are co-expressed. The wild type proviral construct was thus compared with the Y712S mutant that has lost both polarized targeting of virus budding and endocytic signal for recycling of the viral envelope glycoprotein from the cell surface. Additional mutants Q710A, G711A, S713A, P714A and L715A were also examined; these last six mutants have lost either polarized budding or endocytic recycling in the previous transient expression assays. Human Jurkat T-cells line was used for this analysis using transfection with cloned proviral DNAs, as in previous report⁽¹⁹⁾. Since the virus propagates in these cells, all cells were positive at time of analysis; a narrow peak with relatively uniform level of cell surface expression of the envelope glycoprotein was thus observed in cells infected with each of the viruses (Fig.5). There was only small variations between mutants. Interestingly, only mutant G711A, that had the highest cell surface level in previous transient expression experiment, showed an increased expression at the surface of infected cells (Fig.5A). Most other mutants had a slightly reduced expression (Fig.5B), that may reflect their slightly altered expression or turnover, as shown by pulse chase analysis (Fig.1). Differences were small but appeared reproducible from experiments to experiments.

Polarized transport of mutant viral envelope glycoproteins in epithelial cells. Having shown that the different mutant viral glycoproteins are expressed at the cell surface of transfected or infected cells, their distribution at either the apical or basolateral domain of polarized epithelial cells was examined. We took advantage of our recent establishment of a Madin-Darby canine kidney cell line expressing both the receptor, CD4, and co-receptor, CXCR4, for T-tropic HIV-1 strains (manuscript under revision⁽¹⁴⁾). These cells were thus infected with the different viruses and processed for immunofluorescence detection of viral envelope glycoprotein exposed at the cell surface. With the wild type envelope glycoprotein, there was no fluorescence when the antibody was applied at the apical cell surface while prior treatment with chelating agent to disrupt tight junctions allowed detection of the envelope glycoprotein (Fig.6). The fluorescence appeared to be concentrated at the periphery of the cells, consistent with the pattern usually seen with basolaterally targeted proteins. In contrast, substitution of the critical tyrosine residue of the tyrosine based motif (tyrosine 712) abolished this targeting; the envelope glycoprotein was detectable when the antibody was applied onto the apical surface. However, the pattern changed with addition of the chelating agent, allowing the additional detection of the basolateral protein at the periphery of the cell (Fig.6). A similar pattern, indicative of loss of polarized targeting of the viral envelope glycoprotein, was observed with most other mutants, S713A and P714A are presented as representative examples in Fig.6. However both mutants Q710A and G711A retained a wild type phenotype (Fig. 6), although the Q710A substitution was found to abolish basolateral targeting of viral particles budding and release; this point will be further discussed below.

Intracellular distribution of capsid proteins. In another set of experiments, the p24-Gag capsid protein was examined in order to determine if a change in its subcellular distribution could be correlated with targeting of viral assembly toward the basolateral surface. In this model of polarized epithelial cells, the p24 capsid protein exhibited a punctate distribution when the wild type envelope glycoprotein was present (Fig. 7). Of all 5 mutants examined, only the G711A mutant retained the wild type pattern of intracellular distribution (Fig.7); this mutant being the only one that retained both polarized targeting of the envelope glycoprotein itself, and polarized virus budding. The Y712S mutant, as well as all other mutants, the S713A and P714A mutants are again presented as

representative examples, exhibit a diffuse distribution of the Gag p24 protein inside the cells (Fig.7). The Q710A mutant was unusual since it presented the phenotype of a mutant devoid of polarization signal, as expected from the results of polarized budding presented in Fig. 4, despite the fact that the envelope glycoprotein present at the cell surface was restricted to the basolateral domain (Fig.6).

Replicative potential of the different mutants. The mutant glycoproteins were incorporated to virions and conferred infectivity to free virions in the single-round MAGI infectivity assay. In order to further establish their replicative potential, under conditions of a propagation assay, human cultured Jurkat T lymphocytes were then used. Following infection at low multiplicity of infection, there was similar propagation of wild type and mutant viruses (Fig. 8). Kinetic and final values appear the same for all viruses in the limit of experimental variation. However, an increased propensity to form syncytia, especially those of larger size, was significantly augmented in mutants Y712S and G711A. This increased fusogenic activity was also previously observed in transfection experiments of Jurkat cells but there was no significant consequences on cell viability or cell growth curves between the different virus-infected cells (data not shown).

DISCUSSION

The intracytoplasmic, membrane-proximal, tyrosine-based YXXØ motif is strongly conserved among HIV-1 virus isolates as well as between different retroviral envelope glycoproteins. However, given the complexity of the intracytoplasmic domain of lentiviruses, such as HIV-1, its exact role and importance could well be more complex in such viruses. A prerequisite for further studies and understanding of the importance of this motif was to separate the two phenotypes that are well-known to be associated with the motif, namely (i) endocytic internalization of the envelope glycoprotein from the cell surface and (ii) basolateral targeting of the viral envelope glycoprotein and of viral budding in cultured polarized epithelial cells.

The first phenomenon could likely affect cytopathic effects, by allowing more or less extensive accumulation of the glycoprotein at the cell surface with resulting formation of syncytia. It was also suggested to be of importance in controlling recognition by the immune system, by limiting the amount of viral glycoprotein that is exposed to immune recognition^(39,40). Accordingly, an increase in neutralizing antibody response, and to a lower extent in the CD8 T-cell response, was observed in mice inoculated with a DNA construct encoding an envelope glycoprotein with a substitution of the tyrosine, compared to the wild type construct^(10,80).

When discussing the exact influence that the basolateral targeting can have on HIV pathogenesis, different considerations must be taken into account. In other viruses, such as Sendai and Measles viruses, the basolateral targeting in epithelial cells clearly affects pathogenesis. However, the importance of epithelial cells in the multiplication and pathogenesis of HIV is still debated but often considered to be minimal. Nevertheless, targeting at the basolateral surface could reflect the presence of a targeting motif that is interpreted by different cell types, thus resulting in a polarized distribution at the cell surface of non-epithelial cells. In our laboratory, such a targeting of virus budding at a distinct crescent-shaped pole of infected lymphocytes was previously shown to be dependent of the tyrosine-based motif and could affect cell-to-cell viral transmission⁽¹⁹⁾. This could well affect the propagation of the virus between infected and uninfected cells *in vivo*. Numerous data presented by the group of D.M. Phillips have, in fact, confirmed polarized targeting of HIV release from mononuclear cells (lymphocytes, monocytes, macrophages) and lead the authors to suggest the importance of this phenomenon in viral transmission at mucosal (vaginal or rectal) surfaces, by concentrating viruses at intercellular interface, a phenomenon that may also somewhat protect the virus from neutralizing antibodies^(8,54-56,69,70). Not only could polarization of budding in mononuclear cells be important in this context, but also in viral propagation from cells to cells following initial viral transmission. The importance of the YXXØ motif in this context has been shown *in vitro* in the case of HIV-1 or HTLV-I^(18,19), and may be even more important in the presence of the immune system *in vivo*. Interestingly, in contrast to the increased latency observed in SIV-inoculated animals, latency was not altered in MuLV-inoculated animals when the tyrosine was substituted in the tyrosine-based

motif⁽¹⁶⁾. Since MuLV envelope glycoprotein does not harbor an endocytosis signal^(16,24), this suggests that alteration of endocytosis could be an important determinant in the latency, or virulence, of retroviral-induced disease, as observed for SIV, while polarization probably affects the ability to spread in different tissues. The lack of requirement for an endocytosis signal in MuLV could be explained by the presence of the R-peptide that prevents fusogenic activity of the glycoprotein at the cell surface⁽⁵⁸⁾, thus probably alleviating the necessity for downmodulation.

A prerequisite to further clarify the relative importance of endocytosis vs polarization, as conferred by the tyrosine-based motif, was thus to separate these two signals. Although both signals necessitate the presence of the critical tyrosine 712 residue, our working hypothesis was that it should be possible to resolve the two functions by changing the surrounding sequence context. This was achieved in the context of the HIV-1 glycoprotein.

First, the substitution of glycine 711, immediately preceding the tyrosine-based motif, clearly maintained polarized targeting at the basolateral surface, either when the distribution of the envelope was directly examined by immunofluorescence or when the budding of the virus was examined by release of p24 capsid protein from filter-grown cells. The same mutation resulted in an increased expression at the cell surface suggesting a loss of the endocytic motif by this substitution and thus separation of the two functions of the tyrosine-based motif. The decreased endocytosis with G711A is consistent with previous reports by other groups showing decreased endocytosis of HIV-1 envelope glycoprotein expressed in the absence of capsid proteins⁽⁷⁾ or of chimeric glycoprotein containing the intracytoplasmic domain of simian immunodeficiency glycoprotein⁽⁹⁾. Interestingly, this substitution appeared to affect steady-state level of the envelope glycoprotein even in the context of a complete provirus while the effect of the Y712S substitution was essentially masked in this context, while evident in transient expression using 293T cells. Masking of the endocytosis signal by the presence of capsid proteins is a well-known phenomenon⁽²⁰⁾. However, this phenomenon is probably largely cell-type dependent since we were previously able to demonstrate the importance of the signal in other cells⁽¹⁹⁾. Analysis of intracellular distribution of capsid (p24) protein in polarized epithelial

cells revealed that a targeting of envelope glycoprotein also affect subcellular distribution of capsid proteins, this gives further credential to the idea that interaction between these proteins can occur inside the cell (see for examples:^(65,66,76)). This specific subcellular distribution was clearly lost in all other mutants that have lost polarized targeting of virus budding, stressing the importance of the region surrounding the tyrosine-based motif in the intracytoplasmic domain of the envelope glycoprotein.

Losing the endocytic potential increased syncytium formation but did not appear to significantly increase the total cytopathic effect resulting from viral multiplication, as judged by similar cell growth curves (data not shown), nor did it seem to affect viral replication per se. The small decrease of viral infectivity observed in single-cycle infectivity assay with some mutants, could be due to differences between the P4-R5 cell line used in infectivity assay and the Jurkat cells; differences between different infectivity assay were previously noted (see for example:⁽¹²⁾).

Second, different mutants such as (S713A, P714A) lost their targeting to basolateral surface, as evidenced by: i) a loss of polarized virus budding, ii) altered targeting of the envelope glycoprotein at the cell surface, and iii) altered intracellular distribution of capsid (p24) proteins. In contrast, these mutants exhibited similar, or even slightly reduced, expression at the cell surface, supporting the idea that they are not affected in their endocytic potential. These different mutants thus separate the endocytosis signal from the basolateral targeting signal in an opposite manner to that of G711A. These data also suggest that the polarization signal is more dependent of the overall structure of the intracytoplasmic domain while the endocytic signal is more restricted in its sequence context requirements but clearly encompasses the glycine residue adjacent to the tyrosine.

The Q710A mutant represents an intermediate phenotype since polarized transport of the viral envelope glycoprotein at the basolateral membrane surface was retained while polarization of virus budding appeared to be lost. With this mutant, the punctate pattern observed for intracellular p24 capsid protein was also lost. These data are most easily interpreted by a loss of interaction between the two viral components (Env and capsid), resulting in concomitant loss of

polarized virus budding. Interestingly, this amino acid at position 710 was found to be variable among reported HIV isolates and in our own preliminary study of primary viral isolates (data not shown). Since all other amino acids position in this region are strictly conserved, this supports the idea that both endocytosis and targeting function of the tyrosine-based motif are of importance in the human host.

There is some discrepancies in the literature concerning the importance of the tyrosine-based motif in retrovirus infectivity and replication in cultured cells, although most studies suggest that the motif is not directly required to maintain virus infectivity^(13,16,17,19,22,36,38,77). The discrepancies probably result in part from the different backbone of virus used, harboring different set of accessory proteins; the data also suggest that the importance of the tyrosine-based motif on viral infectivity could vary depending on the cell type or mode of viral propagation. The availability of different well-characterized mutants affected in either endocytosis, basolateral targeting, or both, could allow to pursue the studies in different cell types to establish the importance of the motif in viral replication or propagation, cell-free or cell-mediated, either alone or in competitive conditions. Different evidence indicate that the tyrosine-based motif affects cell-to-cell viral transmission in HIV-1⁽¹⁹⁾, and HTLV-I⁽¹⁸⁾. Also, it has been observed in both SIV⁽²²⁾ and MuLV (unpublished observations) that viruses altered in their tyrosine-based motif, although they replicate normally when used to infect by themselves, are at a selective disadvantage when they are used in co-infection with wild type virus.

The “molecular dissection” of the dual polarization-endocytosis function of the HIV-1 tyrosine-based motif should help to orient future studies using animal models; in addition to the SIV/macaque model⁽²²⁾, the murine leukemia virus (MuLV)/mouse model⁽¹⁶⁾ could be adapted for these studies using chimeric viruses harboring sequences of the intracytoplasmic domain of HIV in a MuLV backbone. As recent data have stressed the importance of the tyrosine-based motif of HIV envelope glycoprotein in the modulation of its antigenic properties^(10,80), these studies should also help to further optimize the envelope gene for the design of better vaccination strategies in our fight against the AIDS pandemic.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Carole Danis for expert technical support conducing to smooth operation of the Lemay's laboratory, as well as Johanne Mercier and Nicole Rougeau for expert technical support in the Cohen's team. We thank Serge Sénéchal for his help with FACS analysis and Dr Jacques Thibodeau (Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal) for his efforts in maintaining this facility fully operational. We thank Gary Pignac-Kobinger for his initial participation to site-directed mutagenesis and Mighel Chagnon (Département de Mathématiques et Statistiques, Université de Montréal) for statistical analysis. We thank Robert Lodge, Guillermo Cervantes-Acosta and Frederick Freund for numerous helpful discussions at the beginning of this work.

This work was supported by a Canadian Institute for Health Research (CIHR) operating and group grant, a Fonds pour les Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) group grant and a financial support from the CANVAC network in the Canadian network of centers of excellence, all to G.L. and É.A.C. G.L. was the recipient of a Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) senior scholarship during early part of this work and É.A.C. is the recipient of a Canada Research Chair in Human Retrovirology. We also thank the Faculty of graduate studies of Université de Montréal for partial financial support to M.W.

REFERENCES

1. **Alfsen, A., H. Yu, A. Magerus-Chatinet, A. Schmitt, and M. Bomsel.** 2005. HIV-1-infected Blood Mononuclear Cells Form an Integrin- and Agrin-dependent Viral Synapse to Induce Efficient HIV-1 Transcytosis across Epithelial Cell Monolayer. *Mol Biol Cell* **16**:4267-4279.
2. **Aroeti, B., P. A. Kosen, I. D. Kuntz, F. E. Cohen, and K. E. Mostov.** 1993. Mutational and secondary structural analysis of the basolateral sorting signal of the polymeric immunoglobulin receptor. *J Cell Biol* **123**:1149-1160.
3. **Arrighi, J. F., M. Pion, E. Garcia, J. M. Escola, Y. van Kooyk, T. B. Geijtenbeek, and V. Piguet.** 2004. DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp Med* **200**:1279-1288.
4. **Ball, J. M., M. J. Mulligan, and R. W. Compans.** 1997. Basolateral sorting of the HIV type 2 and SIV envelope glycoproteins in polarized epithelial cells: role of the cytoplasmic domain. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**:665-675.
5. **Berlioz-Torrent, C., B. L. Shacklett, L. Erdtmann, L. Delamarre, I. Bouchaert, P. Sonigo, M. C. Dokhelar, and R. Benarous.** 1999. Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J Virol* **73**:1350-1361.
6. **Boehm, M., and J. S. Bonifacino.** 2001. Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* **12**:2907-2920.
7. **Boge, M., S. Wyss, J. S. Bonifacino, and M. Thali.** 1998. A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor. *J Biol Chem* **273**:15773-15778.

8. **Bourinbaiar, A. S., and D. M. Phillips.** 1991. Transmission of human immunodeficiency virus from monocytes to epithelia. *J Acquir Immune Defic Syndr* **4**:56-63.
9. **Bowers, K., A. Pelchen-Matthews, S. Honing, P. J. Vance, L. Creary, B. S. Haggarty, J. Romano, W. Ballensiefen, J. A. Hoxie, and M. Marsh.** 2000. The simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein contains multiple signals that regulate its cell surface expression and endocytosis. *Traffic* **1**:661-674.
10. **Bu, Z., L. Ye, A. Vzorov, D. Taylor, R. W. Compans, and C. Yang.** 2004. Enhancement of immunogenicity of an HIV Env DNA vaccine by mutation of the Tyr-based endocytosis motif in the cytoplasmic domain. *Virology* **328**:62-73.
11. **Cereijido, M., E. S. Robbins, W. J. Dolan, C. A. Rotunno, and D. D. Sabatini.** 1978. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol* **77**:853-880.
12. **Cervantes-Acosta, G., E. A. Cohen, and G. Lemay.** 2001. Human Jurkat lymphocytes clones differ in their capacity to support productive human immunodeficiency virus type 1 multiplication. *J Virol Methods* **92**:207-213.
13. **Cervantes-Acosta, G., R. Lodge, G. Lemay, and E. A. Cohen.** 2001. Influence of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein YXXL endocytosis/polarization signal on viral accessory protein functions. *J Hum Virol* **4**:249-259.
14. **Cervantes-Acosta, G., M. Welman, F. Freund, É. A. Cohen, and G. Lemay.** 2005. CD4/CXCR4 co-expression allows productive human immunodeficiency virus type 1 infection in canine kidney MDCK cells: effect of Vpu and Nef in polarized epithelial cells. *Virus Res* **In press**.
15. **Compans, R.** 1995. Virus entry and release in polarized epithelial cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **202**:209-219.

16. **Danis, C., J. Deschambeault, S. Do Carmo, E. A. Cohen, E. Rassart, and G. Lemay.** 2004. The tyrosine-based YXXO targeting motif of murine leukemia virus envelope glycoprotein affects pathogenesis. *Virology* **324**:173-183.
17. **Day, J. R., C. Munk, and J. C. Guatelli.** 2004. The membrane-proximal tyrosine-based sorting signal of human immunodeficiency virus type 1 gp41 is required for optimal viral infectivity. *J Virol* **78**:1069-1079.
18. **Delamarre, L., C. Pique, A. R. Rosenberg, V. Blot, M. P. Grange, I. Le Blanc, and M. C. Dokhelar.** 1999. The Y-S-L-I tyrosine-based motif in the cytoplasmic domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope is essential for cell-to-cell transmission. *J Virol* **73**:9659-9663.
19. **Deschambeault, J., J. P. Lalonde, G. Cervantes-Acosta, R. Lodge, E. A. Cohen, and G. Lemay.** 1999. Polarized human immunodeficiency virus budding in lymphocytes involves a tyrosine-based signal and favors cell-to-cell viral transmission. *J Virol* **73**:5010-5017.
20. **Egan, M. A., L. M. Carruth, J. F. Rowell, X. Yu, and R. F. Siliciano.** 1996. Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein. *J Virol* **70**:6547-6556.
21. **Einfeld, D.** 1996. Maturation and assembly of retroviral glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**:133-176.
22. **Fultz, P. N., P. J. Vance, M. J. Endres, B. Tao, J. D. Dvorin, I. C. Davis, J. D. Lifson, D. C. Montefiori, M. Marsh, M. H. Malim, and J. A. Hoxie.** 2001. In vivo attenuation of simian immunodeficiency virus by disruption of a tyrosine-dependent sorting signal in the envelope glycoprotein cytoplasmic tail. *J Virol* **75**:278-291.
23. **Gabuzda, D. H., A. Lever, E. Terwilliger, and J. Sodroski.** 1992. Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J Virol* **66**:3306-3315.

24. **Grange, M. P., V. Blot, L. Delamarre, I. Bouchaert, A. Rocca, A. Dautry-Varsat, and M. C. Dokhlar.** 2000. Identification of two intracellular mechanisms leading to reduced expression of oncoretrovirus envelope glycoproteins at the cell surface. *J Virol* **74**:11734-11743.
25. **Heilker, R., M. Spiess, and P. Crottet.** 1999. Recognition of sorting signals by clathrin adaptors. *Bioessays* **21**:558-567.
26. **Igakura, T., J. C. Stinchcombe, P. K. Goon, G. P. Taylor, J. N. Weber, G. M. Griffiths, Y. Tanaka, M. Osame, and C. R. Bangham.** 2003. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* **299**:1713-1716.
27. **Johnson, D. C., and M. T. Huber.** 2002. Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *J Virol* **76**:1-8.
28. **Jolly, C., K. Kashefi, M. Hollinshead, and Q. J. Sattentau.** 2004. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med* **199**:283-293.
29. **Jolly, C., and Q. J. Sattentau.** 2005. Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity. *J Virol* **79**:12088-12094.
30. **Kimpton, J., and M. Emerman.** 1991. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated b-galactosidase gene. *J Virol* **66**:2232-2239.
31. **Kräusslich, H.-G., and R. Welker.** 1996. Intracellular transport of retroviral capsid components. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**:25-63. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**:25-63.
32. **LaBranche, C. C., M. M. Sauter, B. S. Haggarty, P. J. Vance, J. Romano, T. K. Hart, P. J. Bugelski, M. Marsh, and J. A. Hoxie.** 1995. A single amino acid change in the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane molecule increases envelope glycoprotein expression on infected cells. *J Virol* **69**:5217-5227.

33. **Lee, M., K. Sano, F. Morales, and D. Imagawa.** 1987. Sensitive reverse transcriptase assay to detect and quantitate human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* **25**:1717-1721.
34. **Lehmann, L. E., W. Eberle, S. Krull, V. Prill, B. Schmidt, C. Sander, K. von Figura, and C. Peters.** 1992. The internalization signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase consists of the hexapeptide PGYRHHV. *Embo J* **11**:4391-4399.
35. **Lin, S., H. Y. Naim, and M. G. Roth.** 1997. Tyrosine-dependent basolateral sorting signals are distinct from tyrosine-dependent internalization signals. *J Biol Chem* **272**:26300-26305.
36. **Lodge, R., L. Delamarre, J. P. Lalonde, J. Alvarado, D. A. Sanders, M. C. Dokhelar, E. A. Cohen, and G. Lemay.** 1997. Two distinct oncornaviruses harbor an intracytoplasmic tyrosine-based basolateral targeting signal in their viral envelope glycoprotein. *J Virol* **71**:5696-5702.
37. **Lodge, R., H. Gottlinger, D. Gabuzda, E. A. Cohen, and G. Lemay.** 1994. The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J Virol* **68**:4857-4861.
38. **Lodge, R., J. P. Lalonde, G. Lemay, and E. A. Cohen.** 1997. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *Embo J* **16**:695-705.
39. **Marsh, M., and A. Pelchen-Matthews.** 2000. Endocytosis in viral replication. *Traffic* **1**:525-532.
40. **Marsh, M., A. Pelchen-Matthews, and J. A. Hoxie.** 1997. Roles of endocytosis in lentiviral replication. *Trends in Cell Biol* **7**:1-4.
41. **Matter, K., E. M. Yamamoto, and I. Mellman.** 1994. Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J Cell Biol* **126**:991-1004.

42. **McDonald, D., L. Wu, S. M. Bohks, V. N. KewalRamani, D. Unutmaz, and T. J. Hope.** 2003. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* **300**:1295-1297.
43. **Mellman, I., E. Yamamoto, J. Whitney, M. Kim, W. Hunziker, and K. Matter.** 1993. Molecular sorting in polarized and non-polarized cells: common problems, common solutions. *J Cell Science Suppl.* **17**:1-7.
44. **Moll, M., J. Pleuffer, H.-D. Klenk, S. Niewiesk, and A. Maisner.** 2004. Polarized glycoprotein targeting affects the spread of measles virus in vitro and in vivo. *J Gen Virol* **85**:1019-1027.
45. **Mostov, K. E., M. Verges, and Y. Altschuler.** 2000. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* **12**:483-490.
46. **Muth, T. R., and M. J. Caplan.** 2003. Transport protein trafficking in polarized cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**:333-366.
47. **Nakatsu, F., and H. Ohno.** 2003. Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct Funct* **28**:419-429.
48. **Nelson, W.** 2003. Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**:766-774.
49. **Newton, E. E., Z. Wu, and N. E. Simister.** 2005. Characterization of basolateral-targeting signals in the neonatal Fc receptor. *J Cell Sci* **118**:2461-2469.
50. **Ohno, H., R. C. Aguilar, D. Yeh, D. Taura, T. Saito, and J. S. Bonifacino.** 1998. The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. *J Biol Chem* **273**:25915-25921.
51. **Okada, H., J. Seto, N. McQueen, H. Klenk, R. Rott, and M. Tashiro.** 1998. Determinants of pantropism of the F1-R mutant of Sendai virus: specific mutations involved are in the F and M genes. *Arch Virol* **143**:2343-2352.

52. **Owens, R. J., and R. W. Compans.** 1989. Expression of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein is restricted to basolateral surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol* **63**:978-982.
53. **Owens, R. J., J. W. Dubay, E. Hunter, and R. W. Compans.** 1991. Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:3987-3991.
54. **Perotti, M. E., X. Tan, and D. M. Phillips.** 1996. Directional budding of human immunodeficiency virus from monocytes. *J Virol* **70**:5916-5921.
55. **Phillips, D. M., and A. S. Bourinbaier.** 1992. Mechanism of HIV spread from lymphocytes to epithelia. *Virology* **186**:261-273.
56. **Phillips, D. M., and X. Tan.** 1992. HIV-1 infection of the trophoblast cell line BeWo: a study of virus uptake. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**:1683-1691.
57. **Prill, V., L. Lehmann, K. von Figura, and C. Peters.** 1993. The cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase contains overlapping but distinct signals for basolateral sorting and rapid internalization in polarized MDCK cells. *Embo J* **12**:2181-2193.
58. **Rein, A., J. Mirro, J. G. Haynes, S. M. Ernst, and K. Nagashima.** 1994. Function of the cytoplasmic domain of a retroviral transmembrane protein: p15E-p2E cleavage activates the membrane fusion capability of the murine leukemia virus Env protein. *J Virol* **68**:1773-1781.
59. **Rodriguez-Boulan, E., G. Kreitzer, and A. Musch.** 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:233-247.
60. **Rodriguez-Boulan, E., and M. Pendergast.** 1980. Polarized distribution of viral envelope proteins in the plasma membrane of infected epithelial cells. *Cell* **20**:45-54.
61. **Rodriguez-Boulan, E., and D. Sabatini.** 1978. Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for study of epithelial polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**:5071-5075.

62. **Roth, M., J. Fitzpatrick, and R. Compans.** 1979. Polarity of influenza and vesicular stomatitis virus maturation in MDCK cells: lack of a requirement for glycosylation of viral glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**:6430-6434.
63. **Rothen-Rutishauser, B., F. K. Riesen, A. Braun, M. Gunthert, and H. Wunderli-Allenspach.** 2002. Dynamics of tight and adherens junctions under EGTA treatment. *J Membr Biol* **188**:151-162.
64. **Rowell, J. F., P. E. Stanhope, and R. F. Siliciano.** 1995. Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. *J Immunol* **155**:473-488.
65. **Sandrin, V., and F. L. Cosset.** 2006. Intracellular vs. cell surface assembly of retroviral pseudotypes is determined by the cellular localization of the viral glycoprotein, its capacity to interact with Gag and the expression of the Nef protein. *J Biol Chem.* **281**: 528-542.
66. **Sandrin, V., D. Muriaux, J. L. Darlix, and F. L. Cosset.** 2004. Intracellular trafficking of Gag and Env proteins and their interactions modulate pseudotyping of retroviruses. *J Virol* **78**:7153-7164.
67. **Sauter, M. M., A. Pelchen-Matthews, R. Bron, M. Marsh, C. C. LaBranche, P. J. Vance, J. Romano, B. S. Haggarty, T. K. Hart, W. M. Lee, and J. A. Hoxie.** 1996. An internalization signal in the simian immunodeficiency virus transmembrane protein cytoplasmic domain modulates expression of envelope glycoproteins on the cell surface. *J Cell Biol* **132**:795-811.
68. **Stephens, E. B., R. W. Compans, P. Earl, and B. Moss.** 1986. Surface expression of viral glycoproteins is polarized in epithelial cells infected with recombinant vaccinia viral vectors. *Embo J* **5**:237-245.
69. **Tan, X., R. Pearce-Pratt, and D. M. Phillips.** 1993. Productive infection of a cervical epithelial cell line with human immunodeficiency virus: implications for sexual transmission. *J Virol* **67**:6447-6452.

70. **Tan, X., and D. M. Phillips.** 1996. Cell-mediated infection of cervix derived epithelial cells with primary isolates of human immunodeficiency virus. *Arch Virol* **141**:1177-1189.
71. **Tashiro, M., N. McQueen, J. Seto, H. Klenk, and R. Rott.** 1996. Involvement of the mutated M protein in altered budding polarity of a pantropic mutant, F1-R, of Sendai virus. *J Virol* **70**:5990-5997.
72. **Tashiro, M., J. T. Seto, S. Choosakul, M. Yamakawa, H. D. Klenk, and R. Rott.** 1992. Budding site of Sendai virus in polarized epithelial cells is one of the determinants for tropism and pathogenicity in mice. *Virology* **187**:413-422.
73. **Terwilliger, E. F., E. A. Cohen, Y. C. Lu, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1989. Functional role of human immunodeficiency virus type 1 vpu. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5163-5167.
74. **Tucker, S., and R. Compans.** 1993. Virus infection of polarized epithelial cells. *Adv Virus Res* **42**:187-247.
75. **Uponder, M., L. Raj, and M. Weir.** 1995. Megaprimer method for in vitro mutagenesis using parallel templates. *Biotechniques* **18**:29-30, 32.
76. **Vincent, M. J., L. R. Melsen, A. S. Martin, and R. W. Compans.** 1999. Intracellular interaction of simian immunodeficiency virus Gag and Env proteins. *J Virol* **73**:8138-8144.
77. **West, J. T., S. K. Weldon, S. Wyss, X. Lin, Q. Yu, M. Thali, and E. Hunter.** 2002. Mutation of the dominant endocytosis motif in human immunodeficiency virus type 1 gp41 can complement matrix mutations without increasing Env incorporation. *J Virol* **76**:3338-3349.
78. **Yao, X. J., H. Gottlinger, W. A. Haseltine, and E. A. Cohen.** 1992. Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J Virol* **66**:5119-5126.
79. **Yao, X. J., R. A. Subbramanian, 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**:7032-7044.

80. **Ye, L., Z. Bu, A. Vzorov, D. Taylor, R. W. Compans, and C. Yang.** 2004. Surface stability and immunogenicity of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein: role of the cytoplasmic domain. *J Virol* **78**:13409-13419.
81. **Yuste, E., J. D. Reeves, R. W. Doms, and R. C. Desrosiers.** 2004. Modulation of Env content in virions of simian immunodeficiency virus: correlation with cell surface expression and virion infectivity. *J Virol* **78**:6775-6785.

FIG. 1. Expression of glycoprotein mutants. Each single-substitution mutants, or wild type envelope glycoprotein expression vector, were transiently expressed by transfection in HEK293T cells. Pulse metabolic radiolabeling was done for one hour, at 48 hours post-transfection, as described in Materials and Methods. Samples were taken at time 0, just following the labeling period, and after chase with non radioactive amino acids for 1, 3 or 6 hours, as indicated.

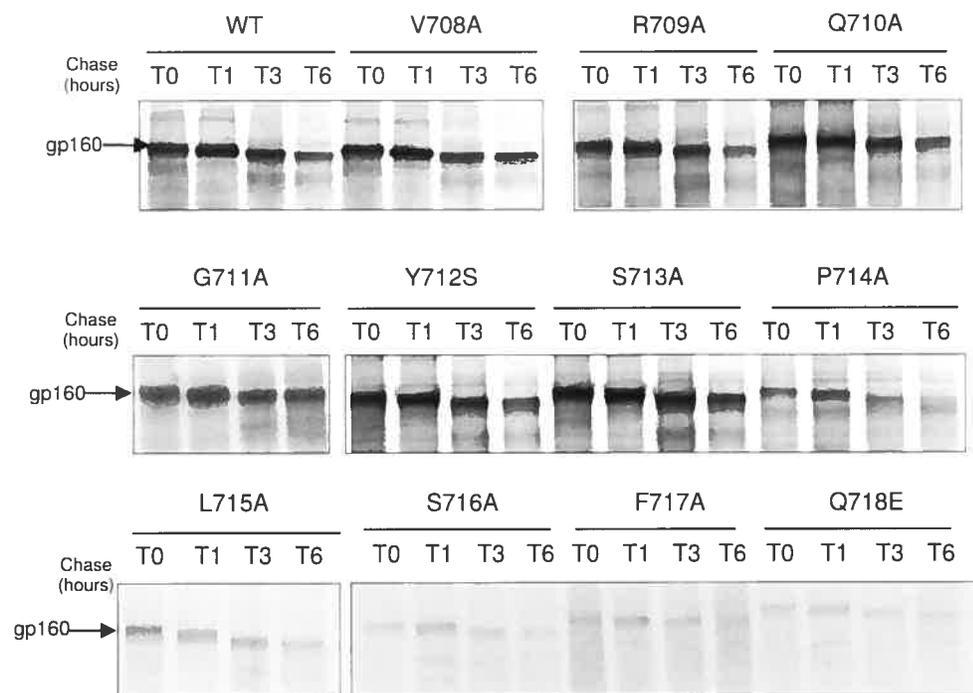


FIG.2. Expression of glycoprotein mutants at the cell surface of transfected cells. Single-substitution mutants were transiently expressed by transfection of expression vectors in HEK293T cells. Cells were processed for cell surface analysis by FACS analysis using a polyclonal anti-envelope antibody, as described in Materials and Methods. (A) Comparison between wild type, Y712S and G711A with non-transfected (mock) cells as negative control. (B) Comparison between wild type and representative mutants Q710A, S713A, P714A and L715A.

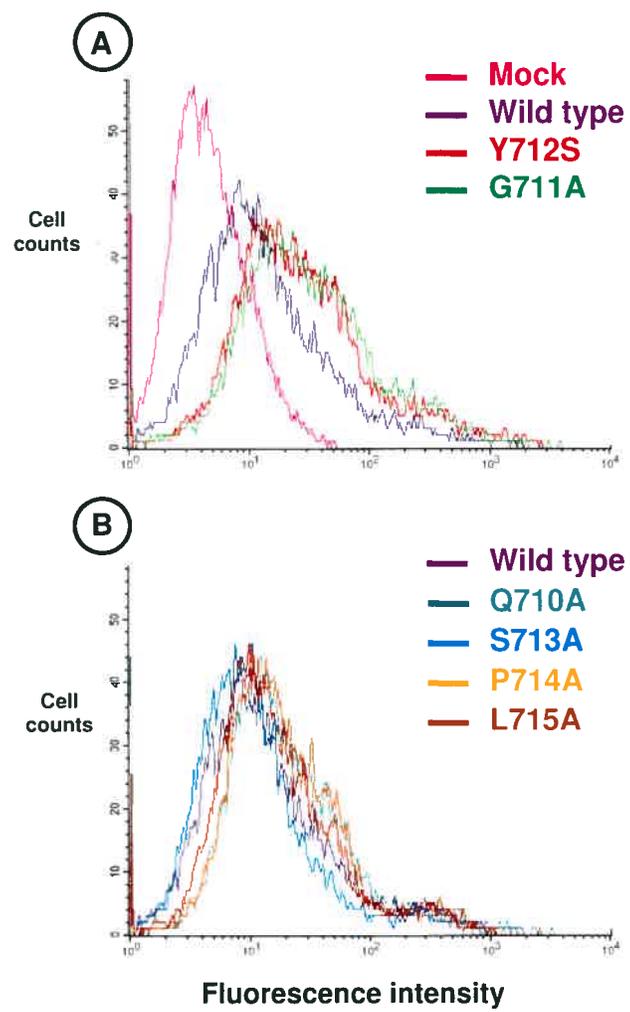
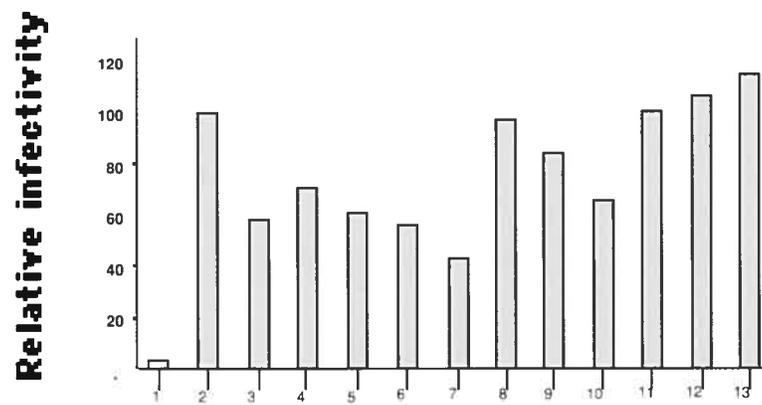
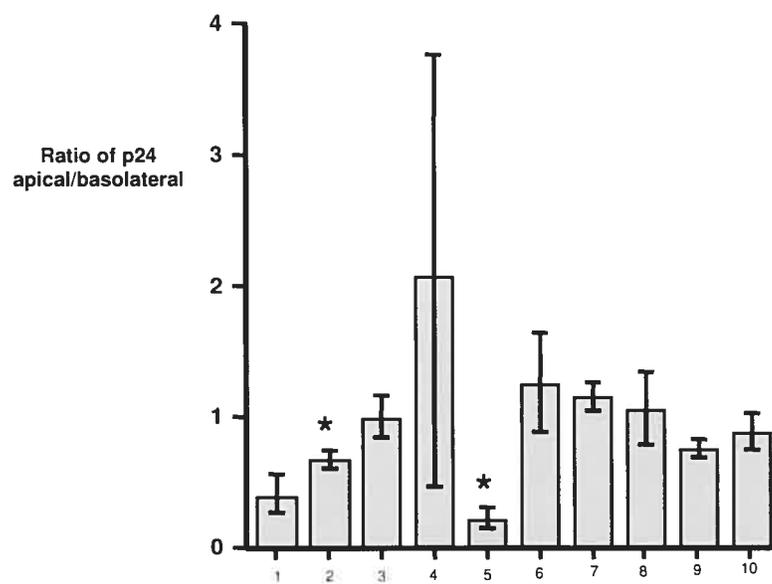


FIG.3. Infectivity conferred by the viral envelope glycoprotein in one-cycle assay. Viruses were produced in HEK293T cells by co-transfection of envelope expression vector with envelope-negative proviral DNA. Amounts of viral particles was measured by reverse transcriptase assay and identical amounts was applied onto MAGI (P4-R5) cells for infectivity assay, as described in Materials and Methods. Numbers are the mean of at least three independent experiments and two values for each virus with the value of the wild type envelope considered as 100%; standard error was less than 5%.



- | | |
|----------|-----------|
| 1) ENV - | 7) Y712S |
| 2) WT | 8) S713A |
| 3) V708A | 9) P714A |
| 4) R709A | 10) L715A |
| 5) Q710A | 11) S716A |
| 6) G711A | 12) F717A |
| | 13) Q718E |

FIG.4. Polarization of viral budding by glycoprotein mutants. Glycoprotein mutants in expression vectors were co-introduced in filter-grown polarized epithelial cells with envelope-negative cloned HIV provirus DNA. Apical and basolateral media were recovered and virus was quantitated using an ELISA immunoassay directed against the p24 capsid protein. Results are presented as the ratio of apical to basolateral value and are the mean of six (wild type and Y712S) or three (all other mutants) separate experiments with standard error of the mean. The mutants that are statistically identical to the wild type (according to the Mann Whitney test at 0.024) are indicated by an asterisk.



1) WT	6) Y712S
2) V708A	7) S713A
3) R709A	8) P714A
4) Q710A	9) L715A
5) G711A	10) S716A

FIG.5. Expression of glycoprotein mutants at the cell surface of infected lymphocytes. Cloned proviral DNA for each single-substitution mutant viruses were introduced in prepared by human lymphocytes Jurkat-TA cells by DEAE-dextran transfection procedure. Cells were processed for cell surface analysis by FACS analysis, 9 days post-transfection, using an anti-envelope polyclonal antibody, as described in Materials and Methods.

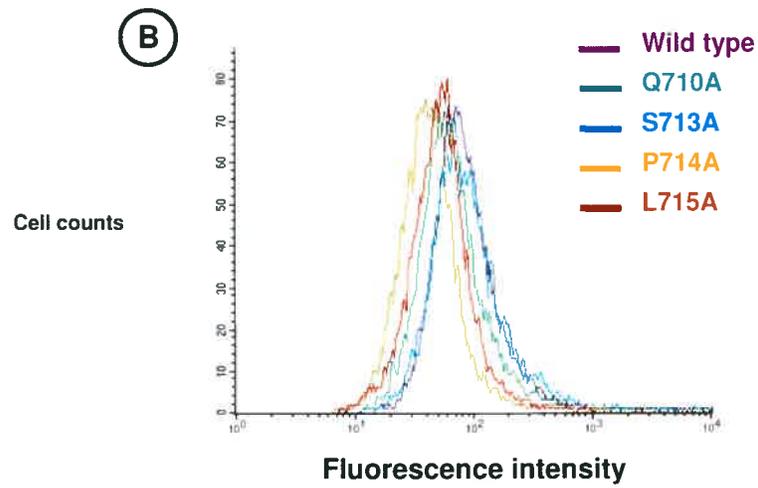
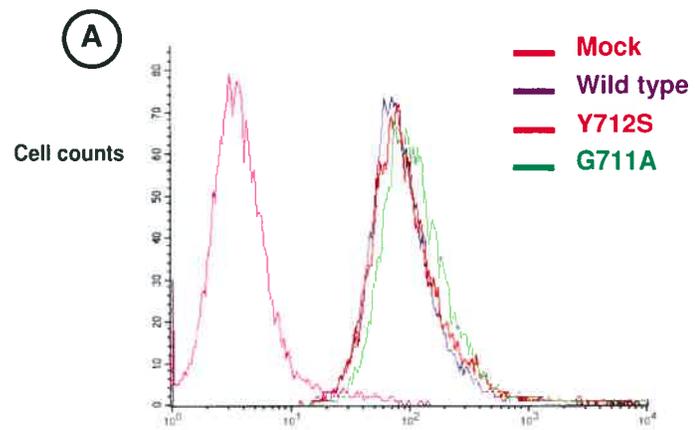


FIG.6. Localization of envelope glycoprotein mutants in infected MDCK cells. Polarized epithelial MDCK cells, that were engineered to express HIV-1 receptor/co-receptor were infected with viruses recovered from HEK293T cells transfected with wild type or mutant proviral DNA and processed for surface immunofluorescence, as described in Materials and Methods. In each case, antibody was bound to cells without (apical) or with (basolateral) prior EGTA treatment to allow access to the basolateral surface of the cells.

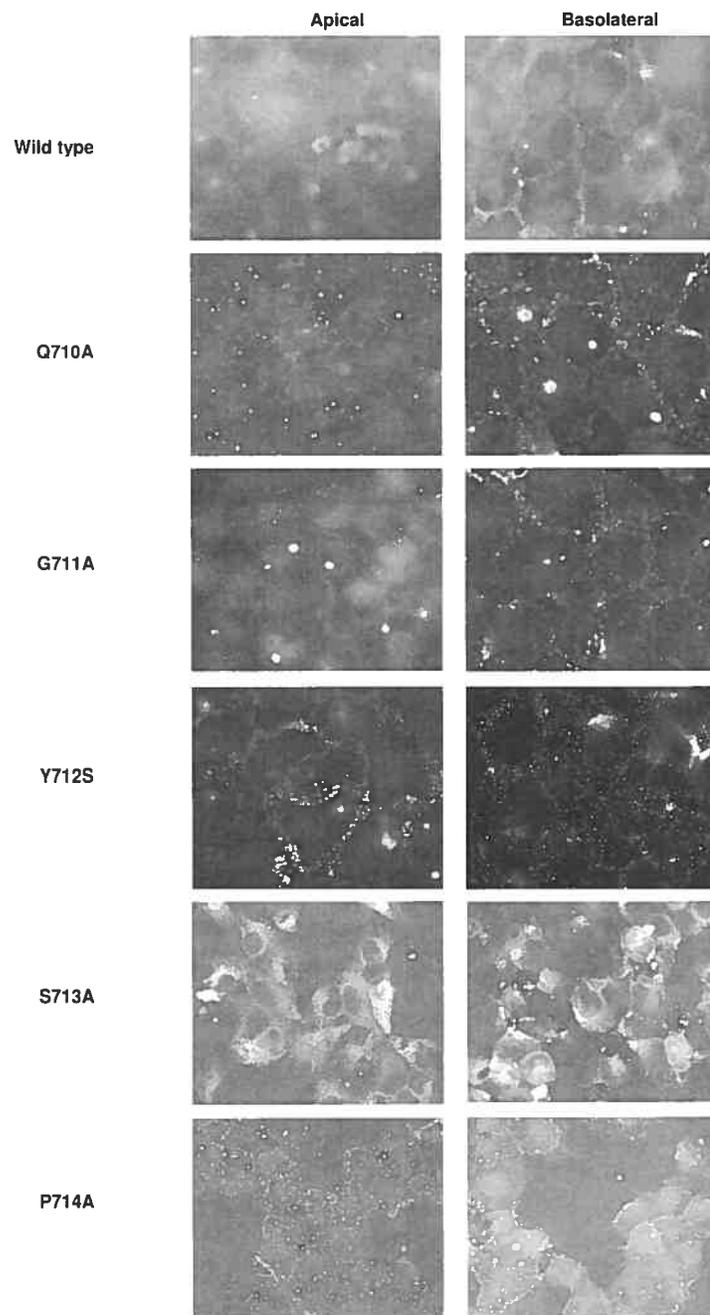


FIG.7. Subcellular localization of Gag-p24 capsid protein. MDCK-T4-R4 were infected with viruses produced from transiently-transfected HEK293T. Cells were processed for intracellular immunofluorescence for p24, by fixation and permeabilization, as described in Materials and Methods. Arrowheads point to some example of punctate distribution in wild type and G711A mutant.

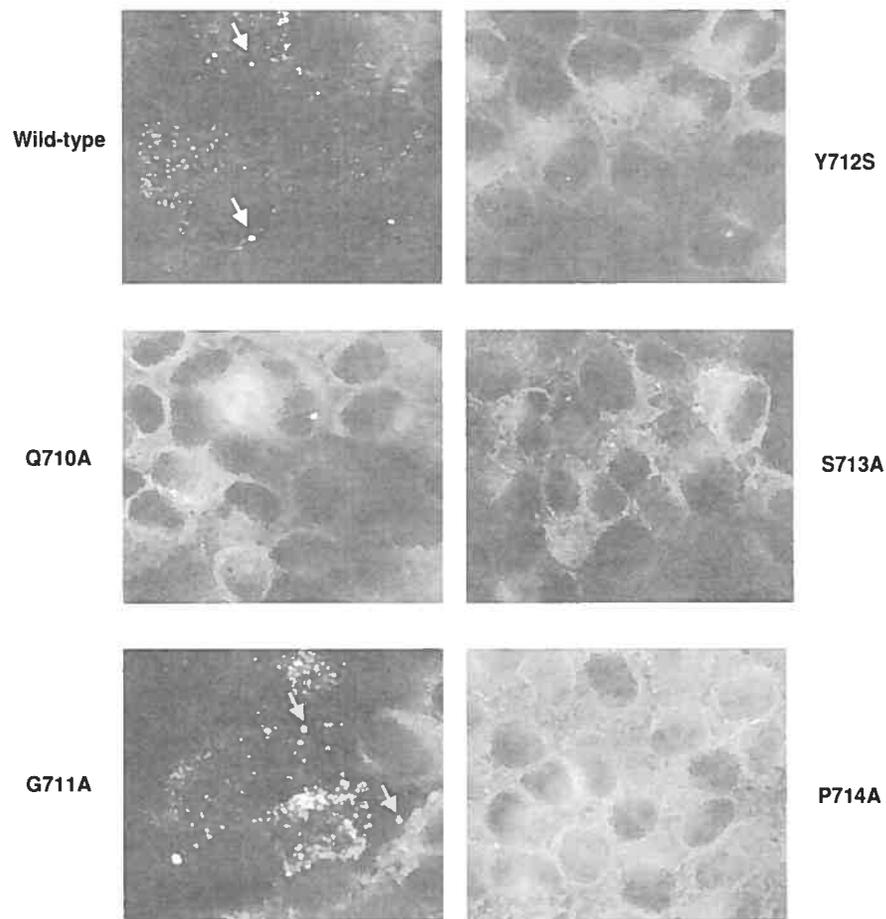
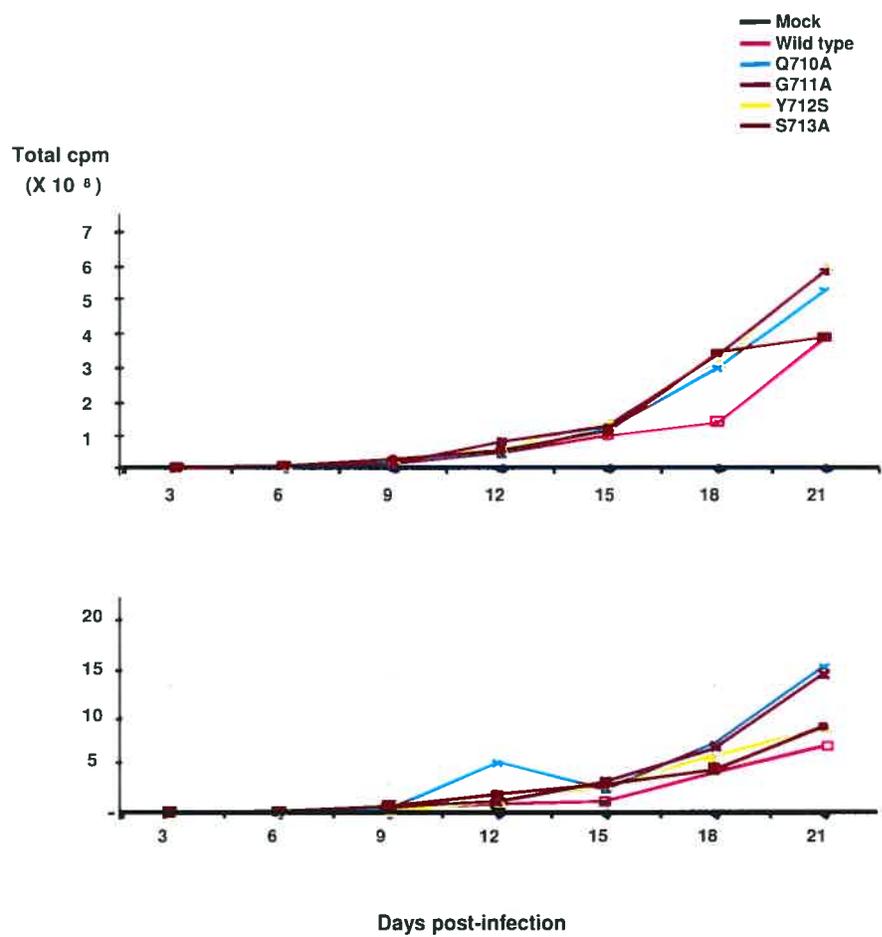


FIG.8. Replication of mutant viruses. Wild type or mutant proviral DNA were introduced in HEK293T to produce infectious viruses. Similar amounts of virions, as judged by their reverse transcriptase activity, was then applied onto CD4-positive Jurkat cells, as described in Materials and Methods. Replication kinetics was followed by development of reverse transcriptase activity released in the supernatant of infected cells. Results are presented as the average of two reverse transcriptase measurement. Two separate experiments are presented.



CHAPITRE 3 :

ARTICLE 2

Des résultats préliminaires ont permis d'établir qu'une délétion de l'acide aminé isoleucine en position 642 de l'ectodomaine (mutant $\Delta I642$) ou la substitution du domaine transmembranaire de la gp41 par celui de la protéine hémagglutinine (HA) du virus influenza (mutant TM-HA), enrayent tous deux l'infectivité virale. Le but de ce travail visait à déterminer si ces glycoprotéines mutantes pouvaient inhiber l'infectivité conférée par la glycoprotéine sauvage et par quel mécanisme. Cet article est en phase finale de préparation.

Two different forms of fusion-defective Trans-dominant negative mutants of HIV-1 transmembrane glycoprotein, gp41, can act as trans-dominant inhibitors of infectivity conferred by the wild type glycoprotein

MÉLANIE WELMAN¹ , GUY LEMAY¹ AND ÉRIC A. COHEN^{1,2*}.

¹Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7 et ²Unité de Rétrovirologie Humaine, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Québec, Canada H2W 1R7.

*Corresponding author. Mailing address: Unité de Rétrovirologie Humaine, Institut de Recherches Cliniques de Montréal, 110, avenue des Pins ouest, Montréal, Québec, Canada H2W 1R7. Phone: (514)-987-5804. Fax: (514)-987-5691. Electronic mail address: XXXXXXXXXX

ABSTRACT

Viral entry is a key step in the initiation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. This process is mediated by the viral glycoproteins. The surface subunit gp120 initiate the process by binding to the cell surface receptor CD4 and the chemokine coreceptors and after a conformational change the transmembrane subunit gp41 is able to mediate fusion between viral and target cell membranes. The implication of the ectodomain of gp41 in this process is well studied but many questions remain concerning the implication of the membrane-spanning domain (MSD) of gp41. We examined the role of this MSD by replacing it with the complete MSD of hemagglutinin protein of the influenza virus, creating a chimeric protein (TM-HA). We also included another mutant named Δ I642 which has a single amino acid deletion represented by an isoleucine residue in position 642 of the ectodomain of gp41, which was obtained in the course of previous unpublished studies and known to have lost the ability to infect due to a loss of protein maturation. We showed that even if TM-HA chimeric protein was cleaved to produce mature glycoproteins, it lost viral infectivity, as for mutant Δ I642. Both glycoprotein mutants were incorporated into viral particles and were able to bind to intracellular CD4, which suggested that fusion inhibition was post-CD4 binding. An entry assay using the β -lactamase-Vpr (BlaM) fusion protein showed that both virus mutants were unable to enter the cell, most probably due to an incapacity to a defect in fusogenic activity. We also showed that both mutant glycoproteins were dominant-negative mutants that abolished viral infectivity in presence of WT envelope by forming hetero-oligomers. This study showed that both changes, in the ectodomain or the MSD of gp41, can inhibit membrane fusion. These mutants could be interesting candidate in further therapy against HIV-1 infection.

INTRODUCTION

The process of viral entry is a key step in the initiation of human immunodeficiency virus type (HIV-1) infection. Binding between the viral envelope glycoprotein and the surface cellular receptor CD4 mediates attachment of the HIV-1 virion to the target cell^[1,2]. Viral envelope glycoproteins are synthesized as a precursor, gp160, in the endoplasmic reticulum, where they are folded, glycosylated and oligomerized to form homotrimers. The precursor is processed during transport through the Golgi apparatus by cellular convertases to yield the surface subunit gp120 which remain bound to the transmembrane subunit, gp41, by a noncovalent link. The mature envelope glycoprotein molecules present at the cell surface are incorporated into newly viral particle to produce an infectious virus. Surface subunit gp120 is responsible for the sequential binding of the glycoprotein spike to CD4 and the chemokine coreceptors, CCR5 and CXCR4, on the surface of target cells^[3]. These events lead to gp41 conformational changes that are crucial for membrane fusion process and viral entry.

Transmembrane subunit gp41 presents three domains: an ectodomain, a transmembrane domain and long intracytoplasmic domain^[4]. The contribution of the ectodomain of gp41 to membrane fusion was shown by many groups. This region of the protein harbors two conserved hepta repeats (N36 and C34) preceded by the fusion peptide. Three N-terminal helices form a trimeric coiled-coil structure and three C-terminal helices pack in the reverse direction into three hydrophobic grooves on the surface of the coiled-coil. It was shown that the helical-hairpin structure corresponds to the fusion-active conformation of gp41^[5-7]. A similar structure is commonly observed in the envelope glycoproteins of different viruses such as the influenza virus, the Ebola virus and the Moloney murine leukemia virus^[8-11]. Since the membrane anchor and the fusion peptide of gp41 ectodomain are embedded, respectively, in the viral and target cell membranes, the formation of the fusogenic hairpin structure results in the colocalization of the two membranes^[12-14]. Peptides derived from the N and C-terminal helical regions of

gp41 ectodomain are potent inhibitors of HIV-1 infection^[15]. C-peptide DP178^[16,17] latter called T-20 can effectively in suppressing HIV-1 replication^[18]. T-20 inhibits formation of the fusogenic six-helix bundle in a dominant-negative manner by binding to the exposed N-terminal coiled coil in the prehairpin intermediate^[5,19,20]. Alanine-scan analysis showed that certain amino acids present in the C-helix are important for stabilization of the six-helix bundle structure. Residue isoleucine 642 (Ile642) is one of the four bulky hydrophobic residues implicated in the maintenance of the structure and it was also shown that substitution of this amino acid by an alanine also impairs fusogenic activity by affecting gp120/gp41 association and gp160 processing^[21].

The membrane-spanning domain (MSD) of gp41 is not only responsible for anchoring the envelope glycoproteins on the lipid bilayer but it is also highly conserved among independent isolates of HIV-1. It was previously reported that the MSD is involved in membrane fusion but in those studies the glycoprotein also lacked the intracytoplasmic domain^[22, 23]. Other studies have examined the role of the membrane-anchoring domain of gp41 in viral glycoprotein function, glycoprotein incorporation and viral infectivity by substituting the entire transmembrane domain of HIV-1 gp41 by either the cell surface receptor CD4^[24] or the cellular glycoprotein CD22^[25]. These studies indicated that the entire membrane-anchoring domain of gp41 can be substituted by the transmembrane region of other membrane-anchored proteins, with no apparent similarities in sequence, without affecting incorporation of these chimeric glycoproteins to the viral particles, nor viral infectivity, suggesting that the membrane-anchoring region is not important for membrane fusion *per se*^[25]. More recently, another group showed that even if no resemblance was found between the MSD of HIV-1 gp41, CD22 and CD4 proteins they all had a common characteristic which resides in the presence of several glycine residues in the MSD. The presence of this residue is often found in the MSD of both cellular^[26] and viral proteins^[27,28]. HIV-1 gp41 is no exception since a glycine motif GXXXG was also identified in its MSD. However, individual alanine substitution of each glycine had no major affect on gp41 function. In the same study, the MSD was replaced by those of either cellular glycoporphin A or of vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein

(VSV-G); although both, also containing glycine residues and gp41 fusion activity was impaired^[29].

In the present study, the gp41 transmembrane glycoprotein was altered by either single amino acid deletion in a critical region of its ectodomain or by substitution of its membrane-anchoring region by that of influenza HA glycoprotein. Both forms of the protein were shown to be fusion defective and efficiently interfere with the fusogenic activity and infectivity conferred by the wild type glycoprotein. Although the exact reason for the fusion defect may differ, both the ectodomain and the anchoring domain-altered proteins likely inhibit activity of the wild type glycoprotein by forming inactive heterotrimer with the latter.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines. Human HEK293T cells expressing the large T antigen of SV40, allowing replication of plasmid harboring the SV40 replication origin and Human HeLa cells were used. MAGI CCR5 (P4-R5) cells used in the MAGI single-cycle infectivity assay were obtained from the NIH Aids Research and Reference Reagent program (cat # 3522). Human lymphocytic cells expressing CD4, Jurkat-TA, were also used. SV40 transformed human HEK293T cells, MAGI CCR5 and HeLa cells were maintained in Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotics (penicillin and streptomycin). The Jurkat CD4+ human lymphoid cell line was maintained in RPMI-1640 medium containing 15% FBS and 1% antibiotics. All cell lines were grown at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere and routinely tested for the absence of mycoplasma contamination using a PCR protocol, as recommended by the manufacturer (Stratagene, LaJolla, CA, USA).

Molecular constructs. The HXBH10 envelope-negative (HXBH10 env-) (*gag+*, *pol+*, *vif+*, *vpr*, *tat+*, *rev+*, *vpu+*, *env*, *nef-*) proviral construct of HIV-1 has been previously described [30, 31]. The HXBH10 proviral construct contains a stop codon at the initiation site of the *env* gene and a frameshift at the *KpnI* site (HXBH10 nucleotide position 5934 ; +1 = site of transcription initiation). The pSVIIIenv, a *tat*-truncated, *rev* and *env*-expressing plasmid^[4], was used to

express the HIV-1 wild type envelope glycoprotein and to construct the various mutant envelope glycoproteins. The pSVIIIenv Δ 726-856 plasmid which express a truncated envelope glycoprotein was a generous gift from Dana Gabuzda (Dana Farber cancer Institute, Harvard, Boston)^[4]. Plasmid expression vector for *Tat*, SV-CMV TAT, was used to trans-activate expression of *env* gene. SV-CMV CD4 WT was constructed by inserting a *Xba*I-*Xba*I cDNA fragment encoding CD4 into the corresponding sites of the expression vector SVCMVexpa as described previously^[32]. The CD4 fragment comes from the T4 LTR plasmid containing the CD4 cDNA derived from the pT4B expressor^[33]. The proviral plasmid DNA with a construct (pMM310) encoding Escherichia coli β -lactamase (BlaM) fused to the amino terminus of HIV-1 *Vpr* was generously given by Michael Miller (Merck Research Laboratories, West Point, Pennsylvania)^[34,35].

Mutagenesis in HIV gp41. The deletion of the single amino acid isoleucine 642 in the ectodomain of gp41, represented by mutant Δ I642 was obtained in the course of previous unpublished work. Mutagenesis, in order to insert the *Spe*I site in 5' and the *Hpa*I site in 3' in the region representing the transmembrane domain, was done using the megaprimer PCR-directed mutagenesis using *Pfu* polymerase (Stratagene)^[36]. These sites were created to permit complete substitution of the transmembrane domain of HIV-1 gp41 by the transmembrane domain of the influenza hemagglutinin. Mutagenic primers used were the following, with mutations underlined.

5'-GGCTGTGGTATATAAAAACTAGTTATAATG-3' (for *Spe*I site)

5'-CTTTCTATAGTTAACAGAGTTAGGC- 3' (for *Hpa*I site)

For chimeric protein TM-HA, the transmembrane nucleotide region of the influenza hemagglutinin HA-2^[37] was synthesized and the primers were hybridized by using a mix of 0.5 μ g of each primer. The primers were denatured at 90°C for 5 minutes and slowly cooled down to room temperature. The primers used were the following with underlined nucleotides representing the *Spe*I and *Hpa*I cloning sites at both ends of the transmembrane domain.

5'CTAGTTATCCTTGCCATTTATGCTACAGTAGCAGGATCCCTGTCACTGGCAA
TCATGATGGCTGGGATCTCTTTCTGGATGGTT-3' (forward primer)

5'AACCATCCAGAAAGAGATCCCAGCCATCATGATTGCCAGTGACAGGGATC
CTGCTACTGTAGCATAAATGGCAAGGATA-3' (reverse primer)

The *HindIII* to *XhoI* (HXBc2 nucleotide positions 7683 and 8439 ; +1 = initiation of transcription) fragment of each mutant was cloned into pSVIIIenv and they were all sequenced.

Accumulation and maturation of the mutated glycoproteins.

HEK293T cells were co-transfected with the SV-CMV TAT expressor and each of the mutant glycoprotein expression vectors using the classical calcium-phosphate co-precipitation procedure. Cells were lysed 48 hours post-transfection in RIPA buffer (25mM Tris-HCl pH 7.2, 5mM EDTA, 50mM sodium fluoride, 0.02% sodium orthovanadate, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% SDS, and a cocktail of protease inhibitors according to the manufacturer instructions (Roche Applied Science) frozen at -80°C and thawed once. Cells lysates were clarified by centrifugation in a refrigerated Sorvall centrifuge. Western blot analysis was done on an aliquot of the lysate using an anti-gp160/gp120 polyclonal antibody from the NIH AIDS Research and Reference Reagent program (Cat#188), diluted 1:7500. An anti-goat HRPO, diluted 1:3000, was used as secondary antibody and proteins were revealed on a 8% SDS-PAGE by the ECL (enhanced chemoluminescence) method.

Viral infectivity assay. The HXBH10env- proviral construct was complemented individually with each glycoprotein mutants by co-transfection of HEK293T cells. For the trans dominant-negative experiment, HXBH10env-proviral construct, pSVIIIenv WT plasmid and increasing DNA quantities of pSVIIIenv plasmid expressing each glycoprotein mutants were co-transfected in HEK293T cells. Viral infectivity was measured by MAGI assay^[38] modified to use P4-R5 cells. The different viral stocks were quantified for total viruses using a reverse transcriptase assay. Similar amounts of viruses, (2 cpm/cell), was then applied onto P4-R5 reporter cells. Cells were fixed and processed for β -galactosidase activity 48 hours post-infection, positive (blue) cells were then counted under the microscope. The results represent the mean of duplicate samples for three independent experiments. As previously reported, the assay was found to be linear under the conditions used and thus adequately represents the amount of infectious virus present^[39].

Incorporation of mutant glycoproteins to viral particles. In order to verify the incorporation of the different mutated glycoproteins into viral particles, the HXBH10env- was co-transfected in duplicate with the different mutants in HeLa cells. Cells were directly labeled, 48 hours post-transfection, in the petri dish with 100 μ Ci/ml of Trans³⁵S-Label (1175 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences) for 16 hours in a total of 3ml of methionine-free medium supplemented with 10% of complete medium (DMEM with 10% FBS) per petri dish. Viral supernatant was clarified and pelleted through a 20% sucrose cushion for 1.5 hours at 35000 rpm in a refrigerated Beckman ultracentrifuge (70.1Ti rotor). Cell-associated and virion-associated proteins were lysed in RIPA buffer, and processed as already mentioned in the previous section. A pre-clearing step was then performed on both cells and viral-associated fraction using normal human serum and protein A-sepharose beads. Viral proteins were immunoprecipitated with HIV-1 patient's serum from the cell lysates and the virions released into the supernatant. Protein A-sepharose beads were added and the proteins were analyzed on a 10% SDS-PAGE autoradiography.

Hetero-oligomerization experiment. SV-CMV TAT expression vector was co-transfected in HEK293T cells with the same DNA amount of the pSVIIIenv Δ 726-856 expression vector and each glycoprotein mutant (Δ I642 and TM-HA) expression plasmids. Cells were labeled 48 hours post-transfection. Briefly, cells were first starved in serum and methionine-free medium for 30 min, scraped from the petri dish and resuspended for metabolic radiolabeling in 0.5ml of serum and methionine-free medium for 30 min in presence of a total of 200 μ Ci of Trans³⁵S-Label (1175 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences). Fresh methionine-free medium supplemented with 2.5% of dialyzed FBS was added to the 0.5ml and the cells were incubated for another 3.5 hours. Cells were lysed 48 hours post-transfection in 0.5% CHAPS buffer, frozen at -80°C and thawed three times before centrifugation and pre-clearing steps as described before. The proteins were immunoprecipitated with an anti-gp41 MAb coming from HIV-1 IIIB gp41 hybridoma Chessie 8 and obtained from the NIH AIDS Research and Reference Reagents program (cat #526). This antibody does not bind the truncated WT envelope so only proteins linked to the different mutant proteins are pulled down after adding protein G-sepharose beads. Proteins were analyzed on a 10% SDS-PAGE followed by autoradiography.

Intracellular CD4 binding. HEK293T cells were co-transfected with the SV-CMV CD4, SV-CMV TAT and the different envelope expression vectors. Cellular proteins were metabolically radiolabeled 48 hours post-transfection. Briefly, cells were first starved in serum and methionine-free medium in presence of brefeldin A (5mg/ml), scraped from the petri dish and resuspended in 0.5ml of serum and methionine-free medium for 30 min in presence of a total of 200 μ Ci of Trans³⁵S-Label (1175 Ci/mmol, Perkin Elmer Life Sciences). Fresh methionine-free medium supplemented with 2.5% of dialyzed FBS was added to the 0.5ml and the cells were incubated for another 3.5 hours in presence of brefeldin A (5mg/ml). Cells were lysed in RIPA buffer. After clarification and a pre-clearing steps, the proteins were then immunoprecipitated with an anti-CD4 (OKT4) and protein G-sepharose beads or the anti-gp41 (Chessie 8) MAb before analysis by SDS-PAGE and autoradiography.

Fusion (entry) assay (β -lactamase). The assay was performed essentially as described in the literature^[34-35]. HEK293T were co-transfected with of the β -lactamase/vpr (Blam-Vpr) fusion plasmid construct, the BH10env-proviral construct and the different envelope mutant expressors. The different viral stocks were quantified for total viruses using a reverse transcriptase assay. Jurkat CD4⁺ cells were infected with similar amount of virus (2.5 cpm/cell) for 5 hours in RPMI supplemented with 15% FBS. Cells were washed with CO₂ independent medium and then loaded with CCF2/AM dye in CO₂ independent medium containing 5% FBS for 60 min at room temperature and in the dark. Cells were washed and incubated overnight at room temperature, also in the dark, with medium containing 1% of probenidic in CO₂ independent medium with 5% FBS. Probenidic was used to maintain a sufficient fluorescence level during the incubation period^[40]. Finally, cells were washed and fixed in 2% paraformaldehyde and analyzed by FACS.

RESULTS

Rationale. In the course of previous unpublished work done in our laboratory, we obtained a mutant of HIV-1 glycoprotein that lost viral infectivity in P4/R5 MAGI indicator cells. Further sequencing characterization of this

mutant showed that a deletion of an isoleucine in position 642 of the gp41 ectodomain was responsible for this loss of infectivity, this mutant will be referred to as $\Delta I642$ throughout this manuscript. At the same time we were constructing a chimeric construct in which the transmembrane domain of HIV-1 gp41 was replaced by the complete transmembrane domain of the influenza virus hemagglutinin (HA) protein (referred to as TM-HA) which also showed a loss of infectivity. In both $\Delta I642$ and TM-HA, infectivity conferred by these glycoproteins was examined by transient co-expression of a complete envelope-negative proviral DNA construct with envelope expression vectors. The resulting trans-complemented viruses were obtained from nonsusceptible HEK293T cells to avoid reinfection of the cells. The specific infectivity of the virus was then examined with the classical MAGI assay, comparing levels of reverse transcriptase activity with the number of positively infected cells, via transactivation of beta-galactosidase expression in the reporter cells. Compared to the wild type virus, there was clearly no residual infectivity with both mutant and chimeric envelope glycoproteins compared to the virus that was similarly produced with the wild type glycoprotein (data not shown).

Accumulation and processing of the different envelope glycoprotein mutants. In order to further study the mechanism behind this loss of infectivity, steady-state level of accumulation maturation of both mutants was first verified. Plasmid expression vectors for each glycoprotein was introduced for transient infection in HEK293T cells together with *Tat* protein plasmid expression vector to ensure adequate expression from the HIV-1 LTR. Western blot analysis of cell lysates showed that WT envelope and TM-HA chimeric protein are processed since the surface subunit gp120 is present. In contrast, for mutant $\Delta I642$ there was no apparent processing to gp120 despite normal accumulation of the gp160 precursor (Fig.1). Western blot analysis was also performed to detect the second product of gp160 processing, the gp41 TM subunit; again the corresponding band of 41 kDa was detected only with the WT and for the TM-HA chimeric protein suggesting that complete maturation was maintained for these two glycoproteins but absent in the $\Delta I642$ mutant (data not shown).

Viral incorporation of envelope glycoprotein mutants. Beside defects in proteolytic processing of the glycoprotein precursor, another explanation for the observed loss of infectivity could be the result of a defect in incorporation of the mutant glycoproteins to viral particles. HeLa cells were co-transfected with an envelope negative proviral construct and the different glycoprotein mutants. After metabolic radiolabeling of the cells, supernatant was ultracentrifuged on a sucrose cushion and the viral pellet was lysed. Viral proteins incorporated in the viral particles were immunoprecipitated, as described in the Materials and Methods section, and further analyzed on a SDS-PAGE gel. The results obtained showed that the different mutants are normally incorporated; again, only the precursor form of the glycoprotein was observed for mutant $\Delta I642$. However, for both WT glycoprotein and TM-HA chimeric protein, for which the gp120 protein is made, the mature form of glycoproteins was predominantly incorporated (Fig.2).

Glycoproteins $\Delta I642$ and TM-HA can both act as dominant-negative mutants. Viral stocks were produced by co-transfection of HEK293T cells with three expression vectors: stable DNA quantities of both BH10env-proviral construct and WT envelope expressor complemented with increasing amount of DNA of $\Delta I642$ (Fig.3A) envelope glycoprotein mutant or TM-HA (Fig.3B) chimeric protein. Each virus stock produced was then tested for specific infectivity using single-cycle infectivity assay with indicator P4/R5 MAGI cells. When identical amounts of DNA for the WT envelope vector and the mutants were used, the infectivity level decreased drastically. For mutant $\Delta I642$ approximately 5% of WT infectivity was retained under these conditions and when DNA amount of mutant $\Delta I642$ was further doubled, only a remaining trace of infectivity (around 1%) was observed (Fig.3A). This result suggest that the precursor form of the envelope glycoprotein in mutant $\Delta I642$ can act as a trans dominant-negative mutant for virion infectivity. Similar results were obtained with the TM-HA chimeric protein envelope construct, even if the residual percentage of infectivity was slightly higher then what was observed for mutant $\Delta I642$ (Fig.3B). Nevertheless, TM-HA chimeric protein, like mutant $\Delta I642$, seems to act also as a trans dominant-negative mutant of infectivity even if the mature form of envelope glycoprotein, gp120 is produced with this protein.

Hetero-oligomers formation between WT truncated form of envelope and the different mutated form of envelope glycoproteins. A trans dominant-negative phenotype, when the effect of expressing a mutant form of a protein is significantly more important than simple dilution effect of the wild type molecule, is indicative of an interaction between mutant and wild type form of the protein resulting in a loss of function of the latter in the complex. This could be most often observed in the case of proteins that naturally form active oligomeric complexes such as the HIV-1 glycoprotein trimer. To determine if the trans-dominant effect that we observed is accompanied by the formation of hetero-oligomers between the mutant and the WT glycoproteins, the Δ I642 and TM-HA were co-expressed with a truncated, glycoprotein, the Δ 726-856 glycoprotein that lacks the epitope recognized by the monoclonal anti-gp41 antibody produced by Chessie 8 hybridoma cells (as shown by lack of immunoprecipitation in Fig. 4, lane 1). It was possible to observe formation of hetero-oligomers by the co-immunoprecipitation of the truncated glycoprotein (Δ 726-856) with either Δ I642 mutant and TM-HA (Fig.4, lanes 5 and 6) obtained after metabolically labeling the cells and by an immunoprecipitation assay made under conditions that maintained the oligomeric structures of the glycoproteins as described in the Materials and Methods section.

Intracellular binding between CD4 either mutant Δ I642 or TM-HA chimeric protein. In view of the above results, it was next of interest to further analyze the mechanism by which the envelope mutants affected viral infectivity. Since the loss of infectivity is not due to a defect in glycoprotein incorporation to viral particle, another possible explanation could be a lack of interaction between the cell surface receptor CD4 and the different mutated glycoproteins. In order to clarify this question, intracellular binding of the different glycoprotein mutants to CD4 was verified. Since intracellular binding of CD4 and the envelope glycoprotein takes place in the endoplasmic reticulum compartment, brefeldin A (BFA) was added during labeling to block protein transport from the ER to the Golgi apparatus^[41]. CD4 and the WT envelope glycoproteins were also expressed alone and immunoprecipitated with either the anti-CD4 or anti-gp41 MAbs in order to verify the expression of the two proteins and the specificity of each antibody, as shown in Fig.5 (lanes

2 and 7). Mutant Δ I642 and TM-HA chimeric glycoproteins were both pulled down as the wild type glycoprotein by CD4 antibody, indicating that there is no large difference in the ability of these envelope glycoproteins to interact with CD4 (Fig.5).

Role of mutant Δ I642 and TM-HA chimeric protein in viral entry.

Since both the Δ I642 mutant and TM-HA could bind CD4, their defect must be due to later post-binding events. The next logical step was to investigate the ability of the mutant glycoproteins to promote fusion between viral envelope and cellular plasma membrane. To measure biologically relevant entry, virions containing a β -lactamase-Vpr (BlaM) fusion indicator protein were produced by co-transfection of HEK293T with an envelope-negative proviral construct, the different mutant glycoprotein expression vectors and the BlaM expression vector. Equal quantities of viral supernatant was adsorbed and let to enter Jurkat CD4-positive target cells for 5 hours. After removing virus, the cells were incubated with the β -lactamase fluorescent substrate and processed for FACS analysis, as described in Materials and Methods.

Virions produced in the absence of envelope glycoprotein showed a negligible percentage of entry, as indicated by conversion of the substrate (green) fluorescence to blue product fluorescence, similar to the mock-uninfected cells incubated with the substrate (Fig.6A and B). Cells infected with virus harboring the wild type envelope glycoprotein presented a shift in the cell population analyzed by FACS, 15% of the cell population went from green to blue fluorescence, representing the percentage of cells that have fused with a β -lactamase-positive virus under these conditions (Fig.6C). Both mutant Δ I642 and TM-HA chimeric protein were apparently unable to promote fusion since percentage of positive (blue) cells remains comparable to that of negative controls, at 0.4% and 0.6% (Fig.6 D and E to Fig. 6B).

DISCUSSION

In the present study, it was thus established that both the ectodomain and the MSD of HIV-1 gp41 can play a critical role in its fusogenic activity in the context of the viral particle. Both class of mutant or chimeric glycoprotein,

although their fusogenic potential is affected via different mechanism, are able to act as trans-dominant inhibitor via their association with the wild type molecule in trimeric form of the viral glycoprotein present at the surface of the virion.

The role of HIV-1 gp41 ectodomain in the fusion process between viral and cellular membranes has been extensively studied by many groups. As the gp120 glycoprotein binds to CD4, it initiates conformational changes making the interaction between gp120 and the co-receptors more favorable. After attachment to the co-receptor further conformational changes occur in both the gp120 subunit and the gp41 transmembrane proteins, thus weakening their interaction. During this process, a transitory pre-hairpin intermediate of the TM protein is created, freeing the previously buried fusion peptide to interact with the host-cell membrane^[6,42]. Fusion is induced by insertion of the fusion peptide, located at the amino terminus of gp41, into the host cell membrane, bringing this region near the transmembrane domain of gp41. This can be obtained through the fusion-active conformation of a coiled-coil structure composed of internal triple-stranded N-peptide helices paired with anti-parallel outer C-peptides packed along hydrophobic grooves, forming a six-helix bundle^[43]. Amino acids substitution introduced throughout the ectodomain of the gp41 protein showed the importance of many residues present in both the N36 and the C34 helices, in membrane fusion activity^[21,44,45]. Another study also demonstrated that residues forming the gp41 loop located between residues 593 and 622 of the extracellular domain are either important in the processing and the incorporation of the glycoproteins or responsible for an increased dissociation between gp120 and gp41^[46]. In the present study, an isoleucine residue was deleted in the C34 helix which led to the production of an immature form of glycoprotein and a loss of viral infectivity. It was previously reported that isoleucine 642 participates, with five other residues (Trp628, Trp631, Ile635, Tyr638 and Leu645), in the stabilization of the six-helix bundle structure through specific interfacial interactions between these six apolar side chains^[21]. The same investigators have also shown that, when this residue is substituted for an alanine, the substitution affects gp160 processing and/or gp120 and gp41 association and impairs cell-to-cell fusion and syncytium formation. Our data, reported here, further support the importance of this residue in gp160 cleavage but also in the fusion process between the virus lipid envelope and the cellular plasma membrane during the actual infection process.

Several peptides that mimic the sequence of the N- and C-helices are known to inhibit fusion by blocking the interaction between the helices, thus preventing the formation of the six-helix bundle fusogenic state of gp41^[15,16,47,48]. Peptides such as C34 and T-20 (also referred to as DP178) act as entry inhibitors of HIV-1 via inhibition of envelope-mediated virus-cell fusion. The sequence of both of these peptides cover the region that includes the isoleucine residue in position 642^[49]. Our results showed that deletion of residue Ile642 impaired viral entry probably due to a loss of HIV-1 gp41 fusogenic activity, showed by the BlaM early entry assay (Fig.6), since the mutant glycoprotein was still able to bind onto CD4 (Fig.6). The lack of processing in mutant Δ I642 could be due either to : 1) defective transport to the Golgi network where the precursor is normally cleaved by cellular convertases or 2) the mutant glycoprotein is normally transported to the Golgi apparatus but the cellular convertases are unable to recognize the cleavage site due to a conformational change of the glycoprotein. Unfortunately we could not clearly establish the exact reason for the lack of processing. No significant changes were observed with the panel of different conformational MAbs that were assayed (data not shown). Also, we were not able to show, by performing deglycosylation (EndoH) experiments, that either WT or mutant Δ I642 glycoproteins were transiting through the Golgi apparatus. This last observation is not necessarily surprising since most of the glycoprotein synthesized can be retained in the ER compartment^[50], thus masking the small proportion of transiting (endo-H resistant) molecules. More detailed kinetic analysis of the transport and subcellular localization of this mutant will be needed if one wants to understand the reason for the lack of cleavage.

Although this aspect has been comparatively somewhat less studied, it has been established that the transmembrane domain of viral glycoproteins, in addition to their ectodomain, is also essential in the fusion process for many viruses^[22,23,51-55]. In influenza virus, the HA protein has to be exposed to acidic pH in order for the ectodomain to convert into a fusogenic conformation thereby exposing the hydrophobic N-terminus of HA2 subunit, which acts as the fusion sequence^[56]. It was also reported that when the both TM and cytoplasmic domains of the HA protein were replaced simultaneously by the same domains of unrelated protein, like pIgR, the chimeric protein was able to fuse but when these domains are replaced individually the fusion activity is lost, suggesting that the TM

and the CT are not functionally independent^[57]. On the other hand, when only one domain of the HA was replaced by the corresponding domain from the fusion protein of Sendai virus, the F-protein, this does not affect membrane fusion^[58]. For HIV-1 gp41, it was first shown that the complete substitution of the MSD by that of an unrelated cellular protein, CD22, did not affect gp160 processing or viral infectivity suggesting that this region is not specifically involved in membrane fusion^[25]. Recently, the significance of these earlier observations was questioned when the complete substitution of HIV-1 gp41 MSD by that of cellular glycoporphin A or from vesicular stomatitis virus G protein was found to severely impair fusion activity of the chimeric molecules^[24, 29]. Our own results appear to support the latter observations since our chimeric protein TM-HA also completely lost its fusion capacity (Fig.6E). A consensus glycine motif (GXXXG) is very conserved among the MSD of different cellular and transmembrane proteins. However, in HIV-1 gp41 MSD, these glycine residues can apparently be substituted without affecting fusion activity of gp41, since these mutants retained their replication capacity in Jurkat cells^[29]. This is not the case for vesicular stomatitis virus G (VSV-G) protein where not only conserved glycine residues are essential for fusion but also the length of the MSD itself^[27]. Even if the HIV-1 gp41 MSD is highly tolerant for mutation without affecting fusion it was also reported that the charged amino acids near or within the MSD are important for membrane fusion process^[59]. In our study we substituted the MSD of HIV-1 gp41, which is 21 amino acid long, by the influenza virus HA MSD which on the other hand is 25 amino acids long. This difference in length, as observed for VSV-G, might be responsible for the complete lost of fusion activity observed with chimeric protein TM-HA although, as also proposed by others^[25], saturation mutagenesis experiments on the MSD of HIV-1 will probably be needed to clearly assess the sequence/structure requirement for this domain and, at the same time, provide explanations for the discrepancies observed when transmembrane domains of different sources are used to substitute for that of gp41.

The central point of the current manuscript is our observations that two different types of changes made to the viral glycoprotein, both resulting in inhibition of its fusogenic ability, could give rise to the phenomenon of trans-dominant inhibition of wild type envelope glycoprotein. Assuming random association between wild type and mutant monomers, it is expected that at an

equimolar ratio there will be 12.5% residual infectivity if one need an homotrimeric wild type complex to ensure correct function. In fact, residual infectivity was found to be under 10%. This could be due to an inhibitory effect of mutant trimer on the wild type, this point clearly deserve further study. Previously, transdominant negative mutants of the viral glycoprotein were drastically affected by abrogating the cleavage site between gp120 and gp41 while subtler changes, such as truncating the intracytoplasmic domain, failed to produce mutants that can interfere with WT envelope function^[60], in contrast to the mutants reported here. It should also be noted that there has been at least one report of trans-complementation, rather than trans-inhibition, resulting from oligomerization between active and inactive HIV-1 viral glycoproteins; in this case, however, only the ability of the heterotrimer to promote cell fusion was tested^[61]. Altogether, it thus appears that the expression of a mutant envelope glycoprotein defective at the level of the fusion process is likely to interfere with the function of the wild type, at least as long as heterotrimers can be formed^[15,16,47,48,62-64]. It should be stressed, however, that a true "dominant" effect should be claimed only when the decreased of infectivity is significantly more important than expect for a simple "dilution" of the wild type envelope glycoprotein, as actually observed in the present study.

In addition to the fundamental interest in the study of viral assembly and structure/function analysis of the viral glycoproteins in HIV-1 and other enveloped viruses, further study of Δ I642 and TM-HA, as well as that of other trans-dominant negative mutants blocked at different levels in virus entry, could well lead to the identification of interesting candidate in further therapy against HIV-1 infection. Expression of trans-dominant negative mutants of viral proteins, including the glycoprotein or fragments of it, is actually one strategy envisaged in "gene therapy" against complex viruses such as HIV-1^[65].

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Carole Danis for expert technical support conducing to smooth operation of the Lemay's laboratory, as well as Johanne Mercier and Nicole Rougeau for expert technical support in the Cohen's team. We thank Serge Sénéchal for his help with FACS analysis and Dr Jacques Thibodeau (Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal) for his efforts in maintaining this facility fully operational.

This work was supported by a Canadian Institute for Health Research (CIHR) operating and group grant, a Fonds pour les Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) group grant and a financial support from the CANVAC network in the Canadian network of centers of excellence, all to G.L. and É.A.C. G.L. was the recipient of a Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) senior scholarship during early part of this work and É.A.C. is the recipient of a Canada Research Chair of Excellence. We also thank the Faculty of graduate studies of Université de Montréal for partial financial support to M.W.

REFERENCES

1. Dalglish, A.G., et al., The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, 1984. **312**(5996): p. 763-7.
2. Klatzmann, D., et al., *T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV*. *Nature*, 1984. **312**(5996): p. 767-8.
3. 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.
4. Gabuzda, D.H., et al., Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J Virol*, 1992. **66**(6): p. 3306-15.
5. Lu, M., S.C. Blacklow, and P.S. Kim, A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol*, 1995. **2**(12): p. 1075-82.
6. Chan, D.C., et al., Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*, 1997. **89**(2): p. 263-73.
7. Jiang, S., K. Lin, and M. Lu, A conformation-specific monoclonal antibody reacting with fusion-active gp41 from the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol*, 1998. **72**(12): p. 10213-7.
8. Bullough, P.A., et al., *Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion*. *Nature*, 1994. **371**(6492): p. 37-43.
9. Fass, D., S.C. Harrison, and P.S. Kim, Retrovirus envelope domain at 1.7 angstrom resolution. *Nat Struct Biol*, 1996. **3**(5): p. 465-9.

10. Weissenhorn, W., et al., Crystal structure of the Ebola virus membrane fusion subunit, GP2, from the envelope glycoprotein ectodomain. *Mol Cell*, 1998. **2**(5): p. 605-16.
11. Malashkevich, V.N., et al., Core structure of the envelope glycoprotein GP2 from Ebola virus at 1.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(6): p. 2662-7.
12. Weng, Y. and C.D. Weiss, Mutational analysis of residues in the coiled-coil domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41. *J Virol*, 1998. **72**(12): p. 9676-82.
13. Furuta, R.A., et al., Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat Struct Biol*, 1998. **5**(4): p. 276-9.
14. Melikyan, G.B., et al., Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol*, 2000. **151**(2): p. 413-23.
15. Wild, C., et al., A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(21): p. 10537-41.
16. Wild, C., T. Greenwell, and T. Matthews, A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1993. **9**(11): p. 1051-3.
17. Wild, C.T., et al., Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(21): p. 9770-4.

18. Kilby, J.M., et al., Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med*, 1998. **4**(11): p. 1302-7.
19. Munoz-Barroso, I., et al., Dilation of the human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein fusion pore revealed by the inhibitory action of a synthetic peptide from gp41. *J Cell Biol*, 1998. **140**(2): p. 315-23.
20. Rimsky, L.T., D.C. Shugars, and T.J. Matthews, Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J Virol*, 1998. **72**(2): p. 986-93.
21. Wang, S., et al., Interhelical interactions in the gp41 core: implications for activation of HIV-1 membrane fusion. *Biochemistry*, 2002. **41**(23): p. 7283-92.
22. Salzwedel, K., et al., Expression and characterization of glycopospholipid-anchored human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J Virol*, 1993. **67**(9): p. 5279-88.
23. Weiss, C.D. and J.M. White, Characterization of stable Chinese hamster ovary cells expressing wild-type, secreted, and glycosylphosphatidylinositol-anchored human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol*, 1993. **67**(12): p. 7060-6.
24. Vincent, M.J., N.U. Raja, and M.A. Jabbar, Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of chimeric envelope glycoproteins bearing the cytoplasmic and anchor domains of CD4: role of the cytoplasmic domain in Vpu-induced degradation in the endoplasmic reticulum. *J Virol*, 1993. **67**(9): p. 5538-49.
25. Wilk, T., et al., Glycoprotein incorporation and HIV-1 infectivity despite exchange of the gp160 membrane-spanning domain. *Virology*, 1996. **218**(1): p. 269-74.

26. Ulmschneider, M.B. and M.S. Sansom, Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta*, 2001. **1512**(1): p. 1-14.
27. Cleverley, D.Z. and J. Lenard, The transmembrane domain in viral fusion: essential role for a conserved glycine residue in vesicular stomatitis virus G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(7): p. 3425-30.
28. Melikyan, G.B., et al., A point mutation in the transmembrane domain of the hemagglutinin of influenza virus stabilizes a hemifusion intermediate that can transit to fusion. *Mol Biol Cell*, 2000. **11**(11): p. 3765-75.
29. Miyauchi, K., et al., Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. *J Virol*, 2005. **79**(8): p. 4720-9.
30. 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.
31. Yao, X.J., et al., Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J Virol*, 1992. **66**(8): p. 5119-26.
32. Yao, X.J., et al., Degradation of CD4 induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: a predicted alpha-helix structure in the proximal cytoplasmic region of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *Virology*, 1995. **209**(2): p. 615-23.
33. Maddon, P.J., et al., The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell*, 1985. **42**(1): p. 93-104.

34. Cavrois, M., C. De Noronha, and W.C. Greene, A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat Biotechnol*, 2002. **20**(11): p. 1151-4.
35. Tobiume, M., et al., Nef does not affect the efficiency of human immunodeficiency virus type 1 fusion with target cells. *J Virol*, 2003. **77**(19): p. 10645-50.
36. Upender, M., L. Raj, and M. Weir, Megaprimer method for in vitro mutagenesis using parallel templates. *Biotechniques*, 1995. **18**(1): p. 29-30, 32.
37. Lin, S., et al., Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol*, 1998. **142**(1): p. 51-7.
38. 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.
39. Cervantes-Acosta, G., et al., Influence of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein YXXL endocytosis/polarization signal on viral accessory protein functions. *J Hum Virol*, 2001. **4**(5): p. 249-59.
40. Poot, M., et al., Probenicid inhibition of fluorescence extrusion after MCB-staining of rat-1 fibroblasts. *Cytometry*, 1996. **23**(1): p. 78-81.
41. Fujiwara, T., et al., Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1988. **263**(34): p. 18545-52.
42. Weissenhorn, W., et al., Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature*, 1997. **387**(6631): p. 426-30.

43. Chan, D.C. and P.S. Kim, HIV entry and its inhibition. *Cell*, 1998. **93**(5): p. 681-4.
44. Lu, M., et al., Structural and functional analysis of interhelical interactions in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein by alanine-scanning mutagenesis. *J Virol*, 2001. **75**(22): p. 11146-56.
45. Kinomoto, M., et al., Amino acid 36 in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain controls fusogenic activity: implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor. *J Virol*, 2005. **79**(10): p. 5996-6004.
46. Jacobs, A., et al., Alanine scanning mutants of the HIV gp41 loop. *J Biol Chem*, 2005. **280**(29): p. 27284-8.
47. Chan, D.C., C.T. Chutkowski, and P.S. Kim, Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(26): p. 15613-7.
48. Bewley, C.A., et al., Design of a novel peptide inhibitor of HIV fusion that disrupts the internal trimeric coiled-coil of gp41. *J Biol Chem*, 2002. **277**(16): p. 14238-45.
49. Gallo, S.A., et al., Temperature-dependent intermediates in HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion revealed by inhibitors that target N- and C-terminal helical regions of HIV-1 gp41. *Biochemistry*, 2004. **43**(25): p. 8230-3.
50. Willey, R.L., et al., Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(24): p. 9580-4.

51. Kemble, G.W., T. Danieli, and J.M. White, Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion. *Cell*, 1994. **76**(2): p. 383-91.
52. Melikyan, G.B., J.M. White, and F.S. Cohen, GPI-anchored influenza hemagglutinin induces hemifusion to both red blood cell and planar bilayer membranes. *J Cell Biol*, 1995. **131**(3): p. 679-91.
53. Ragheb, J.A. and W.F. Anderson, Uncoupled expression of Moloney murine leukemia virus envelope polypeptides SU and TM: a functional analysis of the role of TM domains in viral entry. *J Virol*, 1994. **68**(5): p. 3207-19.
54. Odell, D., et al., Influence of membrane anchoring and cytoplasmic domains on the fusogenic activity of vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *J Virol*, 1997. **71**(10): p. 7996-8000.
55. Schroth-Diez, B., et al., The role of the transmembrane and of the intraviral domain of glycoproteins in membrane fusion of enveloped viruses. *Biosci Rep*, 2000. **20**(6): p. 571-95.
56. White, J.M. and I.A. Wilson, Anti-peptide antibodies detect steps in a protein conformational change: low-pH activation of the influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol*, 1987. **105**(6 Pt 2): p. 2887-96.
57. Melikyan, G.B., et al., Amino acid sequence requirements of the transmembrane and cytoplasmic domains of influenza virus hemagglutinin for viable membrane fusion. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(6): p. 1821-36.
58. Schroth-Diez, B., et al., Fusion activity of transmembrane and cytoplasmic domain chimeras of the influenza virus glycoprotein hemagglutinin. *J Virol*, 1998. **72**(1): p. 133-41.

59. Helseth, E., et al., Changes in the transmembrane region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein affect membrane fusion. *J Virol*, 1990. **64**(12): p. 6314-8.
60. Iwatani, Y., et al., Analysis of dominant-negative effects of mutant Env proteins of human immunodeficiency virus type 1. *Virology*, 2001. **286**(1): p. 45-53.
61. Salzwedel, K. and E.A. Berger, Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: functional complementation of specific defects in gp120 and gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(23): p. 12794-9.
62. Chen, S.S., A.A. Ferrante, and E.F. Terwilliger, Characterization of an envelope mutant of HIV-1 that interferes with viral infectivity. *Virology*, 1996. **226**(2): p. 260-8.
63. Chen, S.S., et al., Trans-dominant interference with human immunodeficiency virus type 1 replication and transmission in CD4(+) cells by an envelope double mutant. *J Virol*, 1999. **73**(10): p. 8290-302.
64. Lund, O.S., et al., Inhibition of HIV type 1 infectivity by coexpression of a wild-type and a defective glycoprotein 120. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1998. **14**(16): p. 1445-50.
65. Wolkowicz, R. and G.P. Nolan, Gene therapy progress and prospects: novel gene therapy approaches for AIDS. *Gene Ther*, 2005. **12**(6): p. 467-76.

Fig.1 : Synthesis and processing of envelope glycoproteins. The steady-state level and processing of the different viral envelope glycoproteins in HEK293T cells transiently transfected with plasmid expression vectors was examined by immunoblotting, as described in Materials and Methods, using the goat anti-gp160 from NIH Aids reagents program and anti-goat HRP-conjugated as secondary antibody. Lane 1: Mock-transfected cells, lane 2: wild type env glycoprotein, lane 3: Δ 1642 env mutant and lane 4: TM-HA chimeric glycoprotein. The positions of gp160 precursor and mature gp120 are indicated.

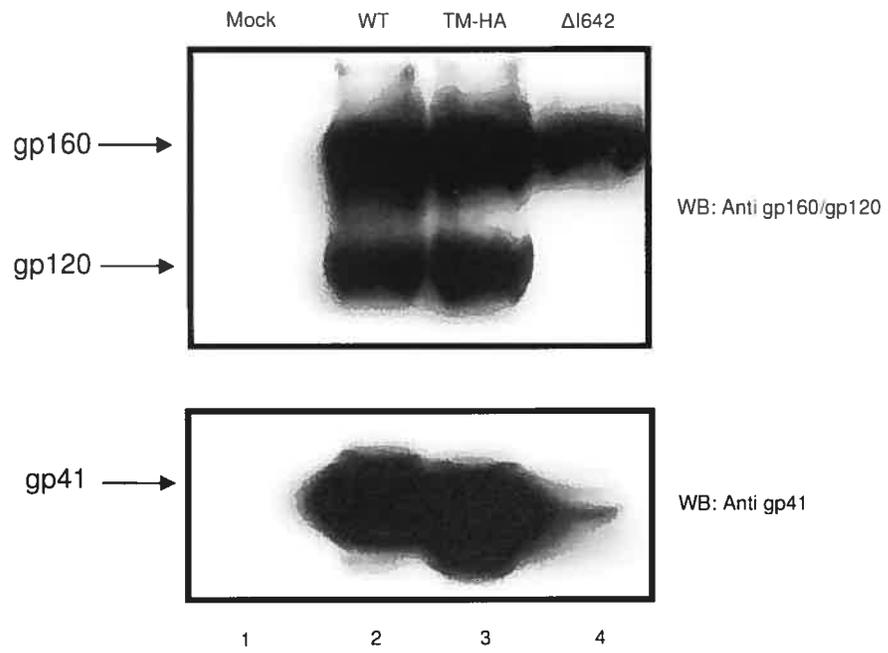
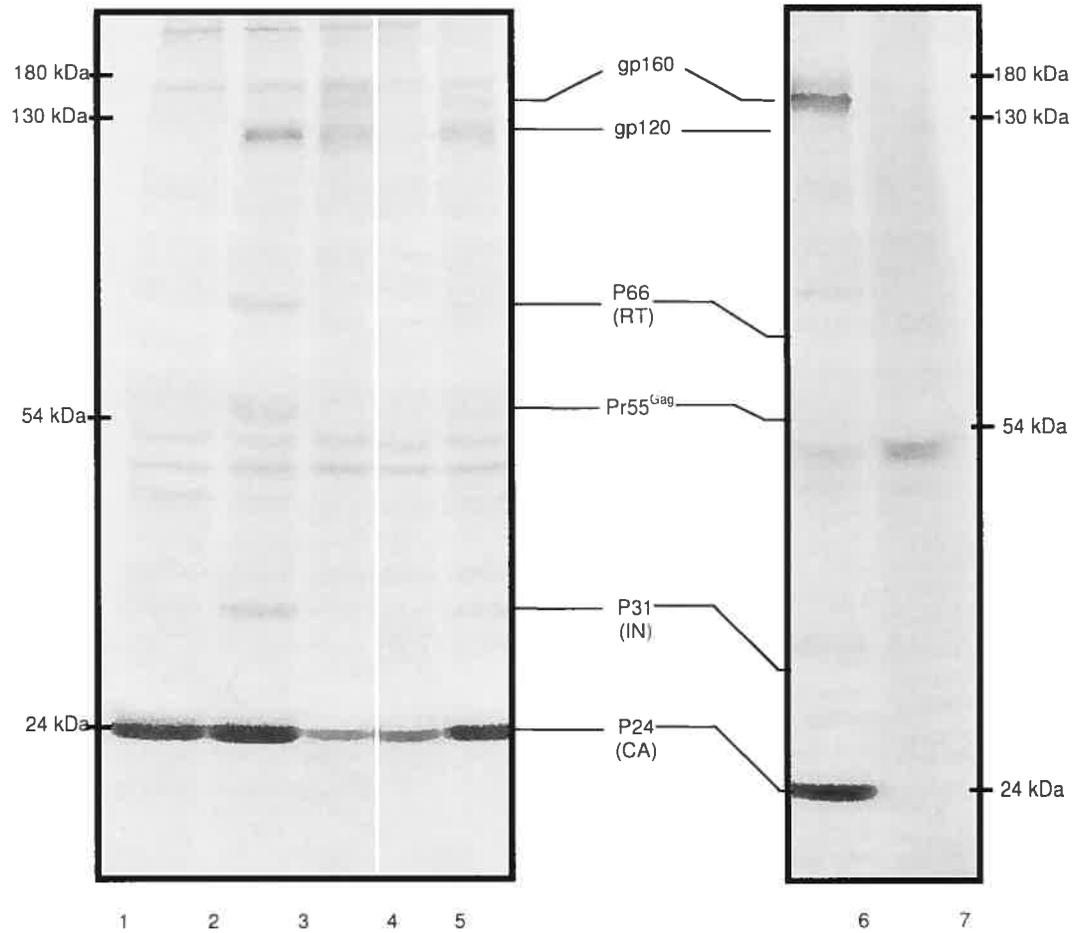


Fig.2 : Incorporation of mutant env glycoproteins to the virions. HeLa cells were transfected with the proviral env- negative alone (lane1), the proviral construct BH10env+ (lane2), or co-transfected with BH10env- construct and expression vector for the wild type env (lane3), the Δ I642 env (lane4), or the TM-HA chimeric protein env (lane5). Cells co-transfected with the SV-CMV TAT and WT env expressor were used as a negative control (lane6). The cells were metabolically labeled with Trans³⁵S-Label for 16 hours. Virions released into the supernatant were pelleted through a 20% sucrose cushion, disrupted in RIPA buffer, and viral proteins immunoprecipitated with HIV-1 patient's serum before being analyzed on a 10% SDS-PAGE followed by autoradiography.



- 1) BH10env-
- 2) BH10 env+
- 3) BH10 env- /pSVIIIenv WT
- 4) BH10 MAp17Δ98/100
- 5) BH10 env- / pSVIIIenv TM HAWT
- 6) BH10env- / pSVIIIenv ΔI642
- 7) pSVIIIenv WT alone

Fig.3 : Effect of the different viral envelope glycoprotein mutants on virus infectivity. HEK293T cells were co-transfected with BH10env- proviral construct simultaneously with different ratios of expression vectors for wild type envelope glycoprotein and Δ 1642 mutant (panel A) or wild type envelope glycoprotein and TM-HA chimeric envelope glycoprotein (panel B), as indicated. Total amount of viruses released was determined by measuring reverse transcriptase activity and identical amounts were applied onto MAGI (P4-R5) cells for single-cycle infectivity assay, as described in Materials and Methods. Numbers are the mean of at least three independent experiments and two values for each virus with the value of the wild type envelope considered as 100%; standard error was less than 5%.

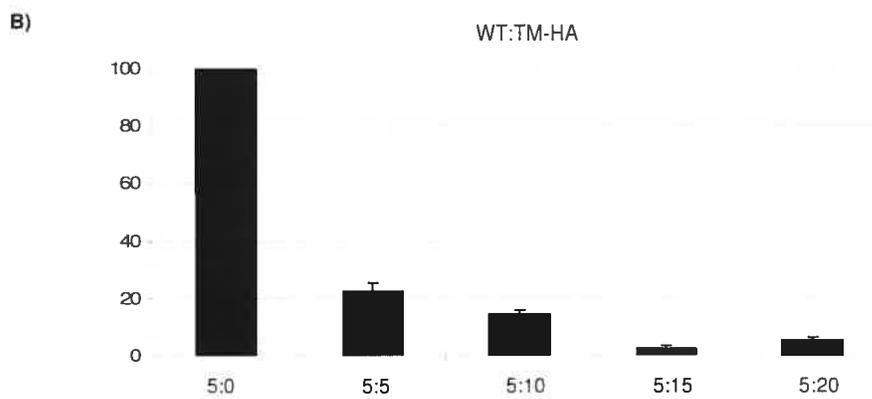
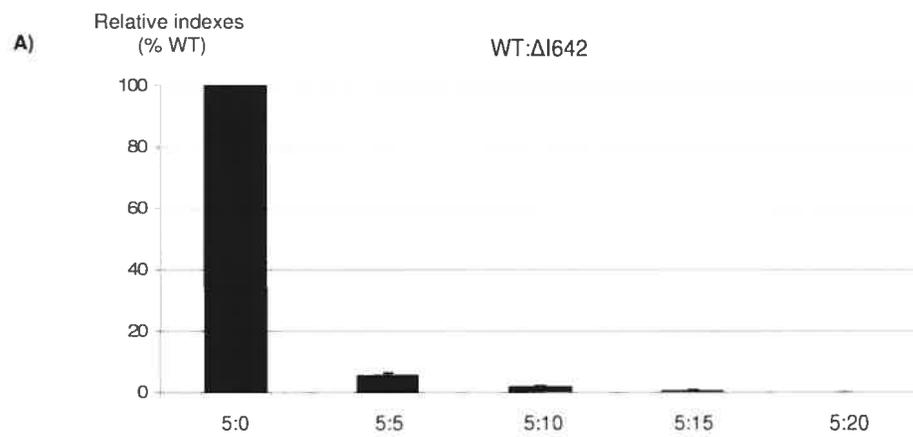


Fig.4 : Formation of oligomers between envelope glycoproteins. HEK293T cells were co-transfected with different ratio of "wild type" $\Delta 726-856$ envelope expression vector and $\Delta I642$ envelope mutant, as described in Materials and methods. The cells were metabolically labeled with Trans³⁵S-Label for 4 hours and gently disrupted in CHAPS buffer to maintain intact the oligomeric complexes. Cells lysates were then subjected to immunoprecipitation using the anti-gp41 MAb Chessie 8 hybridoma that only recognized the non-truncated $\Delta I642$ envelope glycoproteins. A similar experiment at the highest DNA concentration is also presented for the TM-HA chimeric protein. The proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography, the position of the precursor gp160, from either $\Delta I642$ or TM-HA, or the gp140 from the wild type $\Delta 726-856$, are indicated.

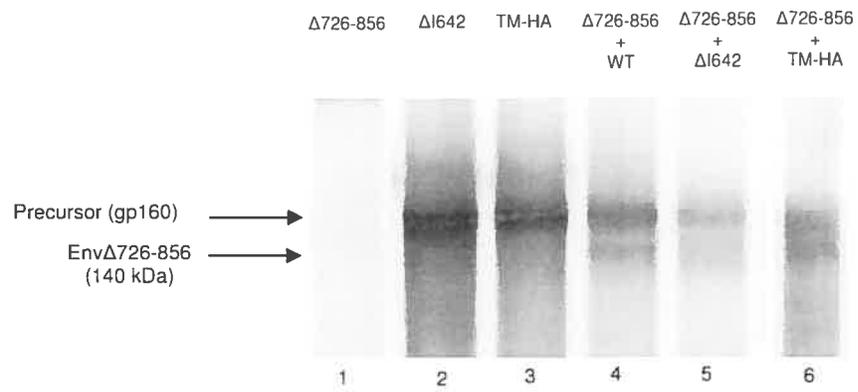


Fig.5 : Binding of envelope glycoproteins to CD4. HEK293T cells were transfected with SV-CMV CD4 plasmid expression vector either alone (lane 2) or with the different envelope glycoproteins expression vectors for either wild type (lane 3), Δ 1642 (lane 4) or chimeric TM-HA (lane 5), as indicated. Cells were metabolically radiolabeled with Trans³⁵S-Label for 4 hours using 5 mg/ml of BFA during labeling to prevent export of proteins from the endoplasmic reticulum. Cells were lysed in RIPA buffer and proteins were immunoprecipitated with either the anti-CD4 OKT4 monoclonal antibody (T) or the anti-envelope glycoprotein polyclonal antibody (E), as indicated. Pull-down of the envelope glycoproteins via its interaction with CD4 was analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. Control includes immunoprecipitation with either antibody of cells singly-transfected with either the CD4 expression vector (lanes 1 and 2) or the wild type envelope expression vector (lanes 6 and 7).

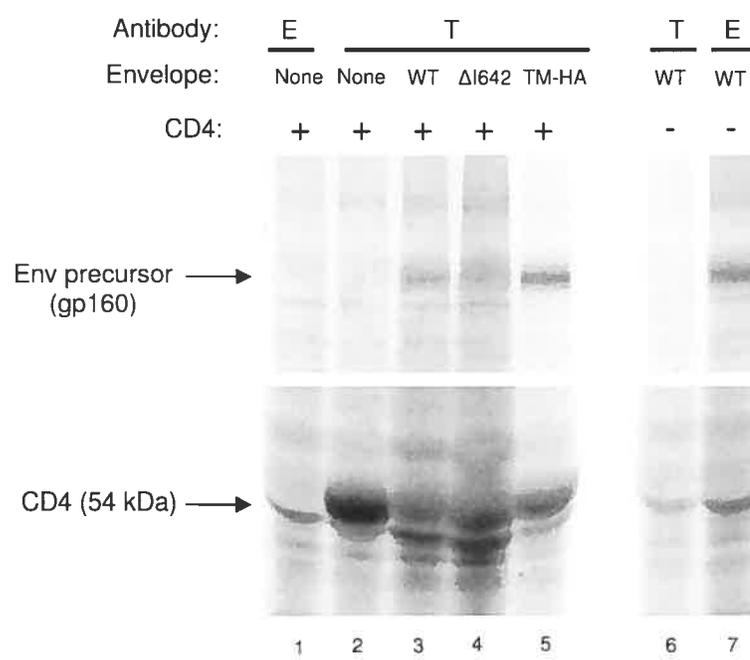
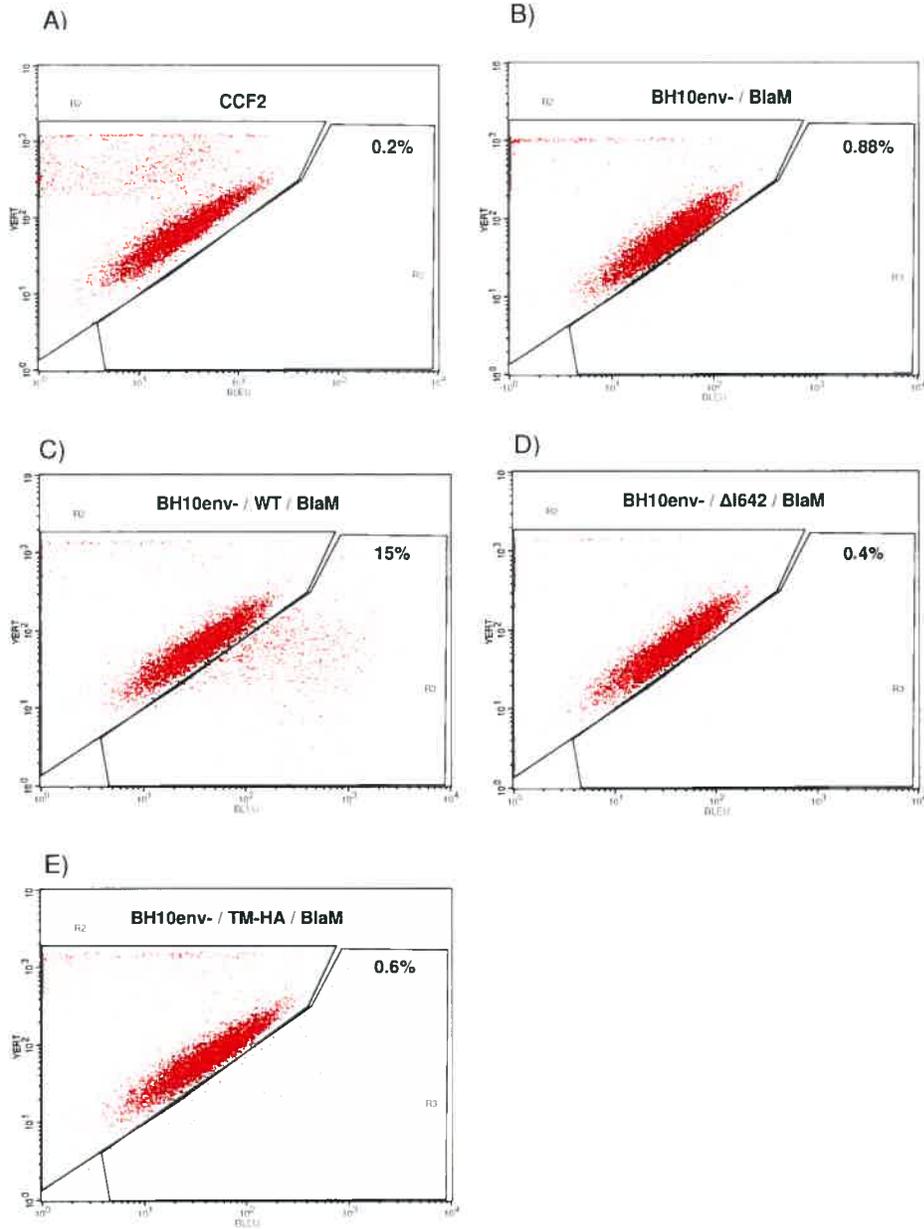


Fig.6 : Efficiency of viral fusion/entry promoted by the envelope glycoproteins. Viruses were produced by three-plasmid cotransfection of the envelope-negative proviral DNA construct (BH10env-), pMM310, a BlaM-Vpr fusion protein expression vector, and the different indicated glycoprotein mutants. Amounts of viruses to be used in infection were normalized using the reverse transcriptase activity assay and Jurkat cells were infected for 5 hours. Cells were loaded with the β -lactamase-sensitive fluorochrome CCF2/AM and further incubated in order to allow cleavage by the BlaM-Vpr fusion protein, as described in Material and Methods. Analysis was performed by flow cytometry. Uncleaved substrate was detected as green fluorescence and cleaved substrate was detected as blue fluorescence. Percentages of positive (blue) cells, indicative of virus fusion and entry, are indicated on the graphs.



CHAPITRE 4 :
DISCUSSION

Objectifs de départ

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués afin d'atteindre deux objectifs bien précis. L'objectif principal visait à séparer les déterminants moléculaires associés au ciblage polarisé du virus et à l'internalisation de la gp41, et ce en substituant les acides aminés flanquant la tyrosine impliquée dans les deux processus. Quant au second objectif, il visait à déterminer l'importance des domaines extracellulaire et transmembranaire de la gp41 dans l'infektivité du VIH-1. Il est à noter que globalement les objectifs fixés ont été atteints et que les résultats obtenus ont fait l'objet de deux articles présentés aux chapitres 2 et 3.

Dans cette section, les résultats obtenus seront discutés afin d'éclaircir et de nuancer certains points et ce en référence avec la littérature. Il sera également fait mention des travaux à réaliser afin de donner suite à ces deux projets.

Déterminants moléculaires responsables du transport intracellulaire polarisé dans les cellules épithéliales et de l'internalisation de la glycoprotéine présente à la surface cellulaire

Il a clairement été démontré que la tyrosine, proximale au domaine transmembranaire, présente dans le domaine cytoplasmique de la gp41 est responsable du ciblage polarisé de la particule virale, suite au ciblage de la glycoprotéine au domaine basolatéral des cellules épithéliales polarisées^(248, 249). La tyrosine fait partie d'un motif qui est très conservé parmi différents isolats du VIH-1. Ce dernier est également présent chez le VIS et chez d'autres rétrovirus dont le domaine cytoplasmique est plus court que celui des lentivirus. Chez ces rétrovirus, soit le HTLV-1 et le MuLV, il a été démontré que la tyrosine est responsable du ciblage au domaine basolatéral dans les cellules épithéliales polarisées⁽²⁴⁷⁾. Il a également été démontré que cette dernière joue un rôle dans l'internalisation des glycoprotéines virales présentes à la surface des cellules, suite à la formation de vésicules de clathrine recrutée par l'adaptine AP-2^(28, 31, 32, 107, 222). Jusqu'à maintenant, l'importance des séquences flanquant la tyrosine responsable du ciblage polarisé de la glycoprotéine du VIH et de l'internalisation de celle-ci par l'entremise des vésicules de clathrine était inconnue. Afin

d'identifier les séquences responsables et essentielles à l'un ou l'autre de ces phénomènes, la stratégie consistait donc à substituer les acides aminés flanquant la tyrosine par des alanines, puisque tel qu'énoncé précédemment la tyrosine joue un rôle dans les deux phénomènes.

Nos études ont clairement mis en évidence l'importance de la glycine, en position 711 du domaine cytoplasmique de la gp41, qui précède la tyrosine. Les résultats obtenus ont démontré que lorsque cette glycine est mutée en alanine elle conserve le ciblage polarisé de la particule virale au domaine basolatéral des cellules épithéliales polarisées MDCK et VeroC1008 ensemencées sur membrane semi-perméable. La présence de particules virales a pu être détectée à l'aide d'un test ELISA. Ce dernier permettant de détecter la protéine p24, composante majeure de la capside virale (Chapitre 2). Afin de déterminer si le transport de la particule virale au domaine basolatéral est influencé par la présence de la glycoprotéine au même domaine des cellules polarisées, nous avons utilisé une lignée de cellules épithéliales polarisées, MDCK-T4/R4, pouvant être infectées par le VIH-1. Cette lignée décrite dans l'article présenté en appendice, a été développée dans notre laboratoire et elle exprime à la fois le récepteur CD4⁺ et le co-récepteur des chemokines CXCR4. Elle présente l'avantage de produire une plus grande quantité de protéines virales que le système d'expression transitoire des protéines suite à la lipofection des différents vecteurs d'expression et des constructions d'ADN provirales. Bien que la lignée de cellules MDCK soit la lignée de cellules épithéliales polarisées la plus utilisée dans les études de polarisation, elle ne permet pas la propagation du VIH-1. Ceci explique également la faible quantité de protéines obtenues avec le système d'expression transitoire. À défaut d'être un système complètement "physiologique", la lignée MDCK-T4/R4 permet toutefois l'infection et la propagation du virus. Le recours à cette lignée contourne donc aussi en partie la critique reliée à l'utilisation des MDCK, cellules canines normalement non susceptibles à l'infection par le VIH. Les expériences ont été réalisées par immunofluorescence (IF) et elles ont permis de montrer la présence au domaine basolatéral des glycoprotéines virales sauvage et mutée en position 711, chez les cellules MDCK-T4/R4. Les mêmes études ont été réalisées avec les acides aminés S713, P714, L715, S716, en aval de la tyrosine, qui ont également été

mutés en alanines. Les résultats obtenus, à l'aide du test ELISA, ont montré que le ciblage polarisé des particules virales est perdu lorsque ces acides aminés sont mutés (Chapitre 2), ce qui avait d'ailleurs préalablement été observé pour le mutant P714A. En effet des études antérieures, réalisées avec la glycoprotéine mutée P714A, ont également démontré la perte du ciblage polarisé des particules virales⁽²⁴⁹⁾. Quant aux études d'IF, elles montrent que les glycoprotéines mutantes S713A, P714A et L715A sont présentes aux domaines apical et basolatéral des cellules MDCK-T4/R4 (Chapitre 2). Ceci corrobore le fait que la présence de la glycoprotéine aux domaines apical ou basolatéral entraîne la relâche de la particule virale au même domaine. Cependant, il est à noter que les résultats obtenus avec la glycoprotéine mutée en position 710 ont été plutôt surprenants. En effet, il a été possible de constater qu'en présence de la mutation Q710A la particule virale est ciblée aux domaines apical et basolatéral des cellules épithéliales polarisées MDCK et VeroC1008, et ce bien que la glycoprotéine soit ciblée au domaine basolatéral tel que démontré chez les cellules MDCK-T4/R4. Ceci est contraire à tout ce que nous avons observé avec les rétrovirus jusqu'à maintenant.

Cependant, ce phénomène a déjà été observé auparavant avec le virus influenza et le VSV. En effet, dans le cas du virus influenza, il semble que le bourgeonnement de la particule virale au domaine apical des cellules MDCK ne soit pas toujours pas influencé par le ciblage de la glycoprotéine HA à ce même domaine. Il a été démontré que lorsque la glycoprotéine HA est mutée dans sa portion cytoplasmique, de façon à entraîner le ciblage de cette dernière au domaine basolatéral des cellules MDCK, ceci n'affecte pas le ciblage de la particule qui se fait toujours au domaine apical⁽²⁹¹⁾. La même observation a pu être faite dans le cas du VSV, reconnu cette fois pour bourgeonner au domaine basolatéral des cellules polarisées. La glycoprotéine de ce virus possède un motif à base de tyrosine dans sa partie cytoplasmique qui entraîne le ciblage de cette dernière au domaine basolatéral des cellules polarisées. Cependant, lorsque la glycoprotéine est modifiée de façon à être ciblée aux domaines apical et basolatéral, le bourgeonnement de la particule virale se fait uniquement au domaine basolatéral⁽⁴⁹⁴⁾. Il existe également un cas particulier où le ciblage de la glycoprotéine sauvage se fait au domaine opposé à celui où se produit le

bourgeoisement de la particule virale. En effet, dans le cas des filovirus Marburg et Ebola, il est possible de constater que le ciblage de la glycoprotéine virale se fait au domaine apical des cellules polarisées alors que la particule virale bourgeoonne au domaine basolatéral⁽³⁷⁸⁾.

Interaction intracellulaire entre la protéine Gag et la glycoprotéine virale

Bien qu'il soit clairement démontré que la présence de la glycoprotéine virale au domaine basolatéral des cellules épithéliales polarisées entraîne le bourgeoisement de la particule virale à ce même domaine dans la majorité des cas (nous reviendrons sur le mutant Q710A plus loin)^(247-249, 322), plusieurs questions demeurent sans réponse en ce qui concerne l'interaction entre la glycoprotéine virale et la particule virale et le compartiment ou domaine cellulaire où pourrait se produire cette interaction. Cependant, il y a de plus en plus d'arguments qui tendent à démontrer que cette interaction serait intracellulaire et qu'elle serait spécifique. En effet, des études chez le VIS, réalisées avec une glycoprotéine virale à laquelle un signal de rétention au réticulum endoplasmique (RE) (K(X)KXX) a été ajouté au domaine cytoplasmique, ont montré que la glycoprotéine est capable de rediriger la protéine Gag vers le RE. Il est à noter que malgré tout l'assemblage de la particule virale se fait toujours à la membrane plasmique et non à la membrane du RE, chez les cellules HeLa⁽⁴⁴⁷⁾. Ceci indique donc que le simple fait que Gag interagisse avec la glycoprotéine à un compartiment de la cellule ne semble pas suffisant pour que l'assemblage de la particule virale se produise à ce même compartiment. De plus, des études réalisées par ce même groupe ont également démontré que l'interaction entre la glycoprotéine et Gag est perdue lorsque le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine est complètement tronqué et que les 18 premiers acides aminés du domaine cytoplasmique doivent être présents afin d'assurer l'interaction. Il est également important de noter que la substitution de la glycoprotéine du VIS par celle du VIH-1 entraîne la perte de l'interaction entre cette dernière et l'extrémité NH₂ de la protéine Gag, ce qui suggère que l'interaction entre les deux protéines est spécifique⁽⁴⁴⁷⁾.

Les mêmes conclusions s'appliquent pour la glycoprotéine du VIH-1 puisqu'il a été démontré que, malgré la présence d'un signal de rétention au RE dans le domaine cytoplasmique de cette dernière, l'assemblage du virus ne se fait pas pour autant à la membrane du RE mais bien à la membrane plasmique⁽³⁷⁶⁾. De plus, il est à noter que ces glycoprotéines ne sont pas incorporées à la particule virale et cela entraîne la formation de particules virales défectives^(335, 376).

Suite à ces études plusieurs questions demeurent, par exemple : 1) Sachant que la glycoprotéine et la protéine Gag peuvent interagir à l'intérieur de la cellule, comment se fait-il que l'assemblage de la particule virale se produise à la membrane plasmique? 2) Les études effectuées chez le VIS et le VIH-1 ont été réalisées dans un modèle de cellules non-polarisées, est-ce qu'il y a également interaction intracellulaire entre Gag et la glycoprotéine virale dans un modèle de cellules épithéliales polarisées? 3) Qu'en est-il du ciblage de la particule virale chez les cellules épithéliales polarisées lorsque le domaine cytoplasmique de la gp41 est tronqué?

Assemblage de la particule virale aux MVBs vs à la membrane plasmique

Dernièrement plusieurs études ont permis de mieux identifier les différentes étapes menant à l'assemblage et à la relâche de la particule virale du VIH-1. Ces études ont permis d'établir que le site d'assemblage et de la relâche de la particule dépend du type cellulaire utilisé. En effet, il a été démontré, chez les macrophages, que la particule virale s'assemble au niveau de compartiments intracellulaires nommés corps multivésiculaires (MVBs), d'où la particule virale mature est relâchée par la voie des exosomes⁽³⁵³⁾. Cependant, chez les cellules HeLa et les lymphocytes il semble que la particule assemblée soit de préférence relâchée à la membrane plasmique⁽³¹²⁾. Ces études montrent également que lorsque la protéine MA est mutée, soit dans son domaine basique (acides aminés 17 à 31) ou en position 84 à 88, l'assemblage de la particule virale est redirigé vers les MVBs dans les cellules HeLa. Cependant, chez les macrophages ceci n'influence en rien l'assemblage qui se fait toujours aux MVBs que la matrice soit mutée ou sauvage. Ceci semble indiquer que Gag pourrait reconnaître deux types de zones d'assemblage différentes, une à la membrane plasmique et une

seconde aux MVBs⁽³¹²⁾. Cependant, d'autres études ont démontré que lorsqu'une grande partie de la séquence en acides aminés de la protéine MA est tronquée, cette délétion entraîne une relocalisation de la protéine Gag au RE⁽¹²⁴⁾, ce qui suggère que la protéine MA pourrait exercer une certaine influence sur le ciblage aux MVBs chez les macrophages. L'interaction entre Gag et la gp41 ciblée aux MVBs est facilitée par la présence de deux acides aminés aromatiques, présents en position Y802W803 du domaine cytoplasmique de cette dernière, qui sont responsables du ciblage aux endosomes tardifs⁽³⁰⁾.

En ce qui concerne l'assemblage de la particule virale relâchée à la membrane plasmique, il semble qu'elle soit facilitée par la présence de la protéine ubiquitine-ligase POSH⁽⁹⁾. Chez les cellules HeLa et les lymphocytes deux modèles ont été proposés pour expliquer l'interaction entre la protéine Gag et la glycoprotéine, avant le ciblage de la particule virale à la membrane plasmique. Le premier modèle implique l'interaction entre la protéine Gag présente à la surface du Golgi et la glycoprotéine virale internalisée au Golgi grâce à la présence d'un motif di-leucine présent dans le domaine cytoplasmique^(186, 466). Dans ce modèle, la présence de la protéine POSH facilite le transport du complexe Gag-enveloppe⁽⁹⁾. Dans le second modèle, la protéine Gag présente à la surface du Golgi serait transportée aux endosomes tardifs pour y interagir avec la glycoprotéine virale, avant que la nouvelle particule soit ciblée à la membrane plasmique. L'interaction entre les deux protéines serait favorisée par la présence de la protéine POSH qui facilite la sortie de la protéine Gag du Golgi⁽⁹⁾.

Afin de mieux comprendre ce qui se passe au niveau de l'interaction entre Gag et la glycoprotéine dans un modèle de cellules épithéliales polarisées, la distribution de la capsid virale intracellulaire en présence des différentes glycoprotéines mutantes, décrites plus haut, a tout d'abord été vérifiée chez les cellules MDCK-T4/R4. Le modèle de cellules épithéliales n'avait pas été étudié dans ce contexte et présente certainement un intérêt particulier étant donné les mécanismes complexes de transport et de ciblage des protéines dans ce modèle. Il a été possible de constater qu'en présence des glycoprotéines virales, sauvage et mutée en position G711 (G711A) la capsid virale montre un marquage ponctué en IF. Cependant, le contraire a été observé en présence des autres

glycoprotéines dont les mutations entraînent une perte du ciblage polarisé à la fois de la particule virale et de la glycoprotéine, puisqu'un marquage intracellulaire diffus de la capsid virale a été observé (Chapitre 2). La suite logique consistait donc à vérifier si la glycoprotéine virale co-localise avec la capsid virale. Les données préliminaires observées en IF montrent que la plupart des glycoprotéines mutantes ne semblent pas co-localiser avec la capsid virale à un compartiment spécifique. Cependant, il a été observé que les glycoprotéines, sauvage et G711A, qui conservent le ciblage au domaine basolatéral, semblent co-localiser avec la capsid à la membrane plasmique. Ces résultats devront tout de même être confirmés. Afin de poursuivre la caractérisation, il serait intéressant de déterminer quels sont les compartiments où se retrouvent les deux protéines, en utilisant certains marqueurs spécifiques tels : Rab7 associé aux endosomes tardifs, TGN46 ou TGN38 associés au Golgi et Rab5, Rab11, Rab17 associés aux endosomes précoces présents aux domaines apical et basolatéral⁽¹⁴⁾. De plus, si la capsid est présente au Golgi, il serait également intéressant de déterminer si la protéine ubiquitine-ligase POSH est présente chez les cellules épithéliales polarisées et si sa présence facilite la sortie de Gag du Golgi⁽⁹⁾. De plus, s'il s'avère que les deux protéines co-localisent à la membrane plasmique il serait intéressant de déterminer si cette co-localisation se fait aux radeaux lipidiques. À la lumière des résultats obtenus il est difficile d'affirmer que dans les cellules épithéliales polarisées, Gag et la glycoprotéine virale interagissent à l'intérieur de la cellule, comme dans les cellules HeLa et les lymphocytes où une interaction intracellulaire entre les deux protéines a été observée⁽⁹⁾.

Incorporation de la glycoprotéine à la particule virale

Il est bien connu que, pour qu'une particule virale soit infectieuse, la glycoprotéine virale doit être incorporée à cette dernière lors de la relâche virale. Il a clairement été démontré que la protéine MA interagit de façon spécifique avec le long domaine cytoplasmique de la gp41 du VIH-1 afin de permettre l'incorporation de la glycoprotéine virale au virion. Il semble que lorsque la majorité du domaine cytoplasmique de la gp41 est tronqué, pour ne laisser que les huit premiers acides aminés à l'extrémité NH2 (gp41CTdel144), la

glycoprotéine est incorporée au virion, indépendamment du fait que la protéine MA soit sauvage ou mutée. Ces résultats laissent supposer que l'interaction spécifique normalement requise, entre la gp41 et la protéine MA, pour l'incorporation de la glycoprotéine au virion n'est pas essentielle⁽²⁵⁰⁾. D'autres études ont également démontré que chez certains types cellulaires, dont les cellules Jurkat et les macrophages, le domaine cytoplasmique complet de la gp41 est requis pour l'incorporation de la glycoprotéine virale et l'infectivité de la particule virale⁽²⁹⁵⁾. Ce genre d'études n'a jamais été réalisé dans un modèle de cellules épithéliales polarisées puisque ces cellules ne possèdent ni le récepteur CD4⁺ ni les différents co-récepteurs qui permettent la propagation du VIH-1. Il serait donc intéressant d'effectuer le même genre d'études avec la lignée de MCDK-T4/R4 en utilisant la construction gp41CTdel144. Cependant, il faudrait tout d'abord s'assurer que l'incorporation de la glycoprotéine ainsi que l'infectivité du virion sont maintenues dans ce type cellulaire. L'avantage que présente cette construction est qu'elle conserve les acides aminés 706 à 712 du domaine cytoplasmique tout en éliminant le domaine carboxy-terminal, ce qui augmenterait sans doute l'effet des substitutions d'acides aminés sur le motif YXXL. Il serait donc possible d'étudier à la fois le ciblage polarisé et l'internalisation de la glycoprotéine dépendante de l'adaptine AP-2 en mutant individuellement les acides aminés G711 et Y712 dans la construction gp41CTdel144. Ceci permettrait de déterminer, selon les glycoprotéines mutantes utilisées, si Gag et la glycoprotéine virale interagissent toujours à l'intérieur de la cellule et ce préalablement au ciblage aux domaines apical et basolatéral. Il serait également possible de vérifier si la glycoprotéine virale et le virion sont toujours ciblés au domaine basolatéral de la cellule même lorsque le domaine cytoplasmique est tronqué, ceci pourrait clarifier la présence ou l'absence d'autres déterminants de ciblage basolatéral ailleurs dans le domaine cytoplasmique.

Infectivité et pathogenèse

L'importance du motif à base de tyrosine dans l'infectivité du VIH demeure controversée. En effet, des études réalisées dans notre laboratoire ont démontré que les différentes protéines accessoires présentes chez le VIH-1 ne semblent pas influencer l'infectivité lorsque la tyrosine est présente, que ce soit en

présence ou non de la protéine Nef⁽⁵⁷⁾. Ces résultats ont par la suite été remis en question par le groupe de Day en 2004. En effet, ce groupe a démontré que lorsque la tyrosine est mutée, l'infectivité du virus diminue de façon significative et ce que la protéine Nef soit présente ou non⁽⁹³⁾. La différence dans les résultats obtenus par ces deux groupes peut s'expliquer par la technique de quantification des virus présents dans les échantillons (RT versus p24). En ce qui concerne les cinétiques de réplication virale, selon le groupe de Day, il semble que lorsque la tyrosine est mutée les niveaux de virus obtenus sont plus faibles et que cet effet serait encore plus marqué en l'absence de la protéine Nef. De plus, les niveaux de virus obtenus lors des cinétiques de réplication seraient différents selon les types de cellules utilisés⁽⁹³⁾. En effet, bien que tout comme eux je note une diminution du nombre de cellules bleues en présence du mutant Y712S, lors des tests d'infectivité MAGI, je n'observe aucune différence significative de propagation virale lors des cinétiques de réplication que j'ai effectuées dans les cellules Jurkat en l'absence de la protéine Nef (Chapitre 2). De plus, il semble que, contrairement au groupe de Day, le nombre de syncytia observés lors de la propagation est plus élevé en présence des virus dont la glycoprotéine est mutée en position Y712 ou en position G711, ceci étant sans doute une conséquence de l'augmentation de la glycoprotéine à la surface des cellules suite à la perte du signal d'internalisation; ces données n'ont cependant pas été incluses dans la thèse. Afin de clarifier l'implication de la tyrosine dans l'infectivité du VIH-1, il serait utile de refaire le même type d'expériences que le groupe de Day et ce avec les mêmes lignées de cellules et les mêmes provirus.

L'adaptation d'un virus lui permettant de se multiplier ou de se propager de manière optimale chez son hôte dans des conditions spécifiques est définie sous le terme de "viral fitness"⁽¹¹⁰⁾. Dans certains cas, il a été démontré qu'un virus pouvant se multiplier normalement peut être désavantagé lorsqu'en compétition avec un autre virus plus performant ou mieux adapté. Des résultats non présentés par le groupe de James Hoxie⁽¹⁴³⁾ ont indiqué qu'un virus VIS altéré dans le motif YXXL était rapidement éliminé lorsque mis en compétition avec un virus de type sauvage. Ce type d'expériences a déjà été réalisé dans notre laboratoire avec le virus MuLV. Les résultats obtenus n'ont jamais été publiés mais ils semblent démontrer un phénomène semblable. Ces résultats

suggèrent que la tyrosine doit être conservée afin de permettre une infectivité maximale. Il serait intéressant de répéter ce type d'expériences avec nos différents virus mutants afin d'établir si le phénomène d'internalisation ou de polarisation peut être responsable d'un désavantage sélectif chez le VIH-1.

Le ciblage polarisé d'un virus peut influencer sa pathogénèse et sa propagation intercellulaire. L'exemple qui illustre le mieux ce phénomène est sans aucun doute celui du virus Sendai, qui normalement bourgeonne au domaine apical des cellules polarisées. En effet, lorsque le ciblage de ce virus est modifié, la pneumonie normalement engendrée lorsque le virus bourgeonne au domaine apical se transforme en infection systémique chez la souris, bien que le virus recueilli soit atténué⁽⁴²²⁾. Il a également été démontré que lorsque le motif tyrosine est intact cela favorise la transmission des virus HTLV et VIH d'une cellule infectée à une autre cellule non-infectée qui entre en contact avec elle^(100, 107). Ce phénomène pourrait être encore plus important lors de la transmission sexuelle (mucosale) du virus, où il peut y avoir interaction entre une cellule épithéliale non infectée et une cellule infectée provenant de liquides biologiques (sperme, sécrétions vaginales) ou, réciproquement, entre une cellule épithéliale nouvellement infectée et un lymphocyte ou un macrophage présent du côté basolatéral⁽³³⁶⁾.

L'influence de la glycine et de la tyrosine sur la pathogénèse du rétrovirus VIS a précédemment été démontrée. En effet, des études réalisées chez les macaques avec le VISmac239 (virus ayant la particularité de posséder un codon stop qui empêche l'expression de la protéine Nef) ont démontré que la pathogénicité du virus est atténuée lorsque la tyrosine est substituée ou que la glycine et la tyrosine sont délétées. Chez les macaques qui ont tout de même développé la maladie, il a été possible d'observer une réversion de la mutation de la tyrosine alors que des mutations compensatoires dans le domaine cytoplasmique de la gp41 ont été observées suite à la délétion de la glycine et de la tyrosine⁽¹⁴³⁾. Il a également été possible de constater la réversion du codon stop, ce qui a ainsi permis l'expression de la protéine Nef chez tous les macaques inoculés avec le virus. Ces différentes réversions indiquent que, tout comme la protéine Nef, les acides aminés glycine et tyrosine présents dans la

glycoprotéine jouent tous les deux un rôle important au niveau de la propagation du virus chez l'animal. Le même genre d'études a été réalisé chez la souris avec le virus MuLV. Ces études ont permis de constater, contrairement aux études réalisées chez les macaques, que le fait de substituer la tyrosine n'a pas atténué la pathogénicité mais a plutôt entraîné un changement dans le type de pathologie, puisque des organes supplémentaires ont été infectés chez les souris inoculées avec le virus mutant. De plus, suite à la mutation du codon tyrosine, aucune réversion apparente n'a été observée durant l'infection⁽⁸⁹⁾. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que la tyrosine est impliquée uniquement dans le ciblage polarisé du virus et non dans l'internalisation comme pour le VIH-1⁽⁸⁹⁾. En effet, chez le MLV, la glycoprotéine possède un peptide R qui est clivé par la protéase virale suite à l'incorporation de la glycoprotéine à la particule virale. Ce clivage permet la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. Cependant, avant son incorporation, la glycoprotéine présente à la surface des cellules n'est pas fusogénique⁽¹⁵⁸⁾. Elle entraîne donc moins d'effets cytopathiques que la glycoprotéine du VIH-1, ce qui explique possiblement le fait que l'internalisation ne soit pas nécessaire dans ce cas. Ceci pourrait aussi expliquer que la pression exercée sur le maintien de la tyrosine soit moins grande chez le MLV qu'elle ne l'est chez le VIH-1.

Afin de mieux comprendre l'importance des phénomènes de polarisation et d'internalisation dans la pathogenèse des rétrovirus, il serait intéressant d'utiliser le modèle murin qui est plus accessible que le modèle simien. Il a été démontré que, bien que le domaine cytoplasmique de la glycoprotéine des rétrovirus murins soit plus courts que celui du VIH-1, il possède un motif à base de tyrosine⁽²⁴⁷⁾. Toutefois, tel que mentionné dans le paragraphe précédent, ce dernier est responsable uniquement du ciblage polarisé du virus et non de l'internalisation de la glycoprotéine présente à la surface des cellules⁽⁸⁹⁾. Chez le rétrovirus murin MuLV, l'acide aminé qui précède la tyrosine du motif est une glutamine et non une glycine, ce qui constitue une différence majeure avec la séquence en acides aminés de la gp41. Il faudrait donc tout d'abord déterminer le rôle joué par la glutamine et voir ce que sa substitution par la glycine provoque comme changement. Il serait intéressant de vérifier si l'absence d'internalisation de la glycoprotéine ne pourrait pas être attribuée à la glutamine et être récupérée

suite à la substitution de cette dernière par la glycine. Il serait également possible d'envisager l'immunisation génétique avec un plasmide contenant la glycoprotéine mutante G711A chez la souris afin de vérifier si la réponse immunitaire engendrée est aussi efficace que celle engendrée par la glycoprotéine mutante Y712S⁽⁴⁸⁾. En effet, il a été démontré que lorsque les souris sont immunisées avec un vecteur exprimant une glycoprotéine dont la tyrosine est substituée, la réponse immunitaire, autant cellulaire qu'humorale, est meilleure que lorsqu'elles sont immunisées avec la glycoprotéine sauvage⁽⁴⁸⁾.

Internalisation de la glycoprotéine présente à la surface des cellules

Le second volet du premier objectif visait à vérifier l'internalisation des différentes glycoprotéines mutantes. Dans ce but, nous avons mesuré les niveaux de glycoprotéines présentes à la surface des cellules à l'aide de la cytométrie en flux (FACS). Il est à noter que les niveaux de glycoprotéines ont tout d'abord été mesurés dans les cellules HEK293T, qui ne permettent pas la propagation du virus, et où uniquement les différentes glycoprotéines étaient exprimées. Par la suite, certains mutants ont été clonés dans la construction d'ADN proviral HXBH10 (vpr-, nef-) et les niveaux de glycoprotéines ont été mesurés à la surface des lymphocytes Jurkat CD4⁺, qui permettent la propagation du virus.

À la lumière des résultats obtenus il a été possible de constater, chez les cellules HEK293T, que les glycoprotéines mutées à la position G711 et à la position Y712 semblent s'accumuler à la surface des cellules, puisque les niveaux de gp120 détectés sont plus élevés que ceux détectés avec la glycoprotéine sauvage. Ceci suggère donc que les glycoprotéines mutantes G711A et Y712S ne sont plus internalisées aussi efficacement que la glycoprotéine sauvage. En ce qui concerne les autres glycoprotéines mutantes; Q710A, S713A, P714A et L715A les niveaux obtenus à la surface des cellules étaient similaires au niveau obtenu pour la glycoprotéine sauvage (Chapitre 2).

Dans le cas des glycoprotéines mutantes G711A et Y712S, les résultats obtenus dans les cellules Jurkat CD4⁺ diffèrent de ceux obtenus dans les cellules

HEK293T. En effet, bien qu'il soit possible d'observer une légère accumulation de la glycoprotéine mutée en position G711, les niveaux de gp120 obtenus pour les glycoprotéines mutantes sont similaires au niveau obtenu pour la glycoprotéine sauvage. Ceci semble indiquer que les mutations G711A et Y712S n'affectent pas l'internalisation des glycoprotéines chez les cellules Jurkat CD4⁺. Ces résultats diffèrent de ceux préalablement obtenus dans notre laboratoire et qui montraient que la mutation Y712S entraînait une accumulation de la glycoprotéine à la surface des cellules Jurkat CD4⁺(107). La gp120 se lie à la gp41 grâce à un lien non-covalent^(119, 481) ce qui implique que la gp120, présente à la surface de la cellule, peut se détacher facilement. Afin de s'assurer que les différences entre les résultats obtenus n'étaient pas tout simplement dues à la faible affinité des deux protéines, la présence de la gp120 dans les surnageants a été quantifiée. Il a été impossible de détecter des niveaux suffisants de gp120 dans les différents surnageants qui pourraient expliquer les résultats obtenus. Ces résultats de relâche de la gp120 n'ont pas été inclus dans la thèse. Bien que des différences aient pu être observées, nous devons garder à l'esprit que le test utilisé ne mesure pas l'internalisation directe des protéines mais bien l'accumulation de ces dernières à la surface de la cellule. Ceci implique que nous devons donc demeurer prudent dans l'interprétation des résultats et qu'il serait important de mettre au point un test permettant de mesurer l'internalisation des protéines présentes à la surface des cellules.

Il a également été rapporté que la présence de la capsid virale pourrait réduire l'internalisation de la glycoprotéine présente à la surface des cellules infectées comparativement à la situation observée lorsque la glycoprotéine est seule⁽¹²¹⁾. Bien que cela n'explique pas totalement la différence entre mes résultats et ceux obtenus précédemment⁽¹⁰⁷⁾, puisque dans les deux cas la capsid était présente, cela doit quand même être pris en considération. De plus, la construction d'ADN proviral utilisée dans les expériences précédentes⁽¹⁰⁷⁾ n'exprimait pas la protéine vpu, dont la présence facilite la relâche de la particule virale^(215, 390), ce qui a peut-être influencé le niveau de glycoprotéines présentes à la surface des cellules infectées. Cependant, il est à noter que ce type d'expériences a été repris avec le mutant Y712S, cloné dans la construction proviral HXBc2 (vpu-, vpr- et nef-), et qu'aucune différence entre les niveaux de

surface des glycoprotéines sauvage et mutée en position Y712 n'a pu être observée (résultats non présentés). Le phénomène d'internalisation des glycoprotéines en présence de la capsid virale demeure donc un point à éclaircir. Il est possible que des différences dans l'efficacité de transport à la surface, incorporation à la particule ou autres, puissent expliquer les différences observées. En effet, des différences importantes entre les clones ou stocks de cellules Jurkat ont déjà été rapportées⁽⁵⁶⁾ et pourraient expliquer ces différences. Il serait donc pertinent d'examiner différents types cellulaires dans l'avenir.

Il est important de mentionner que les résultats que nous avons obtenus dans un contexte de sur-expression, en utilisant les cellules HEK293T, ont permis de mettre en évidence l'importance de la glycine en position 711 du domaine cytoplasmique de la gp41 dans l'internalisation des glycoprotéines. Ces résultats corroborent ceux obtenus par le groupe de Boge qui a démontré que la glycine en position 711 est impliquée dans l'internalisation des glycoprotéines présentes à la surface des cellules et ce au même titre que la tyrosine en position 712 du domaine cytoplasmique de la gp41. Ces résultats ont été obtenus à l'aide d'une cinétique d'internalisation impliquant un test biochimique permettant de mesurer l'internalisation des glycoprotéines de façon plus directe. Ce groupe a également démontré, à l'aide de peptides synthétiques, que la sous-unité $\mu 2$ de l'adaptine AP-2 impliquée dans l'internalisation peut se lier à la fois avec la glycine 711 et la tyrosine 712 du domaine cytoplasmique de la gp41. En plus de leurs études réalisées *in vitro*, ce groupe a également démontré, chez les cellules infectées, une interaction *in vivo* entre la glycoprotéine d'enveloppe et l'adaptine AP-2⁽³¹⁾. Il serait donc intéressant de vérifier si cette interaction est perdue en présence de nos glycoprotéines mutantes G711A et Y712S. Ceci permettrait peut-être de mieux comprendre les résultats obtenus en présence de la capsid virale.

En comparant plusieurs séquences en acides aminés de la gp41 il a été possible de noter que la glycine en position 711, tout comme les autres acides aminés du motif YXXL, est très conservée parmi les différentes clades du VIH-1 et certains isolats du VIS⁽²³³⁾. Il est à noter que le seul acide aminé qui varie d'une clade à l'autre dans cette région est la glutamine en position 710⁽²³³⁾. Cette observation a également été vérifiée grâce à l'extraction de l'ARN de différents

échantillons de sang prélevés chez des participants de cohortes de patients, qui regroupe des utilisateurs de drogues injectables (UDI) et des hommes ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes (MSM). Bien que ces résultats n'aient pas encore été publiés ils ont démontré que la glycine en position 711 ainsi que le motif à base de tyrosine sont très conservés. Ces études ont également mis en évidence le fait que, selon les échantillons, l'acide aminé glutamine (Q) en position 710 n'est pas toujours conservé dans le cas de transmission du virus par voie sexuelle (mucosale). Bien qu'il soit difficile d'interpréter si cette différence est significative, en raison du nombre insuffisant d'échantillons testés, il est tout de même intéressant de constater que le seul acide aminé non-conservé est également celui qui n'affecte apparemment ni l'internalisation ni le ciblage basolatéral de la glycoprotéine et qui présente une dissociation entre le transport polarisé de la glycoprotéine et le bourgeonnement viral polarisé. Bien que beaucoup de travail reste à faire, ceci pourrait indiquer que la conservation de l'internalisation et du bourgeonnement polarisé des virus infectieux est cruciale, ce qui serait sans doute le cas même en substituant Q710, mais que la polarisation de la relâche des particules virales totales ne l'est pas.

Importance des domaines extracellulaire et transmembranaire de la gp41 dans l'infectivité du VIH-1

En plus de son rôle dans le ciblage polarisé du virus, la gp41 est impliquée dans les étapes plus précoces de l'infection. Elle permet la fusion entre l'enveloppe bilipidique virale et la membrane cellulaire, ce qui permet l'entrée du virus⁽⁴⁶⁹⁾. De nombreuses études ont démontré l'importance de l'ectodomaine de la gp41 dans le processus de fusion virale^(196, 211, 246, 253, 457) cependant le rôle joué par le domaine transmembranaire au niveau de l'infectivité demeure un sujet controversé^(287, 471). Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire ont permis d'établir qu'une délétion de l'isoleucine en position 642 de l'ectodomaine (mutant $\Delta I642$) ou la substitution du domaine transmembranaire de la gp41 par celui de la protéine hémagglutinine (HA) du virus influenza (mutant TM-HA), enrayent tous deux l'infectivité.

Afin de déterminer les raisons menant à cette perte d'infectivité, les glycoprotéines mutantes $\Delta I642$ et TM-HA ont été caractérisées et la plupart des résultats obtenus ont été présentés au chapitre 3 de cette thèse. Ces études ont démontré, dans le cas du mutant $\Delta I642$, que la perte d'infectivité est due à la perte de maturation du précurseur de la glycoprotéine, la gp160, ce qui ne semble pas être le cas pour la protéine chimérique TM-HA puisqu'il est possible de détecter la gp120 par immunobuvardage. Après s'être assuré que la perte d'infectivité observée n'était pas tout simplement due à un défaut d'incorporation de la glycoprotéine à la particule virale, la capacité de liaison intracellulaire à la protéine CD4 a été testée pour les deux glycoprotéines mutantes. Il est bien connu que la gp160 lie la protéine CD4 qui est présente au RE⁽¹¹⁷⁾. Afin de vérifier l'interaction entre les différentes glycoprotéines mutantes et la protéine CD4, les protéines ont été retenues artificiellement au RE grâce à l'ajout de brefeldin A, un agent reconnu pour affecter la structure du Golgi et maintenir de cette façon les protéines au RE⁽¹⁴²⁾. C'est ce qui a permis de constater que l'interaction est maintenue entre la protéine CD4 et les glycoprotéines mutantes $\Delta I642$ et TM-HA (Chapitre 3).

Certains auteurs ont suggéré que la liaison intracellulaire entre la protéine CD4 et diverses glycoprotéines mutantes du VIH pourrait ne pas être une indication absolue que la liaison entre les deux protéines à la surface de la cellule est maintenue⁽²⁷⁰⁾. En effet, il semble que certaines mutations des acides aminés de la gp120 ou de la gp41 empêchent la liaison entre les glycoprotéines mutantes et la protéine CD4 à la surface de la cellule, mais qu'elles ne nuisent en rien à la liaison intracellulaire entre ces dernières^(270, 427). Nous avons donc décidé de vérifier si la perte d'infectivité en présence des glycoprotéines mutantes $\Delta I642$ et TM-HA pouvait être due à une perte de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane de la cellule. Pour ce faire, nous avons vérifié l'entrée du virus à l'aide d'un test impliquant l'utilisation d'un vecteur exprimant la protéine vpr fusionnée à la β -lactamase, permettant ainsi d'examiner de manière plus directe la fusion entre les particules virales et les cellules cibles^(53, 431). Dans ce cas, il a été possible d'observer que les particules virales qui ont incorporé les glycoprotéines mutantes $\Delta I642$ et TM-HA ne peuvent entrer dans la cellule, ce qui indique que les étapes précoces impliquant la fusion entre les deux membranes sont inhibées

(Chapitre 3). Il serait tout de même pertinent de s'assurer que les glycoprotéines mutantes $\Delta I642$ et TM-HA interagissent avec la protéine CD4 à la surface de la cellule. Pour ce faire, les cellules exprimant les différentes glycoprotéines mutantes et sauvage pourraient être incubées avec des quantités croissantes de CD4 soluble et la liaison entre la protéine CD4 et les glycoprotéines pourrait être observée à l'aide du FACS.

Afin de déterminer si la perte du clivage de la glycoprotéine mutante $\Delta I642$ était due simplement au fait qu'elle ne passe pas par le Golgi, où elle est normalement clivée par les convertases, un traitement de déglycosylation à l'aide de l'endoglycosidase H (Endo H) a été effectué. Ce traitement permet de digérer les sucres moins complexes des glycoprotéines présentes au RE. Si la protéine a transité par le Golgi elle devient résistante à cette digestion puisqu'elle est maintenant formée de sucres complexes (N-glycans)⁽²⁶⁰⁾. Il est donc possible de savoir, en comparant les fractions sensible et résistante à l'Endo H, si la glycoprotéine a transité ou non par le Golgi. Il a été difficile de visualiser une fraction résistante à l'Endo H, ce qui n'est pas vraiment étonnant, puisque la majorité des glycoprotéines synthétisées sont retenues dans le RE⁽⁴⁷³⁾. Puisque les études de déglycosylation n'ont pas été concluantes nous avons vérifié, à l'aide de différents anticorps conformationnels, si la perte du clivage ne pouvait pas être due à un changement de conformation de la glycoprotéine qui masquerait le site de clivage reconnu par la furine ou les convertases. Aucun des anticorps utilisés n'a permis de détecter un changement de conformation pouvant expliquer la perte de maturation. Il serait donc intéressant de vérifier, par IF, si la glycoprotéine mutante $\Delta I642$ passe par le Golgi, en utilisant des anticorps dirigés contre des marqueurs ou des protéines spécifiques au Golgi tels le TGN38 ou le TGN46, ou si elle demeure au RE, en utilisant un anticorps dirigé contre la calréticuline⁽²⁸³⁾.

La perte d'infectivité qui se produit suite à des mutations dans l'ectodomaine est un phénomène bien répertorié^(29, 58, 211, 253, 457, 468, 469). Cependant, les résultats faisant état de l'effet produit par la substitution du TM de la gp41 sur l'infectivité demeurent controversés. En effet, il est mentionné dans la littérature qu'il est possible de substituer le domaine TM de la gp41 par celui de la

protéine CD22 ou par celui de la protéine CD4 sans perturber ni l'incorporation de la glycoprotéine ni l'infectivité du virus⁽⁴⁷¹⁾. Ces résultats ont cependant été remis en question puisqu'il a été démontré que la substitution du domaine transmembranaire de la gp41 par celui de la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) ou par celui de la protéine cellulaire glycophorine A empêche la fusion et inhibe l'infectivité du virus, et ce même en présence d'une glycoprotéine mature⁽²⁸⁷⁾. Nos résultats obtenus avec la glycoprotéine chimérique TM-HA corroborent les résultats obtenus par ce dernier groupe (Chapitre 3).

La glycoprotéine virale du VIH-1 s'associe dans le RE sous forme d'un trimère. Ce dernier est composé de trois molécules de gp120 et de trois molécules de gp41 présentes à la surface de la particule virale⁽¹¹⁹⁾. Suite à la liaison de la gp120 au récepteur CD4 et aux différents co-récepteurs, il se produit un changement de conformation de la glycoprotéine qui permet la fusion de l'enveloppe virale à la membrane cellulaire, par l'entremise de l'ectodomaine de la gp41^(59, 87, 463, 470). Il a également été démontré qu'il y a entre sept et 14 trimères par virion et il semble qu'un seul de ces trimères soit nécessaire à l'infection de la cellule^(66, 484). Il est connu que l'infectivité du VIH-1 peut être inhibée en présence d'un mutant trans-dominant négatif de la glycoprotéine, qui empêche la maturation de cette dernière et qui forme un hétéro-oligomère avec la glycoprotéine sauvage⁽¹⁹⁴⁾. Ceci semble être le cas de la glycoprotéine mutante Δ I642 pour laquelle il est possible d'observer une inhibition de l'infection de plus de 90% par rapport à celle observée pour la glycoprotéine sauvage, lorsqu'un rapport 1:1 entre les glycoprotéines est respecté (Chapitre 3). Il a été démontré, dans le cas de la protéine G du VSV, que lorsque la taille en acide aminé du domaine transmembranaire varie cela peut inhiber la fusion⁽⁷⁶⁾. Bien que cette observation soit à prendre en considération, puisque dans nos études nous avons substitué le domaine transmembranaire de la gp41 par un domaine plus long de trois acides aminés, cela n'explique pas tout si on fait référence aux études réalisées avec la protéine CD22 et CD4⁽⁴⁷¹⁾. Il serait donc intéressant de comparer les domaines transmembranaires des protéines gp41, VSV-G, CD22, CD4 et HA afin de déterminer si le patron d'hydrophobicité entraîne un changement quelconque dans la structure secondaire des protéines, qui pourrait expliquer les résultats obtenus.

CHAPITRE 5:
CONCLUSIONS ET CONTRIBUTIONS
MAJEURES

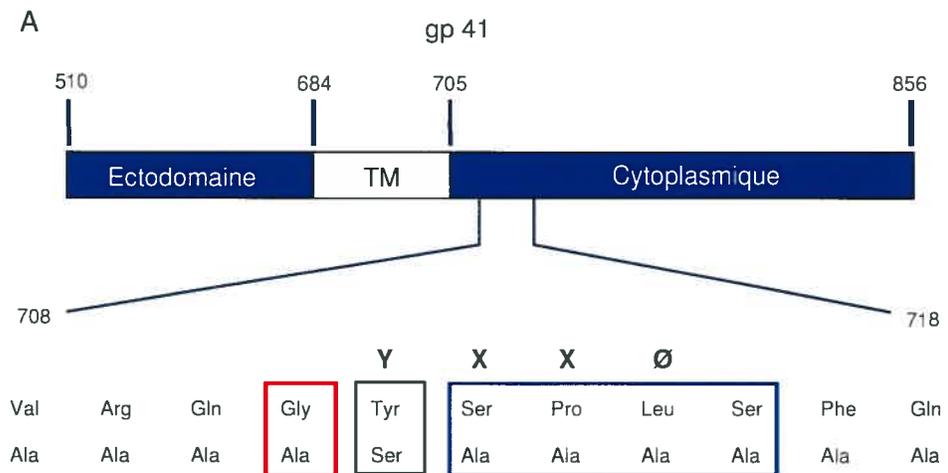
Le travail présenté dans cette thèse a permis de mettre en évidence les déterminants moléculaires, présents dans le domaine cytoplasmique de la gp41, qui sont responsables du ciblage polarisé du virus et de l'internalisation de la glycoprotéine présente à la surface de la cellule (Figure 17A). De plus, il a également été possible d'obtenir des mutants "trans-dominants négatifs" inhibant l'infectivité du virus, par substitution d'acides aminés présents dans les domaines extracellulaire ou transmembranaire de la gp41 (Figure 17B).

Voici en quelques points le résumé des contributions majeures de ce travail :

- 1) **Identification des acides aminés impliqués dans le ciblage polarisé du virus vs ceux impliqués dans l'internalisation de la glycoprotéine présente à la surface des cellules.** Ces études ont mis en évidence que lorsque la glycine, en position 711 du domaine cytoplasmique de la gp41, est remplacée par une alanine le virus et la glycoprotéine virale sont toujours ciblés au domaine basolatéral des cellules épithéliales polarisées. Cependant, cette substitution entraîne l'accumulation de la glycoprotéine à la surface des cellules. De plus, ces études ont montré que lorsque les acides aminés situés en aval de la tyrosine 712 sont mutés par une alanine (S713A, P714A et L715A), le ciblage polarisé du virus et de la glycoprotéine virale au domaine basolatéral est perdu. Cependant, l'internalisation de ces glycoprotéines mutées est maintenue. Les signaux de ciblage polarisé et d'internalisation, tous deux dépendants de la tyrosine, peuvent donc être séparés par substitution d'acides aminés flanquant la tyrosine.
- 2) **Démonstration que le ciblage au domaine basolatéral des cellules épithéliales polarisées influence la distribution de la p24 intracellulaire.** Les résultats obtenus, suite aux expériences réalisées dans les cellules MCDK-T4/R4, ont démontré que pour les glycoprotéines sauvage et G711A, la protéine p24 présente un patron de fluorescence ponctué alors qu'en présence des glycoprotéines Y712S, S713A, P714A et L715A le patron de fluorescence de la protéine p24 est diffus dans les cellules.

Figure 17
Page 230

Schéma récapitulatif représentant les domaines de la gp41 ainsi que les positions et fonctions des acides aminés étudiés qui sont impliqués dans le ciblage polarisé du virus et de la glycoprotéine ainsi que dans l'internalisation de cette dernière (A). Mutation et substitution qui ont mené à l'identification de mutants transdominants négatifs responsables de la perte de l'infectivité du VIH-1 (B).



G711A : Perte de l'internalisation de la glycoprotéine présente à la surface des cellules

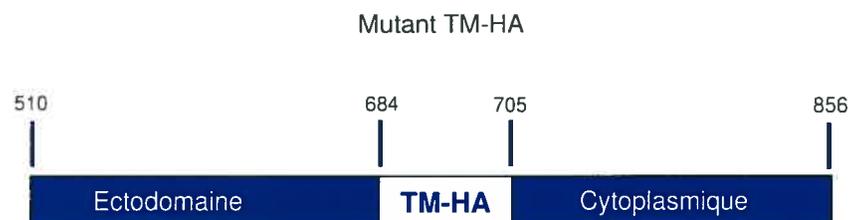
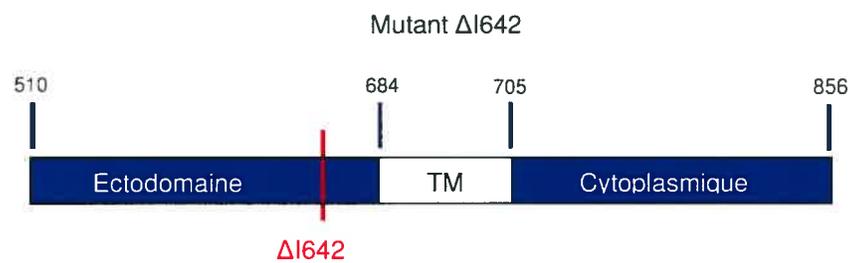
Conserve le bourgeonnement basolatéral de la glycoprotéine et du virus chez les cellules épithéliales polarisées

Y712S : Perte de l'internalisation de la glycoprotéine présente à la surface des cellules et du bourgeonnement polarisé de la glycoprotéine et du virus

S713A, P714A, L715A et S716A : Conservent l'internalisation de la glycoprotéine présente à la surface des cellules

Perte du bourgeonnement polarisé de la glycoprotéine et du virus

B Mutants trans-dominants négatifs de la gp41



- 3) **Démonstration que le ciblage polarisé du virus est perdu en présence de la glycoprotéine Q710A, ciblée au domaine basolatéral des cellules épithéliales polarisées.** Il a également été démontré, suite aux expériences réalisées dans les cellules MDCK et Vero, qu'en présence de la glycoprotéine Q710A le virus bourgeonne aux domaines apical et basolatéral des cellules polarisées et ce même si la glycoprotéine est ciblée au domaine basolatéral des cellules polarisées MDCK-T4/R4.

- 4) **Démonstration de l'effet trans-dominant négatif de la glycoprotéine suite à la délétion d'une isoleucine dans l'ectodomaine de la gp41.** Il a été démontré que la délétion de l'isoleucine, en position 642 de l'ectodomaine de la gp41, empêche la maturation de la gp120 ce qui entraîne une perte de l'infectivité du virus. Il a également été montré que la fusion en présence de la glycoprotéine mutante ($\Delta I642$) est inhibée et que la perte d'infectivité est due à la formation d'un hétéro-oligomère entre les glycoprotéine mutante et sauvage.

- 5) **Démonstration de l'importance du domaine transmembranaire de la gp41 et de son effet trans-dominant négatif sur l'infectivité du VIH-1.** Il a été démontré que la substitution du domaine transmembranaire de la gp41, par celui de la protéine HA, n'affecte ni la maturation ni l'incorporation de la glycoprotéine mais qu'elle inhibe l'infectivité du virus suite à la perte de fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. La glycoprotéine chimérique TM-HA semble également agir comme mutant trans-dominant négatif sur l'infectivité, suite à la formation d'un hétéro-oligomère avec la glycoprotéine sauvage.

J'ai également eu l'opportunité de collaborer à une autre étude :

CD4/CXCR4 co-expression allows productive human immunodeficiency virus type 1 infection in canine kidney MDCK cells : effect of Vpu and Nef in polarized epithelial cells. Guillermo Cervantes-Acosta, Mélanie Welman, Frédéric Freund, Éric A. Cohen and Guy Lemay. 2005 (papier soumis). Cet article a permis

d'obtenir et de caractériser la lignée de cellules MDCK exprimant CD4 et CXCR4 et infectable par le VIH. Cette lignée a par la suite été utilisée pour certaines des études présentées au chapitre 2.

CHAPITRE 6 :
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abeijon, C., and C. B. Hirschberg.** 1990. Topography of initiation of N-glycosylation reactions. *J Biol Chem* **265**:14691-5.
2. **Accola, M. A., B. Strack, and H. G. Gottlinger.** 2000. Efficient particle production by minimal Gag constructs which retain the carboxy-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 capsid-p2 and a late assembly domain. *J Virol* **74**:5395-402.
3. **Achiriloaie, M., B. Barylko, and J. P. Albanesi.** 1999. Essential role of the dynamin pleckstrin homology domain in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol* **19**:1410-5.
4. **Aguilar, R. C., M. Boehm, I. Gorshkova, R. J. Crouch, K. Tomita, T. Saito, H. Ohno, and J. S. Bonifacino.** 2001. Signal-binding specificity of the mu4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. *J Biol Chem* **276**:13145-52.
5. **Agungpriyono, D. R., R. Yamaguchi, Y. Tohya, K. Uchida, and S. Tateyama.** 1999. Pathogenicity of Sendai viruses adapted into polarized MDCK cells. *J Vet Med Sci* **61**:1299-307.
6. **Alfsen, A., H. Yu, A. Magerus-Chatinet, A. Schmitt, and M. Bomsel.** 2005. HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. *Mol Biol Cell* **16**:4267-79.
7. **Alizon, M., S. Wain-Hobson, L. Montagnier, and P. Sonigo.** 1986. Genetic variability of the AIDS virus: nucleotide sequence analysis of two isolates from African patients. *Cell* **46**:63-74.
8. **Alkhatib, G., C. Combadiere, C. C. Broder, Y. Feng, P. E. Kennedy, P. M. Murphy, and E. A. Berger.** 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**:1955-8.

9. **Alroy, I., S. Tuvia, T. Greener, D. Gordon, H. M. Barr, D. Taglicht, R. Mandil-Levin, D. Ben-Avraham, D. Konforty, A. Nir, O. Levius, V. Bicoviski, M. Dori, S. Cohen, L. Yaar, O. Erez, O. Propheta-Meirán, M. Koskas, E. Caspi-Bachar, I. Alchanati, A. Sela-Brown, H. Moskowitz, U. Tessmer, U. Schubert, and Y. Reiss.** 2005. The trans-Golgi network-associated human ubiquitin-protein ligase POSH is essential for HIV type 1 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:1478-83.
10. **Aman, M. J., C. M. Bosio, R. G. Panchal, J. C. Burnett, A. Schmaljohn, and S. Bavari.** 2003. Molecular mechanisms of filovirus cellular trafficking. *Microbes Infect* **5**:639-49.
11. **Anderson, R. G.** 1998. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* **67**:199-225.
12. **Anderson, S., D. C. Shugars, R. Swanstrom, and J. V. Garcia.** 1993. Nef from primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 suppresses surface CD4 expression in human and mouse T cells. *J Virol* **67**:4923-31.
13. **Ao, Z., X. Yao, and E. A. Cohen.** 2004. Assessment of the role of the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 replication by using a single-cycle replication system. *J Virol* **78**:3170-7.
14. **Apodaca, G.** 2001. Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* **2**:149-59.
15. **Arneson, L. S., and J. Miller.** 1995. Efficient endosomal localization of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes requires multimerization of the invariant chain targeting sequence. *J Cell Biol* **129**:1217-28.

16. **Arreaza, G., and D. A. Brown.** 1995. Sorting and intracellular trafficking of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein and two hybrid transmembrane proteins with the same ectodomain in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J Biol Chem* **270**:23641-7.
17. **Arthos, J., K. C. Deen, M. A. Chaikin, J. A. Fornwald, G. Sathe, Q. J. Sattentau, P. R. Clapham, R. A. Weiss, J. S. McDougal, C. Pietropaolo, and et al.** 1989. Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV. *Cell* **57**:469-81.
18. **Asin, S. N., D. Wildt-Perinic, S. I. Mason, A. L. Howell, C. R. Wira, and M. W. Fanger.** 2003. Human immunodeficiency virus type 1 infection of human uterine epithelial cells: viral shedding and cell contact-mediated infectivity. *J Infect Dis* **187**:1522-33.
19. **Babst, M., D. J. Katzmann, E. J. Estepa-Sabal, T. Meerloo, and S. D. Emr.** 2002. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Dev Cell* **3**:271-82.
20. **Babst, M., T. K. Sato, L. M. Banta, and S. D. Emr.** 1997. Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *Embo J* **16**:1820-31.
21. **Barker, G., and N. L. Simmons.** 1981. Identification of two strains of cultured canine renal epithelial cells (MDCK cells) which display entirely different physiological properties. *Q J Exp Physiol* **66**:61-72.
22. **Barlowe, C., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M. F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt, and R. Schekman.** 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**:895-907.

23. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-71.
24. **Bastiani, L., S. Laal, M. Kim, and S. Zolla-Pazner.** 1997. Host cell-dependent alterations in envelope components of human immunodeficiency virus type 1 virions. *J Virol* **71**:3444-50.
25. **Belshe, R. B., M. L. Clements, R. Dolin, B. S. Graham, J. McElrath, G. J. Gorse, D. Schwartz, M. C. Keefer, P. Wright, L. Corey, and et al.** 1993. Safety and immunogenicity of a fully glycosylated recombinant gp160 human immunodeficiency virus type 1 vaccine in subjects at low risk of infection. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group Network. *J Infect Dis* **168**:1387-95.
26. **Benson, R. E., A. Sanfridson, J. S. Ottinger, C. Doyle, and B. R. Cullen.** 1993. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J Exp Med* **177**:1561-6.
27. **Berkowitz, R., J. Fisher, and S. P. Goff.** 1996. RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**:177-218.
28. **Berlioz-Torrent, C., B. L. Shacklett, L. Erdtmann, L. Delamarre, I. Bouchaert, P. Sonigo, M. C. Dokhelar, and R. Benarous.** 1999. Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J Virol* **73**:1350-61.

29. **Bewley, C. A., J. M. Louis, R. Ghirlando, and G. M. Clore.** 2002. Design of a novel peptide inhibitor of HIV fusion that disrupts the internal trimeric coiled-coil of gp41. *J Biol Chem* **277**:14238-45.
30. **Blot, G., K. Janvier, S. Le Panse, R. Benarous, and C. Berlioz-Torrent.** 2003. 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* **77**:6931-45.
31. **Boge, M., S. Wyss, J. S. Bonifacino, and M. Thali.** 1998. A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor. *J Biol Chem* **273**:15773-8.
32. **Boll, W., H. Ohno, Z. Songyang, I. Rapoport, L. C. Cantley, J. S. Bonifacino, and T. Kirchhausen.** 1996. Sequence requirements for the recognition of tyrosine-based endocytic signals by clathrin AP-2 complexes. *Embo J* **15**:5789-95.
33. **Bomsel, M.** 1997. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med* **3**:42-7.
34. **Bomsel, M., K. Prydz, R. G. Parton, J. Gruenberg, and K. Simons.** 1989. Endocytosis in filter-grown Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* **109**:3243-58.
35. **Bonifacino, J. S., and E. C. Dell'Angelica.** 1999. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol* **145**:923-6.
36. **Bour, S., U. Schubert, K. Peden, and K. Strebel.** 1996. The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor? *J Virol* **70**:820-9.

37. **Bour, S., and K. Strebel.** 2003. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect* **5**:1029-39.
38. **Bouyac-Bertoia, M., J. D. Dvorin, R. A. Fouchier, Y. Jenkins, B. E. Meyer, L. I. Wu, M. Emerman, and M. H. Malim.** 2001. HIV-1 infection requires a functional integrase NLS. *Mol Cell* **7**:1025-35.
39. **Bowers, K., A. Pelchen-Matthews, S. Honing, P. J. Vance, L. Creary, B. S. Haggarty, J. Romano, W. Ballensiefen, J. A. Hoxie, and M. Marsh.** 2000. The simian immunodeficiency virus envelope glycoprotein contains multiple signals that regulate its cell surface expression and endocytosis. *Traffic* **1**:661-74.
40. **Brewer, C. B., and M. G. Roth.** 1991. A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* **114**:413-21.
41. **Brideau, A. D., T. del Rio, E. J. Wolffe, and L. W. Enquist.** 1999. Intracellular trafficking and localization of the pseudorabies virus Us9 type II envelope protein to host and viral membranes. *J Virol* **73**:4372-84.
42. **Brierley, I.** 1995. Ribosomal frameshifting viral RNAs. *J Gen Virol* **76 (Pt 8)**:1885-92.
43. **Brock, S. C., J. M. Heck, P. A. McGraw, and J. E. Crowe, Jr.** 2005. The transmembrane domain of the respiratory syncytial virus F protein is an orientation-independent apical plasma membrane sorting sequence. *J Virol* **79**:12528-35.
44. **Brodsky, F. M., C. J. Galloway, G. S. Blank, A. P. Jackson, H. F. Seow, K. Drickamer, and P. Parham.** 1987. Localization of clathrin light-chain sequences mediating heavy-chain binding and coated vesicle diversity. *Nature* **326**:203-5.

45. **Brown, D. A., B. Crise, and J. K. Rose.** 1989. Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. *Science* **245**:1499-501.
46. **Brown, P. O., B. Bowerman, H. E. Varmus, and J. M. Bishop.** 1989. Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:2525-9.
47. **Bryant, M., and L. Ratner.** 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:523-7.
48. **Bu, Z., L. Ye, A. Vzorov, D. Taylor, R. W. Compans, and C. Yang.** 2004. Enhancement of immunogenicity of an HIV Env DNA vaccine by mutation of the Tyr-based endocytosis motif in the cytoplasmic domain. *Virology* **328**:62-73.
49. **Burniston, M. T., A. Cimarelli, J. Colgan, S. P. Curtis, and J. Luban.** 1999. 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* **73**:8527-40.
50. **Campbell, S. M., S. M. Crowe, and J. Mak.** 2002. Virion-associated cholesterol is critical for the maintenance of HIV-1 structure and infectivity. *Aids* **16**:2253-61.
51. **Carter, L. L., T. E. Redelmeier, L. A. Woollenweber, and S. L. Schmid.** 1993. Multiple GTP-binding proteins participate in clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis. *J Cell Biol* **120**:37-45.

52. **Cattaneo, R., and J. K. Rose.** 1993. Cell fusion by the envelope glycoproteins of persistent measles viruses which caused lethal human brain disease. *J Virol* **67**:1493-502.
53. **Cavrois, M., C. De Noronha, and W. C. Greene.** 2002. A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat Biotechnol* **20**:1151-4.
54. **Center, R. J., R. D. Leapman, J. Lebowitz, L. O. Arthur, P. L. Earl, and B. Moss.** 2002. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. *J Virol* **76**:7863-7.
55. **Cereijido, M., E. S. Robbins, W. J. Dolan, C. A. Rotunno, and D. D. Sabatini.** 1978. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol* **77**:853-80.
56. **Cervantes-Acosta, G., E. A. Cohen, and G. Lemay.** 2001. Human Jurkat lymphocytes clones differ in their capacity to support productive human immunodeficiency virus type 1 multiplication. *J Virol Methods* **92**:207-13.
57. **Cervantes-Acosta, G., R. Lodge, G. Lemay, and E. A. Cohen.** 2001. Influence of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein YXXL endocytosis/polarization signal on viral accessory protein functions. *J Hum Virol* **4**:249-59.
58. **Chan, D. C., C. T. Chutkowski, and P. S. Kim.** 1998. Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:15613-7.
59. **Chan, D. C., D. Fass, J. M. Berger, and P. S. Kim.** 1997. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**:263-73.
60. **Chant, J.** 1999. Cell polarity in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:365-91.

61. **Charneau, P., M. Alizon, and F. Clavel.** 1992. A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol* **66**:2814-20.
62. **Charneau, P., G. Mirambeau, P. Roux, S. Paulous, H. Buc, and F. Clavel.** 1994. HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome. *J Mol Biol* **241**:651-62.
63. **Chen, M. Y., F. Maldarelli, M. K. Karczewski, R. L. Willey, and K. Strebel.** 1993. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces degradation of CD4 in vitro: the cytoplasmic domain of CD4 contributes to Vpu sensitivity. *J Virol* **67**:3877-84.
64. **Chen, S. S.** 1994. Functional role of the zipper motif region of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41. *J Virol* **68**:2002-10.
65. **Chen, S. S., S. F. Lee, and C. T. Wang.** 2001. Cellular membrane-binding ability of the C-terminal cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 envelope transmembrane protein gp41. *J Virol* **75**:9925-38.
66. **Chertova, E., J. W. Bess Jr, Jr., B. J. Crise, I. R. Sowder, T. M. Schaden, J. M. Hilburn, J. A. Hoxie, R. E. Benveniste, J. D. Lifson, L. E. Henderson, and L. O. Arthur.** 2002. Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* **76**:5315-25.
67. **Chitnis, A., D. Rawls, and J. Moore.** 2000. Origin of HIV type 1 in colonial French Equatorial Africa? *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:5-8.

68. **Cho, S. G., M. Attaya, and J. J. Monaco.** 1991. New class II-like genes in the murine MHC. *Nature* **353**:573-6.
69. **Chu, D. S., B. Pishvae, and G. S. Payne.** 1996. The light chain subunit is required for clathrin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**:33123-30.
70. **Cimarelli, A., and J. L. Darlix.** 2002. Assembling the human immunodeficiency virus type 1. *Cell Mol Life Sci* **59**:1166-84.
71. **Clapham, P., A. McKnight, G. Simmons, and R. Weiss.** 1993. Is CD4 sufficient for HIV entry? Cell surface molecules involved in HIV infection. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **342**:67-73.
72. **Clark, S. J., M. S. Saag, W. D. Decker, S. Campbell-Hill, J. L. Roberson, P. J. Veldkamp, J. C. Kappes, B. H. Hahn, and G. M. Shaw.** 1991. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* **324**:954-60.
73. **Claude, P.** 1978. Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol* **39**:219-32.
74. **Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, and et al.** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343-6.
75. **Clavel, F., M. Guyader, D. Guetard, M. Salle, L. Montagnier, and M. Alizon.** 1986. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* **324**:691-5.

76. **Cleverley, D. Z., and J. Lenard.** 1998. The transmembrane domain in viral fusion: essential role for a conserved glycine residue in vesicular stomatitis virus G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3425-30.
77. **Coffin, J. M., and W. A. Haseltine.** 1977. Terminal redundancy and the origin of replication of Rous sarcoma virus RNA, vol. 74.
78. **Coffin, J. M. H., S.H. and Varmus, H.E.** 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
79. **Collman, R., B. Godfrey, J. Cutilli, A. Rhodes, N. F. Hassan, R. Sweet, S. D. Douglas, H. Friedman, N. Nathanson, and F. Gonzalez-Scarano.** 1990. Macrophage-tropic strains of human immunodeficiency virus type 1 utilize the CD4 receptor. *J Virol* **64**:4468-76.
80. **Conticello, S. G., R. S. Harris, and M. S. Neuberger.** 2003. The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Curr Biol* **13**:2009-13.
81. **Cooper, D. A., B. Tindall, E. J. Wilson, A. A. Imrie, and R. Penny.** 1988. Characterization of T lymphocyte responses during primary infection with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **157**:889-96.
82. **Courgnaud, V., M. Salemi, X. Pourrut, E. Mpoudi-Ngole, B. Abela, P. Auzel, F. Bibollet-Ruche, B. Hahn, A. M. Vandamme, E. Delaporte, and M. Peeters.** 2002. Characterization of a novel simian immunodeficiency virus with a vpu gene from greater spot-nosed monkeys (*Cercopithecus nictitans*) provides new insights into simian/human immunodeficiency virus phylogeny. *J Virol* **76**:8298-309.
83. **Craig, H. M., M. W. Pandori, and J. C. Guatelli.** 1998. Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:11229-34.

84. **Craig, H. M., T. R. Reddy, N. L. Riggs, P. P. Dao, and J. C. Guatelli.** 2000. Interactions of HIV-1 nef with the mu subunits of adaptor protein complexes 1, 2, and 3: role of the dileucine-based sorting motif. *Virology* **271**:9-17.
85. **Crowther, R. A., and B. M. Pearse.** 1981. Assembly and packing of clathrin into coats. *J Cell Biol* **91**:790-7.
86. **Cullen, B. R.** 1998. Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways. *Virology* **249**:203-10.
87. **Dagleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-7.
88. **Damke, H., T. Baba, D. E. Warnock, and S. L. Schmid.** 1994. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* **127**:915-34.
89. **Danis, C., J. Deschambeault, S. Do Carmo, E. A. Cohen, E. Rassart, and G. Lemay.** 2004. The tyrosine-based YXXO targeting motif of murine leukemia virus envelope glycoprotein affects pathogenesis. *Virology* **324**:173-83.
90. **Dardalhon, V., B. Herpers, N. Noraz, F. Pflumio, D. Guetard, C. Leveau, A. Dubart-Kupperschmitt, P. Charneau, and N. Taylor.** 2001. Lentivirus-mediated gene transfer in primary T cells is enhanced by a central DNA flap. *Gene Ther* **8**:190-8.
91. **Darlix, J. L., C. Gabus, M. T. Nugeyre, F. Clavel, and F. Barre-Sinoussi.** 1990. Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *J Mol Biol* **216**:689-99.

92. **Davis, C. G., M. A. Lehrman, D. W. Russell, R. G. Anderson, M. S. Brown, and J. L. Goldstein.** 1986. The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell* **45**:15-24.
93. **Day, J. R., C. Munk, and J. C. Guatelli.** 2004. The membrane-proximal tyrosine-based sorting signal of human immunodeficiency virus type 1 gp41 is required for optimal viral infectivity. *J Virol* **78**:1069-79.
94. **Dazza, M. C., M. Ekwalinga, M. Nende, K. B. Shamamba, P. Bitshi, D. Paraskevis, and S. Saragosti.** 2005. Characterization of a novel vpu-harboring simian immunodeficiency virus from a Dent's Mona monkey (*Cercopithecus mona denti*). *J Virol* **79**:8560-71.
95. **Deacon, N. J., A. Tsykin, A. Solomon, K. Smith, M. Ludford-Menting, D. J. Hooker, D. A. McPhee, A. L. Greenway, A. Ellett, C. Chatfield, V. A. Lawson, S. Crowe, A. Maerz, S. Sonza, J. Learmont, J. S. Sullivan, A. Cunningham, D. Dwyer, D. Downton, and J. Mills.** 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**:988-91.
96. **Decroly, E., S. Benjannet, D. Savaria, and N. G. Seidah.** 1997. Comparative functional role of PC7 and furin in the processing of the HIV envelope glycoprotein gp160. *FEBS Lett* **405**:68-72.
97. **Decroly, E., M. Vandenbranden, J. M. Ruysschaert, J. Cogniaux, G. S. Jacob, S. C. Howard, G. Marshall, A. Kompelli, A. Basak, F. Jean, and et al.** 1994. The convertases furin and PC1 can both cleave the human immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-1 SU) and gp41 (HIV-1 TM). *J Biol Chem* **269**:12240-7.
98. **Dedera, D., R. L. Gu, and L. Ratner.** 1992. Conserved cysteine residues in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane envelope protein are essential for precursor envelope cleavage. *J Virol* **66**:1207-9.

99. **Dehouck, B., L. Fenart, M. P. Dehouck, A. Pierce, G. Torpier, and R. Cecchelli.** 1997. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol* **138**:877-89.
100. **Delamarre, L., C. Pique, A. R. Rosenberg, V. Blot, M. P. Grange, I. Le Blanc, and M. C. Dokhelar.** 1999. The Y-S-L-I tyrosine-based motif in the cytoplasmic domain of the human T-cell leukemia virus type 1 envelope is essential for cell-to-cell transmission. *J Virol* **73**:9659-63.
101. **Dell'Angelica, E. C., J. Klumperman, W. Stoorvogel, and J. S. Bonifacino.** 1998. Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science* **280**:431-4.
102. **Dell'Angelica, E. C., C. Mullins, and J. S. Bonifacino.** 1999. AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* **274**:7278-85.
103. **Demirov, D. G., and E. O. Freed.** 2004. Retrovirus budding. *Virus Res* **106**:87-102.
104. **Demirov, D. G., A. Ono, J. M. Orenstein, and E. O. Freed.** 2002. Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:955-60.
105. **Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau.** 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**:661-6.
106. **Depienne, C., P. Roques, C. Creminon, L. Fritsch, R. Casseron, D. Dormont, C. Dargemont, and S. Benichou.** 2000. Cellular distribution and karyophilic properties of matrix, integrase, and Vpr proteins from the human and simian immunodeficiency viruses. *Exp Cell Res* **260**:387-95.

107. **Deschambeault, J., J. P. Lalonde, G. Cervantes-Acosta, R. Lodge, E. A. Cohen, and G. Lemay.** 1999. Polarized human immunodeficiency virus budding in lymphocytes involves a tyrosine-based signal and favors cell-to-cell viral transmission. *J Virol* **73**:5010-7.
108. **Diamond, J. M.** 1977. Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence. *Physiologist* **20**:10-8.
109. **Dinman, J. D., S. Richter, E. P. Plant, R. C. Taylor, A. B. Hammell, and T. M. Rana.** 2002. The frameshift signal of HIV-1 involves a potential intramolecular triplex RNA structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5331-6.
110. **Domingo, E., and J. J. Holland.** 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* **51**:151-78.
111. **Doms, R. W., R. A. Lamb, J. K. Rose, and A. Helenius.** 1993. Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* **193**:545-62.
112. **Dorfman, T., A. Bukovsky, A. Ohagen, S. Hoglund, and H. G. Gottlinger.** 1994. Functional domains of the capsid protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**:8180-7.
113. **Dubay, J. W., S. R. Dubay, H. J. Shin, and E. Hunter.** 1995. Analysis of the cleavage site of the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein: requirement of precursor cleavage for glycoprotein incorporation. *J Virol* **69**:4675-82.
114. **Dubay, J. W., S. J. Roberts, B. Brody, and E. Hunter.** 1992. Mutations in the leucine zipper of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity. *J Virol* **66**:4748-56.

115. **Dubay, J. W., S. J. Roberts, B. H. Hahn, and E. Hunter.** 1992. Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein cytoplasmic domain blocks virus infectivity. *J Virol* **66**:6616-25.
116. **Dulude, D., M. Baril, and L. Brakier-Gingras.** 2002. Characterization of the frameshift stimulatory signal controlling a programmed -1 ribosomal frameshift in the human immunodeficiency virus type 1. *Nucleic Acids Res* **30**:5094-102.
117. **Earl, P. L., S. Koenig, and B. Moss.** 1991. Biological and immunological properties of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: analysis of proteins with truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol* **65**:31-41.
118. **Earl, P. L., B. Moss, and R. W. Doms.** 1991. Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol* **65**:2047-55.
119. **Eckert, D. M., and P. S. Kim.** 2001. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* **70**:777-810.
120. **Edwards, T. G., S. Wyss, J. D. Reeves, S. Zolla-Pazner, J. A. Hoxie, R. W. Doms, and F. Baribaud.** 2002. Truncation of the cytoplasmic domain induces exposure of conserved regions in the ectodomain of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol* **76**:2683-91.
121. **Egan, M. A., L. M. Carruth, J. F. Rowell, X. Yu, and R. F. Siliciano.** 1996. Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein endocytosis mediated by a highly conserved intrinsic internalization signal in the cytoplasmic domain of gp41 is suppressed in the presence of the Pr55gag precursor protein. *J Virol* **70**:6547-56.

122. **Einfeld, D., and E. Hunter.** 1988. Oligomeric structure of a prototype retrovirus glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:8688-92.
123. **Etienne-Manneville, S.** 2003. [Conservative molecular mechanisms controlling cell polarity]. *Med Sci (Paris)* **19**:1063-5.
124. **Facke, M., A. Janetzko, R. L. Shoeman, and H. G. Krausslich.** 1993. 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* **67**:4972-80.
125. **Fauci, A. S.** 1988. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* **239**:617-22.
126. **Favoreel, H. W., G. Van Minnebruggen, H. J. Nauwynck, L. W. Enquist, and M. B. Pensaert.** 2002. A tyrosine-based motif in the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein B is important for both antibody-induced internalization of viral glycoproteins and efficient cell-to-cell spread. *J Virol* **76**:6845-51.
127. **Fields, B. N. a. K., D.M.** 1991. *Fundamental Virology*. Raven Press, New York.
128. **Finzi, D., M. Hermankova, T. Pierson, L. M. Carruth, C. Buck, R. E. Chaisson, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D. D. Ho, D. D. Richman, and R. F. Siliciano.** 1997. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* **278**:1295-300.
129. **Fogh, J., J. M. Fogh, and T. Orfeo.** 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **59**:221-6.

130. **Folsch, H., H. Ohno, J. S. Bonifacino, and I. Mellman.** 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* **99**:189-98.
131. **Forster, M. J., B. Mulloy, and M. V. Nermut.** 2000. Molecular modelling study of HIV p17gag (MA) protein shell utilising data from electron microscopy and X-ray crystallography. *J Mol Biol* **298**:841-57.
132. **Fouts, T. R., R. G. Tuskan, S. Chada, D. M. Hone, and G. K. Lewis.** 1995. Construction and immunogenicity of *Salmonella typhimurium* vaccine vectors that express HIV-1 gp120. *Vaccine* **13**:1697-705.
133. **Franchini, G., C. Gurgo, H. G. Guo, R. C. Gallo, E. Collalti, K. A. Fagnoli, L. F. Hall, F. Wong-Staal, and M. S. Reitz, Jr.** 1987. Sequence of simian immunodeficiency virus and its relationship to the human immunodeficiency viruses. *Nature* **328**:539-43.
134. **Franchini, G., J. R. Rusche, T. J. O'Keefe, and F. Wong-Staal.** 1988. The human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) contains a novel gene encoding a 16 kD protein associated with mature virions. *AIDS Res Hum Retroviruses* **4**:243-50.
135. **Frankel, A. D., and J. A. Young.** 1998. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**:1-25.
136. **Freed, E. O.** 2002. Viral late domains. *J Virol* **76**:4679-87.
137. **Freed, E. O., E. L. Delwart, G. L. Buchschacher, Jr., and A. T. Panganiban.** 1992. A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:70-4.

138. **Freed, E. O., and M. A. Martin.** 1996. Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* **70**:341-51.
139. **Freed, E. O., and M. A. Martin.** 1995. Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J Virol* **69**:1984-9.
140. **Freed, E. O., D. J. Myers, and R. Risser.** 1989. Mutational analysis of the cleavage sequence of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein precursor gp160. *J Virol* **63**:4670-5.
141. **Freed, E. O., J. M. Orenstein, A. J. Buckler-White, and M. A. Martin.** 1994. Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J Virol* **68**:5311-20.
142. **Fujiwara, T., K. Oda, S. Yokota, A. Takatsuki, and Y. Ikehara.** 1988. Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **263**:18545-52.
143. **Fultz, P. N., P. J. Vance, M. J. Endres, B. Tao, J. D. Dvorin, I. C. Davis, J. D. Lifson, D. C. Montefiori, M. Marsh, M. H. Malim, and J. A. Hoxie.** 2001. In vivo attenuation of simian immunodeficiency virus by disruption of a tyrosine-dependent sorting signal in the envelope glycoprotein cytoplasmic tail. *J Virol* **75**:278-91.
144. **Gaines, H., M. A. von Sydow, L. V. von Stedingk, G. Biberfeld, B. Bottiger, L. O. Hansson, P. Lundbergh, A. B. Sonnerborg, J. Wasserman, and O. O. Strannegaard.** 1990. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *Aids* **4**:995-9.

145. **Galbiati, F., B. Razani, and M. P. Lisanti.** 2001. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* **106**:403-11.
146. **Gallaher, W. R., J. M. Ball, R. F. Garry, M. C. Griffin, and R. C. Montelaro.** 1989. A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* **5**:431-40.
147. **Gallay, P., S. Swingler, J. Song, F. Bushman, and D. Trono.** 1995. HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* **83**:569-76.
148. **Gammie, A. E., L. J. Kurihara, R. B. Vallee, and M. D. Rose.** 1995. DNM1, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast. *J Cell Biol* **130**:553-66.
149. **Gan, Y., T. E. McGraw, and E. Rodriguez-Boulan.** 2002. The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane. *Nat Cell Biol* **4**:605-9.
150. **Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka, and W. I. Sundquist.** 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**:55-65.
151. **Gartner, S.** 2000. HIV infection and dementia. *Science* **287**:602-4.
152. **Ghetie, V., and E. S. Ward.** 2000. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol* **18**:739-66.
153. **Ghitescu, L., A. Fixman, M. Simionescu, and N. Simionescu.** 1986. Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *J Cell Biol* **102**:1304-11.

154. **Gonzalez-Mariscal, L., A. Betanzos, P. Nava, and B. E. Jaramillo.** 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol* **81**:1-44.
155. **Gottlinger, H. G.** 2001. The HIV-1 assembly machine. *Aids* **15 Suppl 5**:S13-20.
156. **Gottlinger, H. G., T. Dorfman, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine.** 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:3195-9.
157. **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.
158. **Granowitz, C., R. D. Berkowitz, and S. P. Goff.** 1996. Mutations affecting the cytoplasmic domain of the Moloney murine leukemia virus envelope protein: rapid reversion during replication. *Virus Res* **41**:25-42.
159. **Greenberg, M., L. DeTulleo, I. Rapoport, J. Skowronski, and T. Kirchhausen.** 1998. A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr Biol* **8**:1239-42.
160. **Guyader, M., M. Emerman, P. Sonigo, F. Clavel, L. Montagnier, and M. Alizon.** 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**:662-9.
161. **Hamer, I., C. R. Haft, J. P. Paccaud, C. Maeder, S. Taylor, and J. L. Carpentier.** 1997. Dual role of a dileucine motif in insulin receptor endocytosis. *J Biol Chem* **272**:21685-91.
162. **Hansen, S. H., K. Sandvig, and B. van Deurs.** 1992. Internalization efficiency of the transferrin receptor. *Exp Cell Res* **199**:19-28.

163. **Harder, T., and K. Simons.** 1997. Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* **9**:534-42.
164. **Harouse, J. M., S. Bhat, S. L. Spitalnik, M. Laughlin, K. Stefano, D. H. Silberberg, and F. Gonzalez-Scarano.** 1991. Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide. *Science* **253**:320-3.
165. **He, J., Y. Chen, M. Farzan, H. Choe, A. Ohagen, S. Gartner, J. Busciglio, X. Yang, W. Hofmann, W. Newman, C. R. Mackay, J. Sodroski, and D. Gabuzda.** 1997. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* **385**:645-9.
166. **Heidemann, S. R., J. M. Landers, and M. A. Hamborg.** 1981. Polarity orientation of axonal microtubules. *J Cell Biol* **91**:661-5.
167. **Heilker, R., U. Manning-Krieg, J. F. Zuber, and M. Spiess.** 1996. In vitro binding of clathrin adaptors to sorting signals correlates with endocytosis and basolateral sorting. *Embo J* **15**:2893-9.
168. **Heineman, T. C., and S. L. Hall.** 2001. VZV gB endocytosis and Golgi localization are mediated by YXXphi motifs in its cytoplasmic domain. *Virology* **285**:42-9.
169. **Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, and M. Emerman.** 1994. 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* **91**:7311-5.
170. **Helseth, E., U. Olshevsky, C. Furman, and J. Sodroski.** 1991. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* **65**:2119-23.

171. **Henderson, B. R., and P. Percipalle.** 1997. Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J Mol Biol* **274**:693-707.
172. **Henderson, L. E., R. C. Sowder, T. D. Copeland, R. E. Benveniste, and S. Oroszlan.** 1988. Isolation and characterization of a novel protein (X-ORF product) from SIV and HIV-2. *Science* **241**:199-201.
173. **Henley, J. R., E. W. Krueger, B. J. Oswald, and M. A. McNiven.** 1998. Dynamin-mediated internalization of caveolae. *J Cell Biol* **141**:85-99.
174. **Heuser, J., and T. Kirchhausen.** 1985. Deep-etch views of clathrin assemblies. *J Ultrastruct Res* **92**:1-27.
175. **Hicke, L., and R. Dunn.** 2003. Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**:141-72.
176. **Hidalgo, I. J., T. J. Raub, and R. T. Borchardt.** 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **96**:736-49.
177. **Hirst, J., and M. S. Robinson.** 1998. Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta* **1404**:173-93.
178. **Hocini, H., and M. Bomsel.** 1999. Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins. *J Infect Dis* **179 Suppl 3**:S448-53.

179. **Holm, K., K. Weclawicz, R. Hewson, and M. Suomalainen.** 2003. 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* **77**:4805-17.
180. **Holness, C. L., R. P. da Silva, J. Fawcett, S. Gordon, and D. L. Simmons.** 1993. Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family. *J Biol Chem* **268**:9661-6.
181. **Honing, S., and W. Hunziker.** 1995. Cytoplasmic determinants involved in direct lysosomal sorting, endocytosis, and basolateral targeting of rat lgp120 (lamp-I) in MDCK cells. *J Cell Biol* **128**:321-32.
182. **Hoppe, C. A., T. P. Connolly, and A. L. Hubbard.** 1985. Transcellular transport of polymeric IgA in the rat hepatocyte: biochemical and morphological characterization of the transport pathway. *J Cell Biol* **101**:2113-23.
183. **Hoxie, J. A., B. S. Haggarty, S. E. Bonser, J. L. Rackowski, H. Shan, and P. J. Kanki.** 1988. Biological characterization of a simian immunodeficiency virus-like retrovirus (HTLV-IV): evidence for CD4-associated molecules required for infection. *J Virol* **62**:2557-68.
184. **Huang, M., J. M. Orenstein, M. A. Martin, and E. O. Freed.** 1995. p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease. *J Virol* **69**:6810-8.
185. **Huang, Y. T., C. J. Miller, V. Wong, H. Fujioka, J. G. Nedrud, and M. E. Lamm.** 1999. Replication and budding of simian immunodeficiency virus in polarized epithelial cells. *Virology* **257**:24-34.

186. **Hunziker, W., and C. Fumey.** 1994. A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *Embo J* **13**:2963-9.
187. **Hunziker, W., C. Harter, K. Matter, and I. Mellman.** 1991. Basolateral sorting in MDCK cells requires a distinct cytoplasmic domain determinant. *Cell* **66**:907-20.
-
188. **Huthoff, H., and M. H. Malim.** 2005. Cytidine deamination and resistance to retroviral infection: towards a structural understanding of the APOBEC proteins. *Virology* **334**:147-53.
189. **Huynh, J. R., and D. St Johnston.** 2004. The origin of asymmetry: early polarisation of the *Drosophila* germline cyst and oocyte. *Curr Biol* **14**:R438-49.
190. **Hwang, S. S., T. J. Boyle, H. K. Lyerly, and B. R. Cullen.** 1991. Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1. *Science* **253**:71-4.
191. **Iacopetta, B. J., S. Rothenberger, and L. C. Kuhn.** 1988. A role for the cytoplasmic domain in transferrin receptor sorting and coated pit formation during endocytosis. *Cell* **54**:485-9.
192. **Igakura, T., J. C. Stinchcombe, P. K. Goon, G. P. Taylor, J. N. Weber, G. M. Griffiths, Y. Tanaka, M. Osame, and C. R. Bangham.** 2003. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* **299**:1713-6.
193. **Inabe, K., M. Nishizawa, S. Tajima, K. Ikuta, and Y. Aida.** 1999. The YXXL sequences of a transmembrane protein of bovine leukemia virus are required for viral entry and incorporation of viral envelope protein into virions. *J Virol* **73**:1293-301.

194. **Iwatani, Y., K. Kawano, T. Ueno, M. Tanaka, A. Ishimoto, M. Ito, and H. Sakai.** 2001. Analysis of dominant-negative effects of mutant Env proteins of human immunodeficiency virus type 1. *Virology* **286**:45-53.
195. **Jacks, T., M. D. Power, F. R. Masiarz, P. A. Luciw, P. J. Barr, and H. E. Varmus.** 1988. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**:280-3.
196. **Jacobs, A., J. Sen, L. Rong, and M. Caffrey.** 2005. Alanine scanning mutants of the HIV gp41 loop. *J Biol Chem* **280**:27284-8.
197. **Jasenosky, L. D., G. Neumann, I. Lukashevich, and Y. Kawaoka.** 2001. Ebola virus VP40-induced particle formation and association with the lipid bilayer. *J Virol* **75**:5205-14.
198. **Jenkins, Y., M. McEntee, K. Weis, and W. C. Greene.** 1998. Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways. *J Cell Biol* **143**:875-85.
199. **Jin, Y. J., C. Y. Cai, X. Zhang, H. T. Zhang, J. A. Hirst, and S. J. Burakoff.** 2005. HIV Nef-Mediated CD4 Down-Regulation Is Adaptor Protein Complex 2 Dependent. *J Immunol* **175**:3157-64.
200. **Jolly, C., K. Kashefi, M. Hollinshead, and Q. J. Sattentau.** 2004. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med* **199**:283-93.
201. **Jolly, C., and Q. J. Sattentau.** 2005. Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity. *J Virol* **79**:12088-94.
202. **Jones, K. A., and B. M. Peterlin.** 1994. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem* **63**:717-43.

203. **Kalia, V., S. Sarkar, P. Gupta, and R. C. Montelaro.** 2003. Rational site-directed mutations of the LLP-1 and LLP-2 lentivirus lytic peptide domains in the intracytoplasmic tail of human immunodeficiency virus type 1 gp41 indicate common functions in cell-cell fusion but distinct roles in virion envelope incorporation. *J Virol* **77**:3634-46.
204. **Kane, C. D., R. M. Vena, S. P. Ouellette, and G. I. Byrne.** 1999. Intracellular tryptophan pool sizes may account for differences in gamma interferon-mediated inhibition and persistence of chlamydial growth in polarized and nonpolarized cells. *Infect Immun* **67**:1666-71.
205. **Kao, S. Y., A. F. Calman, P. A. Luciw, and B. M. Peterlin.** 1987. Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* **330**:489-93.
206. **Katzmann, D. J., M. Babst, and S. D. Emr.** 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**:145-55.
207. **Katzmann, D. J., G. Odorizzi, and S. D. Emr.** 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:893-905.
208. **Kaul, R., D. Trabattoni, J. J. Bwayo, D. Arienti, A. Zagliani, F. M. Mwangi, C. Kariuki, E. N. Ngugi, K. S. MacDonald, T. B. Ball, M. Clerici, and F. A. Plummer.** 1999. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *Aids* **13**:23-9.
209. **Kibbey, R. G., J. Rizo, L. M. Gierasch, and R. G. Anderson.** 1998. The LDL receptor clustering motif interacts with the clathrin terminal domain in a reverse turn conformation. *J Cell Biol* **142**:59-67.

210. **Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, and M. S. Saag.** 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* **4**:1302-7.
211. **Kinomoto, M., M. Yokoyama, H. Sato, A. Kojima, T. Kurata, K. Ikuta, T. Sata, and K. Tokunaga.** 2005. Amino acid 36 in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain controls fusogenic activity: implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor. *J Virol* **79**:5996-6004.
212. **Kirchhausen, T.** 1999. Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:705-32.
213. **Kirchhausen, T., S. C. Harrison, and J. Heuser.** 1986. Configuration of clathrin trimers: evidence from electron microscopy. *J Ultrastruct Mol Struct Res* **94**:199-208.
214. **Kirchhausen, T., P. Scarmato, S. C. Harrison, J. J. Monroe, E. P. Chow, R. J. Mattaliano, K. L. Ramachandran, J. E. Smart, A. H. Ahn, and J. Brosius.** 1987. Clathrin light chains LCA and LCB are similar, polymorphic, and share repeated heptad motifs. *Science* **236**:320-4.
215. **Klimkait, T., K. Strebel, M. D. Hoggan, M. A. Martin, and J. M. Orenstein.** 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* **64**:621-9.
216. **Kodama, T., D. P. Wooley, Y. M. Naidu, H. W. Kestler, 3rd, M. D. Daniel, Y. Li, and R. C. Desrosiers.** 1989. Significance of premature stop codons in env of simian immunodeficiency virus. *J Virol* **63**:4709-14.

217. **Kowalski, M., J. Potz, L. Basiripour, T. Dorfman, W. C. Goh, E. Terwilliger, A. Dayton, C. Rosen, W. Haseltine, and J. Sodroski.** 1987. Functional regions of the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *Science* **237**:1351-5.
218. **Kroschewski, R., A. Hall, and I. Mellman.** 1999. Cdc42 controls secretory and endocytic transport to the basolateral plasma membrane of MDCK cells. *Nat Cell Biol* **1**:8-13.
219. **Ktistakis, N. T., D. Thomas, and M. G. Roth.** 1990. Characteristics of the tyrosine recognition signal for internalization of transmembrane surface glycoproteins. *J Cell Biol* **111**:1393-407.
220. **Kundu, A., R. T. Avalos, C. M. Sanderson, and D. P. Nayak.** 1996. Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Virol* **70**:6508-15.
221. **Kutsuna, H., K. Suzuki, N. Kamata, T. Kato, F. Hato, K. Mizuno, H. Kobayashi, M. Ishii, and S. Kitagawa.** 2004. Actin reorganization and morphological changes in human neutrophils stimulated by TNF, GM-CSF, and G-CSF: the role of MAP kinases. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**:C55-64.
222. **LaBranche, C. C., M. M. Sauter, B. S. Haggarty, P. J. Vance, J. Romano, T. K. Hart, P. J. Bugelski, M. Marsh, and J. A. Hoxie.** 1995. A single amino acid change in the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane molecule increases envelope glycoprotein expression on infected cells. *J Virol* **69**:5217-27.

223. **Lagaye, S., M. Derrien, E. Menu, C. Coito, E. Tresoldi, P. Mauciere, G. Scarlatti, G. Chaouat, F. Barre-Sinoussi, and M. Bomsel.** 2001. Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection. *J Virol* **75**:4780-91.
224. **Lamaze, C., A. Dujeancourt, T. Baba, C. G. Lo, A. Benmerah, and A. Dautry-Varsat.** 2001. Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway. *Mol Cell* **7**:661-71.
225. **Lands, L. a. M., D.** 2003. Un guide pratique de la multithérapie antirétrovirale pour les personnes vivant avec le VIH/SIDA. Réseau canadien d'info-traitements sida, Toronto.
226. **Lane, H. C., H. Masur, L. C. Edgar, G. Whalen, A. H. Rook, and A. S. Fauci.** 1983. Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **309**:453-8.
227. **Lazarovits, J., H. Y. Naim, A. C. Rodriguez, R. H. Wang, E. Fire, C. Bird, Y. I. Henis, and M. G. Roth.** 1996. Endocytosis of chimeric influenza virus hemagglutinin proteins that lack a cytoplasmic recognition feature for coated pits. *J Cell Biol* **134**:339-48.
228. **Lazarovits, J., and M. Roth.** 1988. A single amino acid change in the cytoplasmic domain allows the influenza virus hemagglutinin to be endocytosed through coated pits. *Cell* **53**:743-52.
229. **Le Borgne, R., A. Alconada, U. Bauer, and B. Hoflack.** 1998. The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem* **273**:29451-61.

230. **Le Borgne, R., A. Schmidt, F. Mauxion, G. Griffiths, and B. Hoflack.** 1993. Binding of AP-1 Golgi adaptors to membranes requires phosphorylated cytoplasmic domains of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *J Biol Chem* **268**:22552-6.
231. **Le Gall, S., L. Erdtmann, S. Benichou, C. Berlioz-Torrent, L. Liu, R. Benarous, J. M. Heard, and O. Schwartz.** 1998. Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity* **8**:483-95.
232. **Lee, P. P., and M. L. Linial.** 1994. Efficient particle formation can occur if the matrix domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag is substituted by a myristylation signal. *J Virol* **68**:6644-54.
233. **Leitner, T.** 2003. HIV Sequence Compendium 2003. Los Alamos.
234. **Lemp, G. F., A. M. Hirozawa, J. B. Cohen, P. A. Derish, K. C. McKinney, and S. R. Hernandez.** 1992. Survival for women and men with AIDS. *J Infect Dis* **166**:74-9.
235. **Lemp, G. F., S. F. Payne, D. Neal, T. Temelso, and G. W. Rutherford.** 1990. Survival trends for patients with AIDS. *Jama* **263**:402-6.
236. **Lencer, W. I., T. R. Hirst, and R. K. Holmes.** 1999. Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin. *Biochim Biophys Acta* **1450**:177-90.
237. **Leser, G. P., K. J. Ector, D. T. Ng, M. A. Shaughnessy, and R. A. Lamb.** 1999. The signal for clathrin-mediated endocytosis of the paramyxovirus SV5 HN protein resides at the transmembrane domain-ectodomain boundary region. *Virology* **262**:79-92.
238. **Letourneur, F., and R. D. Klausner.** 1992. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* **69**:1143-57.

239. **Letvin, N. L.** 2002. Strategies for an HIV vaccine. *J Clin Invest* **110**:15-20.
240. **Levy, J. A.** 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* **57**:183-289.
241. **Li, S., C. P. Hill, W. I. Sundquist, and J. T. Finch.** 2000. Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein. *Nature* **407**:409-13.
242. **Li, Y., L. Luo, N. Rasool, and C. Y. Kang.** 1993. Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J Virol* **67**:584-8.
243. **Li, Y., L. Luo, D. Y. Thomas, and C. Y. Kang.** 1994. Control of expression, glycosylation, and secretion of HIV-1 gp120 by homologous and heterologous signal sequences. *Virology* **204**:266-78.
244. **Lisanti, M. P., I. W. Caras, M. A. Davitz, and E. Rodriguez-Boulan.** 1989. A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* **109**:2145-56.
245. **Lisanti, M. P., P. E. Scherer, J. Vidugiriene, Z. Tang, A. Hermanowski-Vosatka, Y. H. Tu, R. F. Cook, and M. Sargiacomo.** 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol* **126**:111-26.
246. **Liu, J., W. Shu, M. B. Fagan, J. H. Nunberg, and M. Lu.** 2001. Structural and functional analysis of the HIV gp41 core containing an Ile573 to Thr substitution: implications for membrane fusion. *Biochemistry* **40**:2797-807.

247. **Lodge, R., L. Delamarre, J. P. Lalonde, J. Alvarado, D. A. Sanders, M. C. Dokhelar, E. A. Cohen, and G. Lemay.** 1997. Two distinct oncornaviruses harbor an intracytoplasmic tyrosine-based basolateral targeting signal in their viral envelope glycoprotein. *J Virol* **71**:5696-702.
248. **Lodge, R., H. Gottlinger, D. Gabuzda, E. A. Cohen, and G. Lemay.** 1994. The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J Virol* **68**:4857-61.
249. **Lodge, R., J. P. Lalonde, G. Lemay, and E. A. Cohen.** 1997. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *Embo J* **16**:695-705.
250. **Lodge, R., R. A. Subbramanian, J. Forget, G. Lemay, and E. A. Cohen.** 1998. MuLV-based vectors pseudotyped with truncated HIV glycoproteins mediate specific gene transfer in CD4+ peripheral blood lymphocytes. *Gene Ther* **5**:655-64.
251. **Lohse, M. J., J. L. Benovic, J. Codina, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz.** 1990. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**:1547-50.
252. **Low, S. H., S. J. Chapin, C. Wimmer, S. W. Whiteheart, L. G. Komuves, K. E. Mostov, and T. Weimbs.** 1998. The SNARE machinery is involved in apical plasma membrane trafficking in MDCK cells. *J Cell Biol* **141**:1503-13.
253. **Lu, M., M. O. Stoller, S. Wang, J. Liu, M. B. Fagan, and J. H. Nunberg.** 2001. Structural and functional analysis of interhelical interactions in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein by alanine-scanning mutagenesis. *J Virol* **75**:11146-56.

254. **Luciw, P. A., K. E. Shaw, B. L. Shacklett, and M. L. Marthas.** 1998. Importance of the intracytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus (SIV) envelope glycoprotein for pathogenesis. *Virology* **252**:9-16.
255. **Luton, F., M. H. Cardone, M. Zhang, and K. E. Mostov.** 1998. Role of tyrosine phosphorylation in ligand-induced regulation of transcytosis of the polymeric Ig receptor. *Mol Biol Cell* **9**:1787-802.
256. **Luttrell, L. M., S. S. Ferguson, Y. Daaka, W. E. Miller, S. Maudsley, G. J. Della Rocca, F. Lin, H. Kawakatsu, K. Owada, D. K. Luttrell, M. G. Caron, and R. J. Lefkowitz.** 1999. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science* **283**:655-61.
257. **Macias, M. J., S. Wiesner, and M. Sudol.** 2002. WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett* **513**:30-7.
258. **Madara, J. L.** 1988. Tight junction dynamics: is paracellular transport regulated? *Cell* **53**:497-8.
259. **Maisner, A., M. K. Liszewski, J. P. Atkinson, R. Schwartz-Albiez, and G. Herrler.** 1996. Two different cytoplasmic tails direct isoforms of the membrane cofactor protein (CD46) to the basolateral surface of Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* **271**:18853-8.
260. **Maley, F., R. B. Trimble, A. L. Tarentino, and T. H. Plummer, Jr.** 1989. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. *Anal Biochem* **180**:195-204.
261. **Malim, M. H., and B. R. Cullen.** 1993. Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol Cell Biol* **13**:6180-9.

262. **Mammano, F., A. Ohagen, S. Hoglund, and H. G. Gottlinger.** 1994. Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J Virol* **68**:4927-36.
263. **Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin, and D. Trono.** 2003. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature* **424**:99-103.
264. **Marin, M., K. M. Rose, S. L. Kozak, and D. Kabat.** 2003. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* **9**:1398-403.
265. **Marino, M., D. Andrews, D. Brown, and R. T. McCluskey.** 2001. Transcytosis of retinol-binding protein across renal proximal tubule cells after megalin (gp 330)-mediated endocytosis. *J Am Soc Nephrol* **12**:637-48.
266. **Marino, M., G. Zheng, L. Chiovato, A. Pinchera, D. Brown, D. Andrews, and R. T. McCluskey.** 2000. Role of megalin (gp330) in transcytosis of thyroglobulin by thyroid cells. A novel function in the control of thyroid hormone release. *J Biol Chem* **275**:7125-37.
267. **Markel, H.** 2005. The search for effective HIV vaccines. *N Engl J Med* **353**:753-7.
268. **Marks, M. S., L. Woodruff, H. Ohno, and J. S. Bonifacino.** 1996. Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J Cell Biol* **135**:341-54.
269. **Martin, G., Y. Beausejour, J. Thibodeau, and M. J. Tremblay.** 2005. Envelope glycoproteins are dispensable for insertion of host HLA-DR molecules within nascent human immunodeficiency virus type 1 particles. *Virology* **335**:286-90.

270. **Martin, R. A., and D. P. Nayak.** 1996. Mutational analysis of HIV-1 gp160-mediated receptor interference: intracellular complex formation. *Virology* **220**:461-72.
271. **Martin-Serrano, J., D. Perez-Caballero, and P. D. Bieniasz.** 2004. Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *J Virol* **78**:5554-63.
272. **Martin-Serrano, J., A. Yarovoy, D. Perez-Caballero, and P. D. Bieniasz.** 2003. Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:12414-9.
273. **Matter, K., W. Hunziker, and I. Mellman.** 1992. Basolateral sorting of LDL receptor in MDCK cells: the cytoplasmic domain contains two tyrosine-dependent targeting determinants. *Cell* **71**:741-53.
274. **Matter, K., E. M. Yamamoto, and I. Mellman.** 1994. Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J Cell Biol* **126**:991-1004.
275. **McArthur, J. C., B. J. Brew, and A. Nath.** 2005. Neurological complications of HIV infection. *Lancet Neurol* **4**:543-55.
276. **McCune, J. M., L. B. Rabin, M. B. Feinberg, M. Lieberman, J. C. Kosek, G. R. Reyes, and I. L. Weissman.** 1988. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53**:55-67.
277. **McCurdy, L. H., and B. S. Graham.** 2003. Role of plasma membrane lipid microdomains in respiratory syncytial virus filament formation. *J Virol* **77**:1747-56.

278. **McCutchan, F. E.** 2000. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *Aids* **14 Suppl 3**:S31-44.
279. **McElrath, M. J., L. Corey, D. Montefiori, M. Wolff, D. Schwartz, M. Keefer, R. Belshe, B. S. Graham, T. Matthews, P. Wright, G. Gorse, R. Dolin, P. Berman, D. Francis, A. M. Duliege, D. Bolognesi, D. Stablein, N. Ketter, and P. Fast.** 2000. A phase II study of two HIV type 1 envelope vaccines, comparing their immunogenicity in populations at risk for acquiring HIV type 1 infection. AIDS Vaccine Evaluation Group. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**:907-19.
280. **McNiven, M. A.** 1998. Dynamin: a molecular motor with pinchase action. *Cell* **94**:151-4.
281. **McQueen, N., D. P. Nayak, E. B. Stephens, and R. W. Compans.** 1986. Polarized expression of a chimeric protein in which the transmembrane and cytoplasmic domains of the influenza virus hemagglutinin have been replaced by those of the vesicular stomatitis virus G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:9318-22.
282. **Mely, Y., N. Jullian, N. Morellet, H. De Rocquigny, C. Z. Dong, E. Piemont, B. P. Roques, and D. Gerard.** 1994. Spatial proximity of the HIV-1 nucleocapsid protein zinc fingers investigated by time-resolved fluorescence and fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* **33**:12085-91.
283. **Michalak, M., R. E. Milner, K. Burns, and M. Opas.** 1992. Calreticulin. *Biochem J* **285 (Pt 3)**:681-92.
284. **Milici, A. J., N. E. Watrous, H. Stukenbrok, and G. E. Palade.** 1987. Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J Cell Biol* **105**:2603-12.
285. **Milman, G., and O. Sharma.** 1994. Mechanisms of HIV/SIV mucosal transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**:1305-12.

286. **Mitchell, D. M., and J. M. Ball.** 2004. Characterization of a spontaneously polarizing HT-29 cell line, HT-29/cl.f8. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **40**:297-302.
287. **Miyauchi, K., J. Komano, Y. Yokomaku, W. Sugiura, N. Yamamoto, and Z. Matsuda.** 2005. Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion. *J Virol* **79**:4720-9.
288. **Moll, M., H. D. Klenk, G. Herrler, and A. Maisner.** 2001. A single amino acid change in the cytoplasmic domains of measles virus glycoproteins H and F alters targeting, endocytosis, and cell fusion in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* **276**:17887-94.
289. **Moll, M., J. Pfeuffer, H. D. Klenk, S. Niewiesk, and A. Maisner.** 2004. Polarized glycoprotein targeting affects the spread of measles virus in vitro and in vivo. *J Gen Virol* **85**:1019-27.
290. **Montesano, R., J. Roth, A. Robert, and L. Orci.** 1982. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* **296**:651-3.
291. **Mora, R., E. Rodriguez-Boulan, P. Palese, and A. Garcia-Sastre.** 2002. Apical budding of a recombinant influenza A virus expressing a hemagglutinin protein with a basolateral localization signal. *J Virol* **76**:3544-53.
292. **Morita, E., and W. I. Sundquist.** 2004. Retrovirus budding. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**:395-425.
293. **Mostov, K. E., M. Verges, and Y. Altschuler.** 2000. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* **12**:483-90.

294. **Murakami, T., and E. O. Freed.** 2000. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J Virol* **74**:3548-54.
295. **Murakami, T., and E. O. Freed.** 2000. The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:343-8.
296. **Naim, H. Y., and M. G. Roth.** 1994. Characteristics of the internalization signal in the Y543 influenza virus hemagglutinin suggest a model for recognition of internalization signals containing tyrosine. *J Biol Chem* **269**:3928-33.
297. **Nakata, T., R. Takemura, and N. Hirokawa.** 1993. A novel member of the dynamin family of GTP-binding proteins is expressed specifically in the testis. *J Cell Sci* **105 (Pt 1)**:1-5.
298. **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.
299. **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.
300. **Nieva, J. L., S. Nir, A. Muga, F. M. Goni, and J. Wilschut.** 1994. Interaction of the HIV-1 fusion peptide with phospholipid vesicles: different structural requirements for fusion and leakage. *Biochemistry* **33**:3201-9.
301. **Nikko, E., A. M. Marini, and B. Andre.** 2003. Permease recycling and ubiquitination status reveal a particular role for Bro1 in the multivesicular body pathway. *J Biol Chem* **278**:50732-43.

302. **Nishimura, N., and W. E. Balch.** 1997. A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* **277**:556-8.
303. **Oberlin, E., A. Amara, F. Bachelier, C. Bessia, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, O. Schwartz, J. M. Heard, I. Clark-Lewis, D. F. Legler, M. Loetscher, M. Baggiolini, and B. Moser.** 1996. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* **382**:833-5.
304. **Ochsenbauer, C., S. R. Dubay, and E. Hunter.** 2000. The Rous sarcoma virus Env glycoprotein contains a highly conserved motif homologous to tyrosine-based endocytosis signals and displays an unusual internalization phenotype. *Mol Cell Biol* **20**:249-60.
305. **Oh, P., D. P. McIntosh, and J. E. Schnitzer.** 1998. Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J Cell Biol* **141**:101-14.
306. **Ohno, H., R. C. Aguilar, M. C. Fournier, S. Hennecke, P. Cosson, and J. S. Bonifacino.** 1997. Interaction of endocytic signals from the HIV-1 envelope glycoprotein complex with members of the adaptor medium chain family. *Virology* **238**:305-15.
307. **Ohno, H., R. C. Aguilar, D. Yeh, D. Taura, T. Saito, and J. S. Bonifacino.** 1998. The medium subunits of adaptor complexes recognize distinct but overlapping sets of tyrosine-based sorting signals. *J Biol Chem* **273**:25915-21.
308. **Ohno, H., M. C. Fournier, G. Poy, and J. S. Bonifacino.** 1996. Structural determinants of interaction of tyrosine-based sorting signals with the adaptor medium chains. *J Biol Chem* **271**:29009-15.

309. **Ohno, H., J. Stewart, M. C. Fournier, H. Bosshart, I. Rhee, S. Miyatake, T. Saito, A. Gallusser, T. Kirchhausen, and J. S. Bonifacino.** 1995. Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* **269**:1872-5.
310. **Ohno, H., T. Tomemori, F. Nakatsu, Y. Okazaki, R. C. Aguilar, H. Foelsch, I. Mellman, T. Saito, T. Shirasawa, and J. S. Bonifacino.** 1999. Mu1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Lett* **449**:215-20.
311. **Okamoto, P. M., J. S. Herskovits, and R. B. Vallee.** 1997. Role of the basic, proline-rich region of dynamin in Src homology 3 domain binding and endocytosis. *J Biol Chem* **272**:11629-35.
312. **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.
313. **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.
314. **ONUSIDA/OMS.** 2004. Le point sur l'épidémie de SIDA, Genève.
315. **Osmanov, S., C. Pattou, N. Walker, B. Schwardlander, and J. Esparza.** 2002. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J Acquir Immune Defic Syndr* **29**:184-90.
316. **Ostermann, J., L. Orci, K. Tani, M. Amherdt, M. Ravazzola, Z. Elazar, and J. E. Rothman.** 1993. Stepwise assembly of functionally active transport vesicles. *Cell* **75**:1015-25.

317. **Ott, D. E., L. V. Coren, E. N. Chertova, T. D. Gagliardi, and U. Schubert.** 2000. Ubiquitination of HIV-1 and MuLV Gag. *Virology* **278**:111-21.
318. **Ott, D. E., L. V. Coren, T. D. Copeland, B. P. Kane, D. G. Johnson, R. C. Sowder, 2nd, Y. Yoshinaka, S. Oroszlan, L. O. Arthur, and L. E. Henderson.** 1998. Ubiquitin is covalently attached to the p6Gag proteins of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus and to the p12Gag protein of Moloney murine leukemia virus. *J Virol* **72**:2962-8.
319. **Otteken, A., and B. Moss.** 1996. Calreticulin interacts with newly synthesized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein, suggesting a chaperone function similar to that of calnexin. *J Biol Chem* **271**:97-103.
320. **Owen, D. J., and P. R. Evans.** 1998. A structural explanation for the recognition of tyrosine-based endocytotic signals. *Science* **282**:1327-32.
321. **Owens, R. J., C. Burke, and J. K. Rose.** 1994. Mutations in the membrane-spanning domain of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein that affect fusion activity. *J Virol* **68**:570-4.
322. **Owens, R. J., J. W. Dubay, E. Hunter, and R. W. Compans.** 1991. Human immunodeficiency virus envelope protein determines the site of virus release in polarized epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:3987-91.
323. **Page, L. J., and M. S. Robinson.** 1995. Targeting signals and subunit interactions in coated vesicle adaptor complexes. *J Cell Biol* **131**:619-30.

324. **Pal, R., G. M. Hoke, and M. G. Sarngadharan.** 1989. Role of oligosaccharides in the processing and maturation of envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:3384-8.
325. **Pantaleo, G., C. Graziosi, J. F. Demarest, L. Butini, M. Montroni, C. H. Fox, J. M. Orenstein, D. P. Kotler, and A. S. Fauci.** 1993. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* **362**:355-8.
326. **Parent, L. J., R. P. Bennett, R. C. Craven, T. D. Nelle, N. K. Krishna, J. B. Bowzard, C. B. Wilson, B. A. Puffer, R. C. Montelaro, and J. W. Wills.** 1995. Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J Virol* **69**:5455-60.
327. **Pauloin, A., and P. Jolles.** 1984. Internal control of the coated vesicle pp50-specific kinase complex. *Nature* **311**:265-7.
328. **Paxton, W., R. I. Connor, and N. R. Landau.** 1993. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol* **67**:7229-37.
329. **Payne, G. S., and R. Schekman.** 1985. A test of clathrin function in protein secretion and cell growth. *Science* **230**:1009-14.
330. **Pearse, B. M.** 1985. Assembly of the mannose-6-phosphate receptor into reconstituted clathrin coats. *Embo J* **4**:2457-60.
331. **Pearse, B. M.** 1987. Clathrin and coated vesicles. *Embo J* **6**:2507-12.
332. **Peitzsch, R. M., and S. McLaughlin.** 1993. Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* **32**:10436-43.

333. **Pelkmans, L., J. Kartenbeck, and A. Helenius.** 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* **3**:473-83.
334. **Peters, K. R., W. W. Carley, and G. E. Palade.** 1985. Endothelial plasmalemmal vesicles have a characteristic striped bipolar surface structure. *J Cell Biol* **101**:2233-8.
335. **Pfeiffer, T., H. Zentgraf, B. Freyaldenhoven, and V. Bosch.** 1997. Transfer of endoplasmic reticulum and Golgi retention signals to human immunodeficiency virus type 1 gp160 inhibits intracellular transport and proteolytic processing of viral glycoprotein but does not influence the cellular site of virus particle budding. *J Gen Virol* **78 (Pt 7)**:1745-53.
336. **Phillips, D. M., and A. S. Bourinbaier.** 1992. Mechanism of HIV spread from lymphocytes to epithelia. *Virology* **186**:261-73.
337. **Piguet, V., L. Wan, C. Borel, A. Mangasarian, N. Demaurex, G. Thomas, and D. Trono.** 2000. HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes. *Nat Cell Biol* **2**:163-7.
338. **Pixley, F. J., Y. Xiong, R. Y. Yu, E. A. Sahai, E. R. Stanley, and B. H. Ye.** 2005. BCL6 suppresses RhoA activity to alter macrophage morphology and motility. *J Cell Sci* **118**:1873-83.
339. **Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo.** 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:7415-9.

340. **Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, M. S. Reitz, V. S. Kalyanaraman, and R. C. Gallo.** 1981. Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia. *Nature* **294**:268-71.
341. **Poon, D. T., L. V. Coren, and D. E. Ott.** 2000. Efficient incorporation of HLA class II onto human immunodeficiency virus type 1 requires envelope glycoprotein packaging. *J Virol* **74**:3918-23.
342. **Popov, S., M. Rexach, G. Zybarth, N. Reiling, M. A. Lee, L. Ratner, C. M. Lane, M. S. Moore, G. Blobel, and M. Bukrinsky.** 1998. Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *Embo J* **17**:909-17.
343. **Popovic, M., M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo.** 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**:497-500.
344. **Praefcke, G. J., M. G. Ford, E. M. Schmid, L. E. Olesen, J. L. Gallop, S. Y. Peak-Chew, Y. Vallis, M. M. Babu, I. G. Mills, and H. T. McMahon.** 2004. Evolving nature of the AP2 alpha-appendage hub during clathrin-coated vesicle endocytosis. *Embo J* **23**:4371-83.
345. **Price, D. H.** 2000. P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **20**:2629-34.
346. **Prill, V., L. Lehmann, K. von Figura, and C. Peters.** 1993. The cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase contains overlapping but distinct signals for basolateral sorting and rapid internalization in polarized MDCK cells. *Embo J* **12**:2181-93.
347. **Pullen, K. A., L. K. Ishimoto, and J. J. Champoux.** 1992. Incomplete removal of the RNA primer for minus-strand DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *J Virol* **66**:367-73.

348. **Rabito, C. A., J. I. Kreisberg, and D. Wight.** 1984. Alkaline phosphatase and gamma-glutamyl transpeptidase as polarization markers during the organization of LLC-PK1 cells into an epithelial membrane. *J Biol Chem* **259**:574-82.
349. **Racoosin, E. L., and J. A. Swanson.** 1993. Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J Cell Biol* **121**:1011-20.
350. **Racoosin, E. L., and J. A. Swanson.** 1992. M-CSF-induced macropinocytosis increases solute endocytosis but not receptor-mediated endocytosis in mouse macrophages. *J Cell Sci* **102 (Pt 4)**:867-80.
351. **Ramalingam, T. S., S. A. Detmer, W. L. Martin, and P. J. Bjorkman.** 2002. IgG transcytosis and recycling by FcRn expressed in MDCK cells reveals ligand-induced redistribution. *Embo J* **21**:590-601.
352. **Rapoport, I., Y. C. Chen, P. Cupers, S. E. Shoelson, and T. Kirchhausen.** 1998. Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *Embo J* **17**:2148-55.
353. **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.
354. **Reggiori, F., and H. R. Pelham.** 2001. Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *Embo J* **20**:5176-86.
355. **Reil, H., A. A. Bukovsky, H. R. Gelderblom, and H. G. Gottlinger.** 1998. Efficient HIV-1 replication can occur in the absence of the viral matrix protein. *Embo J* **17**:2699-708.

356. **Resh, M. D.** 1994. Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* **76**:411-3.
357. **Rhim, H., J. Park, and C. D. Morrow.** 1991. Deletions in the tRNA(Lys) primer-binding site of human immunodeficiency virus type 1 identify essential regions for reverse transcription. *J Virol* **65**:4555-64.
358. **Rizzuto, C. D., and J. G. Sodroski.** 1997. Contribution of virion ICAM-1 to human immunodeficiency virus infectivity and sensitivity to neutralization. *J Virol* **71**:4847-51.
359. **Rizzuto, C. D., R. Wyatt, N. Hernandez-Ramos, Y. Sun, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, and J. Sodroski.** 1998. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**:1949-53.
360. **Robertson, D. L., J. P. Anderson, J. A. Bradac, J. K. Carr, B. Foley, R. K. Funkhouser, F. Gao, B. H. Hahn, M. L. Kalish, C. Kuiken, G. H. Learn, T. Leitner, F. McCutchan, S. Osmanov, M. Peeters, D. Pieniazek, M. Salminen, P. M. Sharp, S. Wolinsky, and B. Korber.** 2000. HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**:55-6.
361. **Rodewald, R.** 1976. pH-dependent binding of immunoglobulins to intestinal cells of the neonatal rat. *J Cell Biol* **71**:666-9.
362. **Rodionov, D. G., and O. Bakke.** 1998. Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain. *J Biol Chem* **273**:6005-8.
363. **Roe, T., S. A. Chow, and P. O. Brown.** 1997. 3'-end processing and kinetics of 5'-end joining during retroviral integration in vivo. *J Virol* **71**:1334-40.

364. **Rohrer, J., A. Schweizer, D. Russell, and S. Kornfeld.** 1996. The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J Cell Biol* **132**:565-76.
365. **Rosenberg, Z. F., and A. S. Fauci.** 1989. The immunopathogenesis of HIV infection. *Adv Immunol* **47**:377-431.
366. **Roth, M. G., D. Gundersen, N. Patil, and E. Rodriguez-Boulan.** 1987. The large external domain is sufficient for the correct sorting of secreted or chimeric influenza virus hemagglutinins in polarized monkey kidney cells. *J Cell Biol* **104**:769-82.
367. **Roth, M. J., P. L. Schwartzberg, and S. P. Goff.** 1989. Structure of the termini of DNA intermediates in the integration of retroviral DNA: dependence on IN function and terminal DNA sequence. *Cell* **58**:47-54.
368. **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.
369. **Rothen-Rutishauser, B., S. D. Kramer, A. Braun, M. Gunthert, and H. Wunderli-Allenspach.** 1998. MDCK cell cultures as an epithelial in vitro model: cytoskeleton and tight junctions as indicators for the definition of age-related stages by confocal microscopy. *Pharm Res* **15**:964-71.
370. **Rousso, I., M. B. Mixon, B. K. Chen, and P. S. Kim.** 2000. Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13523-5.
371. **Rowell, J. F., P. E. Stanhope, and R. F. Siliciano.** 1995. Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. *J Immunol* **155**:473-88.

372. **Roy, J., G. Martin, J. F. Giguere, D. Belanger, M. Petrin, and M. J. Tremblay.** 2005. HIV type 1 can act as an APC upon acquisition from the host cell of peptide-loaded HLA-DR and CD86 molecules. *J Immunol* **174**:4779-88.
373. **Salazar-Fontana, L. I., V. Barr, L. E. Samelson, and B. E. Bierer.** 2003. CD28 engagement promotes actin polymerization through the activation of the small Rho GTPase Cdc42 in human T cells. *J Immunol* **171**:2225-32.
374. **Saltarelli, M. J., E. Hadziyannis, C. E. Hart, J. V. Harrison, B. K. Felber, T. J. Spira, and G. N. Pavlakis.** 1996. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 mRNA splicing patterns during disease progression in peripheral blood mononuclear cells from infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**:1443-56.
375. **Salzwedel, K., J. T. West, and E. Hunter.** 1999. A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity. *J Virol* **73**:2469-80.
376. **Salzwedel, K., J. T. West, Jr., M. J. Mulligan, and E. Hunter.** 1998. Retention of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum does not redirect virus assembly from the plasma membrane. *J Virol* **72**:7523-31.
377. **Sandefur, S., R. M. Smith, V. Varthakavi, and P. Spearman.** 2000. Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag). *J Virol* **74**:7238-49.
378. **Sanger, C., E. Muhlberger, E. Ryabchikova, L. Kolesnikova, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2001. Sorting of Marburg virus surface protein and virus release take place at opposite surfaces of infected polarized epithelial cells. *J Virol* **75**:1274-83.

379. **Sattentau, Q. J., P. R. Clapham, R. A. Weiss, P. C. Beverley, L. Montagnier, M. F. Alhalabi, J. C. Gluckmann, and D. Klatzmann.** 1988. The human and simian immunodeficiency viruses HIV-1, HIV-2 and SIV interact with similar epitopes on their cellular receptor, the CD4 molecule. *Aids* **2**:101-5.
380. **Sauter, M. M., A. Pelchen-Matthews, R. Bron, M. Marsh, C. C. LaBranche, P. J. Vance, J. Romano, B. S. Haggarty, T. K. Hart, W. M. Lee, and J. A. Hoxie.** 1996. An internalization signal in the simian immunodeficiency virus transmembrane protein cytoplasmic domain modulates expression of envelope glycoproteins on the cell surface. *J Cell Biol* **132**:795-811.
381. **Scheiffele, P., M. G. Roth, and K. Simons.** 1997. Interaction of influenza virus haemagglutinin with sphingolipid-cholesterol membrane domains via its transmembrane domain. *Embo J* **16**:5501-8.
382. **Schlossman, D. M., S. L. Schmid, W. A. Braell, and J. E. Rothman.** 1984. An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J Cell Biol* **99**:723-33.
383. **Schmid, A., P. Spielhofer, R. Cattaneo, K. Baczko, V. ter Meulen, and M. A. Billeter.** 1992. Subacute sclerosing panencephalitis is typically characterized by alterations in the fusion protein cytoplasmic domain of the persisting measles virus. *Virology* **188**:910-5.
384. **Schmid, S. L., W. A. Braell, D. M. Schlossman, and J. E. Rothman.** 1984. A role for clathrin light chains in the recognition of clathrin cages by 'uncoating ATPase'. *Nature* **311**:228-31.
385. **Schmid, S. L., and L. L. Carter.** 1990. ATP is required for receptor-mediated endocytosis in intact cells. *J Cell Biol* **111**:2307-18.

386. **Schmid, S. L., M. A. McNiven, and P. De Camilli.** 1998. Dynamain and its partners: a progress report. *Curr Opin Cell Biol* **10**:504-12.
387. **Schmitz, J. E., M. J. Kuroda, S. Santra, V. G. Sasseville, M. A. Simon, M. A. Lifton, P. Racz, K. Tenner-Racz, M. Dalesandro, B. J. Scallon, J. Ghrayeb, M. A. Forman, D. C. Montefiori, E. P. Rieber, N. L. Letvin, and K. A. Reimann.** 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* **283**:857-60.
388. **Schnittman, S. M., H. C. Lane, J. Greenhouse, J. S. Justement, M. Baseler, and A. S. Fauci.** 1990. Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:6058-62.
389. **Schnitzer, J. E., P. Oh, and D. P. McIntosh.** 1996. Role of GTP hydrolysis in fission of caveolae directly from plasma membranes. *Science* **274**:239-42.
390. **Schubert, U., S. Bour, A. V. Ferrer-Montiel, M. Montal, F. Maldarell, and K. Strebel.** 1996. The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains. *J Virol* **70**:809-19.
391. **Schubert, U., D. E. Ott, E. N. Chertova, R. Welker, U. Tessmer, M. F. Princiotta, J. R. Bennink, H. G. Krausslich, and J. W. Yewdell.** 2000. Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:13057-62.
392. **Seage, G. R., 3rd, S. Oddleifson, E. Carr, B. Shea, L. Makarewicz-Robert, M. van Beuzekom, and A. De Maria.** 1993. Survival with AIDS in Massachusetts, 1979 to 1989. *Am J Public Health* **83**:72-8.

393. **Shacklett, B. L., C. J. Weber, K. E. Shaw, E. M. Keddie, M. B. Gardner, P. Sonigo, and P. A. Luciw.** 2000. The intracytoplasmic domain of the Env transmembrane protein is a locus for attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac in rhesus macaques. *J Virol* **74**:5836-44.
394. **Sharp, P. M., E. Bailes, R. R. Chaudhuri, C. M. Rodenburg, M. O. Santiago, and B. H. Hahn.** 2001. The origins of acquired immune deficiency syndrome viruses: where and when? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**:867-76.
395. **Shata, M. T., M. S. Reitz, Jr., A. L. DeVico, G. K. Lewis, and D. M. Hone.** 2001. Mucosal and systemic HIV-1 Env-specific CD8(+) T-cells develop after intragastric vaccination with a Salmonella Env DNA vaccine vector. *Vaccine* **20**:623-9.
396. **Sherman, M. P., C. M. de Noronha, D. Pearce, and W. C. Greene.** 2000. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr contains two leucine-rich helices that mediate glucocorticoid receptor coactivation independently of its effects on G(2) cell cycle arrest. *J Virol* **74**:8159-65.
397. **Sherman, M. P., and W. C. Greene.** 2002. Slipping through the door: HIV entry into the nucleus. *Microbes Infect* **4**:67-73.
398. **Shin, J. S., Z. Gao, and S. N. Abraham.** 2000. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science* **289**:785-8.
399. **Shioda, T., J. A. Levy, and C. Cheng-Mayer.** 1991. Macrophage and T cell-line tropisms of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. *Nature* **349**:167-9.
400. **Shpetner, H. S., J. S. Herskovits, and R. B. Vallee.** 1996. A binding site for SH3 domains targets dynamin to coated pits. *J Biol Chem* **271**:13-6.

401. **Shupliakov, O., P. Low, D. Grabs, H. Gad, H. Chen, C. David, K. Takei, P. De Camilli, and L. Brodin.** 1997. Synaptic vesicle endocytosis impaired by disruption of dynamin-SH3 domain interactions. *Science* **276**:259-63.
402. **Silveira, L. A., D. H. Wong, F. R. Masiarz, and R. Schekman.** 1990. Yeast clathrin has a distinctive light chain that is important for cell growth. *J Cell Biol* **111**:1437-49.
403. **Simmen, T., S. Honing, A. Icking, R. Tikkanen, and W. Hunziker.** 2002. AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* **4**:154-9.
404. **Simons, K., and S. D. Fuller.** 1985. Cell surface polarity in epithelia. *Annu Rev Cell Biol* **1**:243-88.
405. **Simons, K., and G. van Meer.** 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**:6197-202.
406. **Singer, K. L., and K. E. Mostov.** 1998. Dimerization of the polymeric immunoglobulin receptor controls its transcytotic trafficking. *Mol Biol Cell* **9**:901-15.
407. **Sirven, A., F. Pflumio, V. Zennou, M. Titeux, W. Vainchenker, L. Coulombel, A. Dubart-Kupperschmitt, and P. Charneau.** 2000. The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells. *Blood* **96**:4103-10.
408. **Smart, E. J., G. A. Graf, M. A. McNiven, W. C. Sessa, J. A. Engelman, P. E. Scherer, T. Okamoto, and M. P. Lisanti.** 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* **19**:7289-304.

409. **Smith, J. S., and M. J. Roth.** 1992. Specificity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H in removal of the minus-strand primer, tRNA(Lys3). *J Biol Chem* **267**:15071-9.
410. **Sodroski, J., W. C. Goh, C. Rosen, K. Campbell, and W. A. Haseltine.** 1986. Role of the HTLV-III/LAV envelope in syncytium formation and cytopathicity. *Nature* **322**:470-4.
411. **Song, C., S. R. Dubay, and E. Hunter.** 2003. A tyrosine motif in the cytoplasmic domain of mason-pfizer monkey virus is essential for the incorporation of glycoprotein into virions. *J Virol* **77**:5192-200.
412. **Sontag, J. M., E. M. Fykse, Y. Ushkaryov, J. P. Liu, P. J. Robinson, and T. C. Sudhof.** 1994. Differential expression and regulation of multiple dynamins. *J Biol Chem* **269**:4547-54.
413. **Spearman, P.** 2003. HIV vaccine development: lessons from the past and promise for the future. *Curr HIV Res* **1**:101-20.
414. **Spearman, P., J. J. Wang, N. Vander Heyden, and L. Ratner.** 1994. Identification of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein domains essential to membrane binding and particle assembly. *J Virol* **68**:3232-42.
415. **Speck, R. F., K. Wehrly, E. J. Platt, R. E. Atchison, I. F. Charo, D. Kabat, B. Chesebro, and M. A. Goldsmith.** 1997. Selective employment of chemokine receptors as human immunodeficiency virus type 1 coreceptors determined by individual amino acids within the envelope V3 loop. *J Virol* **71**:7136-9.
416. **Steinman, R. M., and J. Swanson.** 1995. The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* **182**:283-8.

417. **Stoorvogel, W., V. Oorschot, and H. J. Geuze.** 1996. A novel class of clathrin-coated vesicles budding from endosomes. *J Cell Biol* **132**:21-33.
418. **Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H. G. Gottlinger.** 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* **114**:689-99.
419. **Strack, B., A. Calistri, and H. G. Gottlinger.** 2002. Late assembly domain function can exhibit context dependence and involves ubiquitin residues implicated in endocytosis. *J Virol* **76**:5472-9.
420. **Stremlau, M., C. M. Owens, M. J. Perron, M. Kiessling, P. Autissier, and J. Sodroski.** 2004. The cytoplasmic body component TRIM5 α restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427**:848-53.
421. **Tashiro, M., E. Pritzer, M. A. Khoshnan, M. Yamakawa, K. Kuroda, H. D. Klenk, R. Rott, and J. T. Seto.** 1988. Characterization of a pantropic variant of Sendai virus derived from a host range mutant. *Virology* **165**:577-83.
422. **Tashiro, M., J. T. Seto, S. Choosakul, M. Yamakawa, H. D. Klenk, and R. Rott.** 1992. Budding site of Sendai virus in polarized epithelial cells is one of the determinants for tropism and pathogenicity in mice. *Virology* **187**:413-22.
423. **Tashiro, M., M. Yamakawa, K. Tobita, H. D. Klenk, R. Rott, and J. T. Seto.** 1990. Organ tropism of Sendai virus in mice: proteolytic activation of the fusion glycoprotein in mouse organs and budding site at the bronchial epithelium. *J Virol* **64**:3627-34.
424. **Taube, R., K. Fujinaga, J. Wimmer, M. Barboric, and B. M. Peterlin.** 1999. Tat transactivation: a model for the regulation of eukaryotic transcriptional elongation. *Virology* **264**:245-53.

425. **Taylor, G. M., and D. A. Sanders.** 2003. Structural criteria for regulation of membrane fusion and virion incorporation by the murine leukemia virus TM cytoplasmic domain. *Virology* **312**:295-305.
426. **Taylor, J. M.** 1977. An analysis of the role of tRNA species as primers for the transcription into DNA of RNA tumor virus genomes. *Biochim Biophys Acta* **473**:57-71.
427. **Thali, M., M. Charles, C. Furman, L. Cavacini, M. Posner, J. Robinson, and J. Sodroski.** 1994. Resistance to neutralization by broadly reactive antibodies to the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein conferred by a gp41 amino acid change. *J Virol* **68**:674-80.
428. **Thomas, D. C., C. B. Brewer, and M. G. Roth.** 1993. Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J Biol Chem* **268**:3313-20.
429. **Tindall, B., and D. A. Cooper.** 1991. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *Aids* **5**:1-14.
430. **Tisdale, M., T. Schulze, B. A. Larder, and K. Moelling.** 1991. Mutations within the RNase H domain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase abolish virus infectivity. *J Gen Virol* **72 (Pt 1)**:59-66.
431. **Tobiume, M., J. E. Lineberger, C. A. Lundquist, M. D. Miller, and C. Aiken.** 2003. Nef does not affect the efficiency of human immunodeficiency virus type 1 fusion with target cells. *J Virol* **77**:10645-50.
432. **Tran, D., J. L. Carpentier, F. Sawano, P. Gorden, and L. Orci.** 1987. Ligands internalized through coated or noncoated invaginations follow a common intracellular pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:7957-61.

433. **Traub, L. M.** 2003. Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection. *J Cell Biol* **163**:203-8.
434. **Tremblay, M. J., J. F. Fortin, and R. Cantin.** 1998. The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunol Today* **19**:346-51.
435. **Tristem, M., C. Marshall, A. Karpas, and F. Hill.** 1992. Evolution of the primate lentiviruses: evidence from vpx and vpr. *Embo J* **11**:3405-12.
436. **Trowbridge, I. S., J. F. Collawn, and C. R. Hopkins.** 1993. Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Biol* **9**:129-61.
437. **Tucker, S. P., and R. W. Compans.** 1993. Virus infection of polarized epithelial cells. *Adv Virus Res* **42**:187-247.
438. **Tucker, S. P., L. R. Melsen, and R. W. Compans.** 1992. Migration of polarized epithelial cells through permeable membrane substrates of defined pore size. *Eur J Cell Biol* **58**:280-90.
439. **Tugizov, S., E. Maidji, J. Xiao, and L. Pereira.** 1999. An acidic cluster in the cytosolic domain of human cytomegalovirus glycoprotein B is a signal for endocytosis from the plasma membrane. *J Virol* **73**:8677-88.
440. **Tuma, P. L., and A. L. Hubbard.** 2003. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* **83**:871-932.
441. **Turner, B. G., and M. F. Summers.** 1999. Structural biology of HIV. *J Mol Biol* **285**:1-32.
442. **Tyor, W. R., S. L. Wesselingh, J. W. Griffin, J. C. McArthur, and D. E. Griffin.** 1995. Unifying hypothesis for the pathogenesis of HIV-associated dementia complex, vacuolar myelopathy, and sensory neuropathy. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **9**:379-88.

443. **van Meer, G., and K. Simons.** 1986. The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and the basolateral cell surface domains of MDCK cells. *Embo J* **5**:1455-64.
444. **Vanden Haesevelde, M. M., M. Peeters, G. Jannes, W. Janssens, G. van der Groen, P. M. Sharp, and E. Saman.** 1996. Sequence analysis of a highly divergent HIV-1-related lentivirus isolated from a wild captured chimpanzee. *Virology* **221**:346-50.
445. **Veronese, F. D., T. D. Copeland, S. Oroszlan, R. C. Gallo, and M. G. Sarngadharan.** 1988. Biochemical and immunological analysis of human immunodeficiency virus gag gene products p17 and p24. *J Virol* **62**:795-801.
446. **Vidricaire, G., and M. J. Tremblay.** 2004. [For a better understanding of the mechanisms involved in vertical transmission of HIV]. *Med Sci (Paris)* **20**:784-7.
447. **Vincent, M. J., L. R. Melsen, A. S. Martin, and R. W. Compans.** 1999. Intracellular interaction of simian immunodeficiency virus Gag and Env proteins. *J Virol* **73**:8138-44.
448. **Vogel, L. K., M. Spiess, H. Sjostrom, and O. Noren.** 1992. Evidence for an apical sorting signal on the ectodomain of human aminopeptidase N. *J Biol Chem* **267**:2794-7.
449. **Vogt, C., M. Eickmann, S. Diederich, M. Moll, and A. Maisner.** 2005. Endocytosis of the Nipah virus glycoproteins. *J Virol* **79**:3865-72.
450. **Vogt, V. M.** 2000. Ubiquitin in retrovirus assembly: actor or bystander? *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:12945-7.
451. **von Boehmer, H.** 2005. Notch in lymphopoiesis and T cell polarization. *Nat Immunol* **6**:641-2.

452. **von Schwedler, U., R. S. Kornbluth, and D. Trono.** 1994. 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* **91**:6992-6.
453. **Vzorov, A. N., and R. W. Compans.** 2000. Effect of the cytoplasmic domain of the simian immunodeficiency virus envelope protein on incorporation of heterologous envelope proteins and sensitivity to neutralization. *J Virol* **74**:8219-25.
454. **Walter, P., and A. E. Johnson.** 1994. Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* **10**:87-119.
455. **Wan, L., S. S. Molloy, L. Thomas, G. Liu, Y. Xiang, S. L. Rybak, and G. Thomas.** 1998. PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell* **94**:205-16.
456. **Wang, J. K., E. Kiyokawa, E. Verdin, and D. Trono.** 2000. The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:394-9.
457. **Wang, S., J. York, W. Shu, M. O. Stoller, J. H. Nunberg, and M. Lu.** 2002. Interhelical interactions in the gp41 core: implications for activation of HIV-1 membrane fusion. *Biochemistry* **41**:7283-92.
458. **Ward, B. M., and B. Moss.** 2000. Golgi network targeting and plasma membrane internalization signals in vaccinia virus B5R envelope protein. *J Virol* **74**:3771-80.
459. **Wasmeier, C., P. V. Burgos, T. Trudeau, H. W. Davidson, and J. C. Hutton.** 2005. An extended tyrosine-targeting motif for endocytosis and recycling of the dense-core vesicle membrane protein phogrin. *Traffic* **6**:474-87.

460. **Wasmeier, C., and J. C. Hutton.** 1996. Molecular cloning of phogrin, a protein-tyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. *J Biol Chem* **271**:18161-70.
461. **Wei, P., M. E. Garber, S. M. Fang, W. H. Fischer, and K. A. Jones.** 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**:451-62.
462. **Weiss, S., B. Konig, Y. Morikawa, and I. Jones.** 1992. Recombinant HIV-1 nucleocapsid protein p15 produced as a fusion protein with glutathione S-transferase in *Escherichia coli* mediates dimerization and enhances reverse transcription of retroviral RNA. *Gene* **121**:203-12.
463. **Weissenhorn, W., A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1997. Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**:426-30.
464. **Wendland, B.** 2002. Epsins: adaptors in endocytosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:971-7.
465. **West, J. T., P. B. Johnston, S. R. Dubay, and E. Hunter.** 2001. Mutations within the putative membrane-spanning domain of the simian immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein define the minimal requirements for fusion, incorporation, and infectivity. *J Virol* **75**:9601-12.
466. **West, J. T., S. K. Weldon, S. Wyss, X. Lin, Q. Yu, M. Thali, and E. Hunter.** 2002. Mutation of the dominant endocytosis motif in human immunodeficiency virus type 1 gp41 can complement matrix mutations without increasing Env incorporation. *J Virol* **76**:3338-49.
467. **Wiedenmann, B., K. Lawley, C. Grund, and D. Branton.** 1985. Solubilization of proteins from bovine brain coated vesicles by protein perturbants and Triton X-100. *J Cell Biol* **101**:12-8.

468. **Wild, C., T. Greenwell, and T. Matthews.** 1993. A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**:1051-3.
469. **Wild, C., T. Oas, C. McDanal, D. Bolognesi, and T. Matthews.** 1992. A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10537-41.
470. **Wild, C. T., D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, and T. J. Matthews.** 1994. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:9770-4.
471. **Wilk, T., T. Pfeiffer, A. Bukovsky, G. Moldenhauer, and V. Bosch.** 1996. Glycoprotein incorporation and HIV-1 infectivity despite exchange of the gp160 membrane-spanning domain. *Virology* **218**:269-74.
472. **Willems, L., J. S. Gatot, M. Mammerickx, D. Portetelle, A. Burny, P. Kerkhofs, and R. Kettmann.** 1995. The YXXL signalling motifs of the bovine leukemia virus transmembrane protein are required for in vivo infection and maintenance of high viral loads. *J Virol* **69**:4137-41.
473. **Willey, R. L., J. S. Bonifacino, B. J. Potts, M. A. Martin, and R. D. Klausner.** 1988. Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:9580-4.
474. **Williams, M. A., and M. Fukuda.** 1990. Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J Cell Biol* **111**:955-66.

475. **Williams, S. B., T. P. Flanigan, S. Cu-Uvin, K. Mayer, P. Williams, C. A. Ettore, A. W. Artenstein, A. Duerr, and T. C. VanCott.** 2002. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific antibody in cervicovaginal lavage specimens obtained from women infected with HIV type 1. *Clin Infect Dis* **35**:611-7.
476. **Wilsbach, K., and G. S. Payne.** 1993. Vps1p, a member of the dynamin GTPase family, is necessary for Golgi membrane protein retention in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* **12**:3049-59.
477. **Wilson, I. A., J. J. Skehel, and D. C. Wiley.** 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* **289**:366-73.
478. **Wong, J. K., M. Hezareh, H. F. Gunthard, D. V. Havlir, C. C. Ignacio, C. A. Spina, and D. D. Richman.** 1997. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* **278**:1291-5.
479. **Worobey, M., M. L. Santiago, B. F. Keele, J. B. Ndjango, J. B. Joy, B. L. Labama, A. B. Dhed, A. Rambaut, P. M. Sharp, G. M. Shaw, and B. H. Hahn.** 2004. Origin of AIDS: contaminated polio vaccine theory refuted. *Nature* **428**:820.
480. **Wu, X., Y. Li, B. Crise, and S. M. Burgess.** 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science* **300**:1749-51.
481. **Wyatt, R., and J. Sodroski.** 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**:1884-8.

482. **Wyss, S., C. Berlioz-Torrent, M. Boge, G. Blot, S. Honing, R. Benarous, and M. Thali.** 2001. The highly conserved C-terminal dileucine motif in the cytosolic domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein is critical for its association with the AP-1 clathrin adaptor [correction of adapter]. *J Virol* **75**:2982-92.
483. **Yan, H., M. E. Lamm, E. Bjorling, and Y. T. Huang.** 2002. Multiple functions of immunoglobulin A in mucosal defense against viruses: an in vitro measles virus model. *J Virol* **76**:10972-9.
484. **Yang, X., S. Kurteva, X. Ren, S. Lee, and J. Sodroski.** 2005. Stoichiometry of envelope glycoprotein trimers in the entry of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **79**:12132-47.
485. **Yeaman, C., K. K. Grindstaff, and W. J. Nelson.** 1999. New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol Rev* **79**:73-98.
486. **Yeaman, C., A. H. Le Gall, A. N. Baldwin, L. Monlauzeur, A. Le Bivic, and E. Rodriguez-Boulan.** 1997. The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells. *J Cell Biol* **139**:929-40.
487. **Yoshimura, T., Y. Kawano, N. Arimura, S. Kawabata, A. Kikuchi, and K. Kaibuchi.** 2005. GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* **120**:137-49.
488. **Yu, X., X. Yuan, M. F. McLane, T. H. Lee, and M. Essex.** 1993. Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J Virol* **67**:213-21.
489. **Yu, X. F., S. Ito, M. Essex, and T. H. Lee.** 1988. A naturally immunogenic virion-associated protein specific for HIV-2 and SIV. *Nature* **335**:262-5.

490. **Zahn, T. R., M. A. Macmorris, W. Dong, R. Day, and J. C. Hutton.** 2001. IDA-1, a *Caenorhabditis elegans* homolog of the diabetic autoantigens IA-2 and phogrin, is expressed in peptidergic neurons in the worm. *J Comp Neurol* **429**:127-43.
491. **Zaremba, S., and J. H. Keen.** 1983. Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats. *J Cell Biol* **97**:1339-47.
492. **Zennou, V., C. Petit, D. Guetard, U. Nerhbass, L. Montagnier, and P. Charneau.** 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell* **101**:173-85.
493. **Zhou, W., L. J. Parent, J. W. Wills, and M. D. Resh.** 1994. 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* **68**:2556-69.
494. **Zimmer, G., K. P. Zimmer, I. Trotz, and G. Herrler.** 2002. Vesicular stomatitis virus glycoprotein does not determine the site of virus release in polarized epithelial cells. *J Virol* **76**:4103-7.
495. **Zurzolo, C., M. P. Lisanti, I. W. Caras, L. Nitsch, and E. Rodriguez-Boulan.** 1993. Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins are preferentially targeted to the basolateral surface in Fischer rat thyroid epithelial cells. *J Cell Biol* **121**:1031-9.

CHAPITRE 7:

APPENDICE 1

Le but de ce travail visait à développer une lignée de cellules épithéliales pouvant être infectées par le VIH-1. Au cours de ce travail j'ai contribué aux expériences dont les résultats sont présentés à la figure 2 de l'article. Cet article a été publié dans le journal Virus Research.

Abstract

The Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line has become the prototypic cell type for studying the mechanisms involved in viral glycoproteins transport and viral assembly in polarized cells. This cell line has been used in our laboratories for studying human immunodeficiency virus (HIV-1), despite the fact that MDCK cells cannot be infected by HIV. In transfected MDCK cells, HIV-1 glycoproteins are specifically transported to the basolateral cell surface where viral budding also mostly occurs. However, this model is of limited use when viral propagation, infection of most cells, or larger production of virions, is needed. The initial objective of this work was thus to establish an MDCK-derived cell line that could be productively infected by HIV-1, in order to pursue our studies on the polarization of viral budding. Expression of both receptor and co-receptor for T-tropic strains of the virus showed that canine cells are, in fact, rendered permissive once virus binding and entry is allowed. In addition, a reduced infectivity of the viral particles released from the basolateral surface was observed. This observation most likely reflects the interference mediated by CD4 molecules that accumulate at the basolateral domain. Accordingly, this effect was largely prevented when using viruses that down-regulate cell surface CD4 by expression of viral accessory proteins Nef and Vpu. This is a further evidence that the function of different viral proteins depends of the site of viral budding, which is itself determined by the presence of targeting signal(s) harbored by viral envelope glycoproteins. The MDCK cell line, stably transfected to express HIV-1 receptor/co-receptor, will be well suited to examine these aspects.

Keywords: HIV-1; Polarized cells; MDCK cells; Accessory proteins; Envelope glycoprotein

1. Introduction

Although human immunodeficiency virus (HIV-1) is mainly produced and recovered from CD4-positive human lymphocytes, it can also infect several other cell types such as macrophages and dendritic cells (Levy, 1993). In contrast, infection of epithelial cells by human or simian immunodeficiency virus remains controversial. Numerous reports exist on viral transmission through intact mucosal surfaces suggesting a role for epithelial cells (for examples: Joag et al., 1997; Miller and Hu, 1999). The presence of virus has also been detected by different methods in cells of the intestinal mucosa (Heise et al., 1991; Gill et al., 1992). In tissue culture, epithelial cells derived from such different tissues as the thymus, liver, kidney, lung and the oral mucosa can all be infected (Levy, 1993); also, it cannot be excluded that some cells that are refractory to infection by cell-free virus can be infected via cell-to-cell transmission (For examples: Tan et al., 1993; Moore et al., 2002). In fact, it was reported that, in the context of viral transcytosis across a tight monolayer of epithelial cells, viral transmission could only be achieved by infected lymphocytes in contact with the apical cell surface (Bomsel, 1997; Hocini and Bomsel, 1999; Lagaye et al. 2001). Recent observations on infection of epithelial cells derived from the female genital tract (for examples: Asin et al., 2003; Yeaman et al., 2003) further support the importance of looking more closely at the infection and viral assembly in the epithelial cells model (for examples: Asin et al., 2003; Yeaman et al., 2003).

The Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line has become the standard model to study virus assembly in polarized cells. Previous data indicated that restriction to HIV-1 replication in MDCK cells was strictly limited to viral entry, given that these cells efficiently produced infectious particle when transfected with proviral constructs or infected with pseudotyped virions (Lodge et al., 1994, 1997; Hofmann et al., 1999). In transfected MDCK cells, HIV-1 glycoproteins are specifically transported to the basolateral cell surface where viral budding will also mostly occur (Lodge et al., 1994, 1997). However, this model is limited to assays relying in single-cycle assays that do not require viral propagation or large number of virions. The initial objective of this work was thus to establish an MDCK-derived cell line that could be productively infected by HIV-1 to pursue our studies on the polarization of viral budding. Expression of the CD4 receptor and

CXCR4 coreceptor was shown sufficient to render these canine cells permissive to HIV-1 T-tropic viral strains. While the site of virus budding was determined by the viral glycoprotein, we show hereof that viral accessory proteins differentially modulate infectivity of the virus depending on the budding site.

2. Materials and methods

2.1. Plasmid constructs

The L-T4-SH plasmid containing the CD4 cDNA under control of the MuLV LTR and the gene coding for hygromycin resistance under control of the SV40 viral promoter was a generous gift from Dr Michael Emerman (Molecular Medicine Program, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington). To construct a vector expressing the CXCR4 HIV co-receptor and harboring a neomycin resistance gene marker, the *HindIII-XhoI* fragment from the pcDNA-fusin (CXCR4) plasmid (a generous gift from Dr. Dan R. Littman, Howard Hughes Medical Institute) was subcloned into the pcDNA1-neo plasmid digested with the same two restriction enzymes. The different isogenic cloned proviral DNAs, differing by the presence or absence of YXXL motif in their envelope glycoprotein, or by the presence or absence of both viral accessory protein Vpu and Nef, based on HxBc2 or NL4.3 proviruses, were described in a previous study (Cervantes-Acosta et al., 2001).

2.2. Cell lines and viruses

Human HEK293T cells, HeLa-CD4-LTR- β -Gal, and the Madin-Darby canine kidney polarized epithelial cell line (MDCK cells) were all maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 8% fetal calf serum and antibiotics (penicillin and streptomycin) at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere. Viruses were produced from proviral plasmid constructs by transfection in HEK293T cells (24 μ g of plasmid DNA per 5 X 10⁶ cells) using the calcium phosphate co-precipitation procedure (Yao et al., 1995). Cell supernatants containing virus were collected 48 hours post transfection and frozen in aliquots at -80 °C.

2.3. Establishment of a MDCK cell line expressing CD4 and CXCR4

MDCK cells were cotransfected with the CD4 and CXCR4 expression vectors (12 µg of each plasmid per 10⁶ cells) using the calcium-phosphate co-precipitation technique. The cells were washed with phosphate-buffered saline 24 hours post transfection and maintained in DMEM supplemented with serum and antibiotics. Medium was replaced again 24 hours later with addition of selection medium containing 500 µg/ml of G418 and 250 µg/ml of hygromycin. Medium was later changed every two to three days. Colonies that developed after approximately 2 weeks were separately recovered using small filter paper discs (Whatman) moistened with trypsin. Filters were transferred into 24 wells microplates. Cells were propagated as usual in medium containing both G418 and hygromycin before being characterized and frozen for future use.

2.4. Infection of transfected cells

Viral stocks were recovered from transfected HEK293T cells, and similar amounts, as determined by reverse transcriptase activity, were used to infect clones of transfected MDCK cells potentially expressing CD4 and CXCR4; negative control MDCK cells or positive control HeLa-T4 cells. To ensure access of the virus to the basolateral surface, cells were lightly treated with trypsin and washed with medium before being incubated with viruses. After a contact of 8 hours at 37 °C, cells were washed three times and maintained in DMEM supplemented with serum and antibiotics. For microscopic observation, cells were seeded onto 4-wells chamber slides (Nalge Nunc International, IL) and infected 24 hours later.

2.5. Quantitation of virus release

Cell supernatants were harvested at different times post-infection, viral pellets were obtained by ultracentrifugation of the supernatants, and virus release was quantitated either by measuring reverse transcriptase activity (Lee et al., 1987) or via detection of p24 capsid protein using an ELISA assay (Higgins et al., 1986).

2.6. Microscopic observation of infected cells

Infected and control cells on chamber slides were fixed for 30 minutes at room temperature in methanol:acetone (1:1) and stained for 1 hour at 37°C with crystal

violet (0.1% w/v in 0.1M citric acid). Staining solution was removed and stained cells were washed 3 times in phosphate-buffered saline. Observations were made at 100X magnification under a Nikon Eclipse E600 microscope equipped with a DXM1200F digital camera.

2.7. Determination of polarized virus budding

Polarized viral budding was examined using previously described techniques, with some modifications (Lodge et al., 1994). Briefly, 10^6 cells were seeded per 2.5 cm diameter culture chambers on semi-permeable 1 μ m pore-diameter filter membranes (Falcon No 3102) and infected with viruses recovered from transfected HEK293T cells. After 8 hours of incubation, cells were washed with phosphate-buffered saline and maintained in DMEM supplemented with serum and antibiotics. Polarization of the cellular monolayer was verified by monitoring the electrical resistance between upper and lower chamber compartments (Millicel-ERS electrical resistance system, Millipore). Media bathing the apical and basolateral sides of the membrane filter were separately collected and viral release was measured by performing a reverse transcriptase activity assay.

2.8. Determination of viral infectivity

The infectivity of viruses collected from the apical and basolateral sides of the membrane filter was measured using the MAGI assay (Kimpton and Emerman, 1992). The reverse transcriptase activity present in supernatants recovered from each side of the cellular monolayer was first measured (Lee et al., 1987). Different dilutions of these viral stocks were then used to infect HeLa-CD4-LTR- β -Gal indicator cell line (MAGI cells). The number of positive (blue) cells was determined 48 hours post-infection by incubation in the presence of the β -galactosidase substrate. Values of relative infectivity were calculated by dividing the number of blue cells by the reverse transcriptase activity units used to inoculate each well.

3. Results

3.1. Generation of MDCK cell clones expressing HIV-1 receptor/co-receptor

Canine MDCK cells are permissive to reverse transcription, integration, expression and assembly of HIV-1 when cloned proviral DNA is introduced by transfection or when cells are infected with pseudotyped virions. However, to establish fully permissive cells, it is necessary to bypass the block to virus binding and entry, resulting from a lack of both receptor and co-receptor at the surface of these cells. Proviral strains mainly used in our laboratory, and many commonly used HIV-1 laboratory strains, are T-tropic viruses that use the chemokine CXCR4 receptor as the co-receptor, in conjunction with CD4, to infect their target cells. We thus chose to introduce this co-receptor, together with CD4, in an effort to render the MDCK canine cells permissive to HIV-1. Separate vectors were designed, encoding the receptor and co-receptor, as described in Materials and Methods. Each vector possesses a distinct resistance marker allowing simultaneous selection of cells harboring the hygromycin and neomycin (G418) resistance marker. Initial experiments showed that selection of cells expressing either CD4 or CXCR4 alone is insufficient to ensure HIV infection of MDCK cells with the T-tropic CXCR4-dependent virus strains used in this study (data not shown). Experiments were thus initiated to simultaneously select cells with both resistance markers, and thus likely to express both the CD4 and CXCR4 cell surface molecule. As expected, the proportion of cells stably expressing both markers was somewhat reduced compared to a single-selection experiment; seven colonies were finally isolated, grown and further characterized. Although precise growth curves were not established for these cells, no apparent morphological or growth changes was noticed, as compared to parental MDCK cells.

3.2. Permissiveness of MDCK cells expressing CD4/CXCR4 to HIV-1 infection

In the first characterization of the seven double-resistant clones, simple approaches were used to determine if these cells could support viral multiplication. Viruses were first produced by transient transfection of cloned proviral DNA in HEK293T cells, allowing efficient transfection and efficient expression from the plasmid harboring an SV40 replication origin. The HXBc2-*vpu+* proviral construct was chosen to take advantage of the ability of Vpu to enhance viral release in infected cells. These viruses were then used to infect the seven MDCK cell clones.

In a first screening experiment, released reverse transcriptase activity was measured in the MDCK cells supernatants 3 days post-infection. All seven clones showed levels of reverse transcriptase activity that were 3 to 4-fold over the background of control MDCK cells (Fig. 1A). Three cell clones (#7, #8 and #10) were chosen for further characterization. They were further examined by a second approach at different times post-infection, to ensure that they can be productively infected with HIV-1 and that virus propagated in these cells. Cells were again infected with the virus produced in HEK293T cells. The release of HIV-1 p24 major capsid protein in the supernatant of putatively-infected MDCK cells was measured by ultracentrifugation, followed by ELISA assay on the viral pellets obtained. This ensures that actual virus production was measured since viral particles bound to the cells will not be recovered by this procedure, while the possibility of remaining inoculum was ruled out using negative-control MDCK cells. All three clones exhibited a kinetic of virus replication similar to control HeLa-T4 cells (Fig. 1B), showing a peak of virus release 3 days post-infection, with a decrease thereafter. Peak virus production appeared similar in MDCK cell clones and HeLa-T4 cells, although the assay was not strictly quantitative, while only background level (less than 5%) was observed in the negative-control MDCK cells.

3.3. Syncytia formation in infected cells

Infected cells were also examined for the formation of syncytia, a classical cytopathic effect observed upon infection of CD4-positive cells by T-tropic syncytium-inducing strains of HIV. Although syncytia were observed with clones #8 and #10, their size and number was reduced compared to those observed in infected HeLa-T4 cells used as positive control (data not shown). However, interestingly, syncytia were observed in clone #7 at levels approaching those obtained in HeLa-T4 cells (Fig. 2). Cell clone #7 was thus kept for further study and will be referred to as MDCK-T4/R4 (MDCK cells expressing both CD4 and CXCR4). Altogether, the results of viral infection indicate that MDCK cells exhibit a restriction to HIV-1 infection that is strictly limited to virus binding and entry. Expression of the CD4 receptor and proper co-receptor renders the cells permissive to HIV-1 infection and replication, as revealed by production of virions

and expression of viral glycoproteins at the cell surface of infected cells, resulting in cell-to-cell fusion.

3.4. Polarized virus budding in HIV-infected MDCK-T4/R4

The polarization of virus budding was then examined in order to verify that the MDCK-T4/R4 cells have retained their polarized phenotype and the ability to allow polarized release of HIV-1 virions. Introduction of proviral DNA by transfection, using previously established procedure (Lodge et al., 1994), did confirm that the cells are still normally polarized, as also indicated by normal development of transepithelial electrical resistance (data not shown). Cells were then infected and seeded onto semipermeable filters. Polarization of viral budding was observed, with about 75% of the virus released from the basolateral membrane surface (Fig. 3). This targeting of virus budding was dependent on the previously characterized tyrosine-based (YXXL) basolateral targeting signal in the intracytoplasmic domain of viral envelope glycoprotein; the mutant virus, in which the tyrosine-based motif was abolished (Y712S) was released in similar amount from both cell surfaces with total viral production similar to that obtained with the the wild type envelope glycoprotein virus (Fig. 3).

3.5. Infectivity of viruses released from different membrane surfaces of MDCK-T4/R4 cells

The infectivity of virus released from infected MDCK-T4/R4 cells was next examined. Viruses harboring wild type envelope glycoprotein were produced in HEK293T cells and used to infect MDCK-T4/R4 cells. Specific infectivity of the viruses released in apical and basolateral media were determined in the MAGI assay, as described in Materials and Methods. Surprisingly, the small amount of virus released from the apical surface did show a significant, up to six fold, higher specific infectivity compared to the virus released at the basolateral surface (Fig. 4).

Previous work has shown that viruses collected from the basolateral and apical side of MDCK cells, when transfected with HIV-1 proviral DNA, display similar infectivity (Lodge et al., 1997). A possible explanation for the difference observed in MDCK-T4/R4 cells is the presence of CD4 in these cells. The presence of CD4 at the surface of HIV producer cells has been shown to reduce

HIV-1 infectivity (Lama et al., 1999; Cortés et al., 2002; Lama, 2003; Lévesque et al., 2003, 2004; Tanaka et al., 2003).

While CD4 at the apical cell surface could not be detected by FACS analysis, low levels were observed when the antibody was applied at the basolateral side (data not shown), despite possibly limited access by diffusion across the semipermeable filter. This supports earlier reports indicating that the CD4 molecule is preferentially inserted at the basolateral membrane of polarized epithelial cells (Rabenandrasana et al., 1990).

If the reduced infectivity observed in basolaterally-released virions is actually due to CD4 accumulation, it can be expected that accessory proteins Vpu and Nef, which are able to counteract the negative effect of CD4 on infectivity (Lama et al., 1999; Cortes et al., 2002; Bour et al., 2003; Lama, 2003; Lévesque et al., 2003, 2004), will have a predominant effect on viruses released from the basolateral surface. Since the virus previously used lacked the *nef* gene, a different set of isogenic proviruses producing the Nef and Vpu proteins, or lacking both of these, were produced in HEK293T cells and used to infect MDCK-T4/R4 cells. The *nef+/vpu+* viruses exhibited a similar specific infectivity when released from either cell surface while *nef-/vpu-* viruses were 5 times less infectious when released from the basolateral membrane (Fig. 5), supporting the importance of the accessory proteins to counteract an inhibitory effect that is most likely due to the presence of CD4 at the basolateral surface.

4. Discussion

The primary objective of the work reported herein was to establish a MDCK cell line that can be productively infected by HIV and thus facilitate the study of HIV in this best-characterized epithelial cell line. Infection will permit, in contrast to the previously used DNA transfection, to study a homogeneous cell population with all cells producing viruses.

Expression of the main HIV-1 receptor, the CD4 molecule, is not sufficient and that expression of another molecule expressed in human lymphocytes is required for infection of murine cells (Maddon et al., 1986). Molecules belonging to the chemokine receptor family GTP-coupled seven transmembrane proteins act as the co-receptors that mediate entry of T-tropic (CXCR4) and macrophage-

tropic (CCR5) viral isolates (Berger et al., 1999; Yi et al., 1999). However, numerous studies have established that the establishment of a productive infection in mouse, is blocked at different stages of the viral replication cycle even in cells co-expressing human CD4 and CXCR4 (See among others: Hart et al., 1989; Newstein et al., 1990; Garber et al., 1998; Bieniasz and Cullen, 2000; Mariani et al., 2000, 2001; Baumann et al., 2004; Hatzioannou et al., 2004).

There are only few examples in the literature where CD4/coreceptor expression in nonhuman cells is sufficient to allow productive HIV infection. Although there are many reports indicating that cells expressing these two molecules are rendered susceptible to the viral envelope-dependent fusion process (Berson et al., 1996; Feng et al., 1996; Münk et al., 2002), the data concerning productive virus infection are much more limited. Short-term viral production was observed in HIV-infected rabbit cells although no evidence that the virus can actually propagate in these cells was presented (Speck et al., 1998). Even in simian cells, post-entry blocks prevent a normal productive infection (Münk et al., 2002). To our knowledge, the closest model of productive HIV-1 infection in nonhuman cells is the report of the mink cell line, Mv.1.Lu, these cells are able to form syncytia and apparently support productive HIV-1 replication to levels approaching those of human cells (Koito et al., 2003). Rat cells were also reported to become permissive when they express CD4 and a co-receptor, although viral production was reduced compared to human cells (Keppler et al., 2001). The canine cell line characterized in the present study also produced virus that could be recovered, quantitated, and tested for its infectivity in classical assays. The virus clearly replicated in the cells, viral production peaked after few days and decreases thereafter as observed in infected cultures of human lymphocytes.

Infected MDCK-T4/R4 cells are able to support YXXL-dependent targeting of viral envelope glycoprotein and viral budding at the basolateral surface despite formation of syncytia that was observed in these cells. However, there was a partial "leakage" toward the apical surface, that could partly results from cytopathic effects induced by the virus, but most likely by saturation of the transport machinery due to higher level of virus production compared to the situation observed upon transfection of cloned proviral DNA. Similar observations of incomplete targeting have been reported in the literature (see for example: Tan

et al., 1993). Nevertheless, the MDCK-T4/R4 cells are clearly adequate to study virus assembly in a polarized cells context. The cell line is already exploited in the laboratory and was recently used to study the polarized distribution of a panel of HIV-1 envelope glycoproteins mutants by immunofluorescence, studies that were essentially impossible to perform using previously used transfection procedures (Welman et al., submitted).

Obviously, other more natural targets of HIV, such as lymphocytes, can also exhibit polarization of virus assembly and budding (Deschambeault et al., 1999). This directed viral egress observed for many viruses at site of cell-to-cell contact, resulting in the so-called viral synapse, probably favors virus propagation (Johnson and Huber, 2002; Jolly and Sattentau, 2004; Jolly et al., 2004; Piquet and Sattentau, 2004). However, epithelial cells are still the best cell type to study polarization of virus budding at distinct membrane domains, since viruses targeted at the apical or basolateral membrane can be separately recovered and further studied. The MDCK cell line remains the best characterized and easiest to manipulate polarized epithelial cell line. The possibility to infect these cells will now allow us to investigate novel aspects of virus assembly in the context of differentiated cell surfaces.

The MDCK-T4/R4 cell line has already allowed us to further establish the importance of cellular polarization in virus assembly, showing an important difference in viral infectivity depending on virus assembly site. In MDCK-T4/R4 cells, the presence of Vpu and Nef increases viral infectivity more than 10-fold at the basolateral surface but less than 3-fold at the apical surface. This is most probably the result of CD4 polarization at the basolateral surface and is somewhat reminiscent of the observations that colocalisation of Nef and CD4 in lipid rafts is required for the Nef-dependent CD4 downmodulation and increased viral infectivity (Alexander et al., 2004). We also previously reported a differential effect of Vpu on viral infectivity, even in CD4-negative cells, depending on the presence of the targeting signal (Cervantes-Acosta et al., 2001), while other investigators reported a functional interaction between a Nef mutant (Nef-F12) and the viral envelope glycoprotein (Olivetta et al., 2000). Altogether, these data clearly show that due caution should be exerted when looking at the effect of viral accessory proteins given that their activity may depend on the nature of the viral envelope glycoprotein, the differentiation status of the host cells, or both.

Reciprocally, the presence of viral accessory proteins could influence the phenotype resulting from changes in the viral envelope glycoprotein.

Altogether, the work reported herein supports the idea that canine cells can be rendered permissive to HIV-1 replication once they express both CD4 and an adequate co-receptor for the virus. This also raises the interesting possibility of developing a canine model of HIV-1 infection, especially since presently available transgenic mice or rabbits only support very low levels of HIV replication (Browning et al., 1997; Dunn et al., 1995). Additional work using various canine cell types such as lymphocytes, macrophages and dendritic cells transduced to express human CD4/CXCR4 or CD4/CCR5 should logically precede any attempts to establish such a model of HIV infection.

Acknowledgements

We thank Dr Michael Emerman for his generous gift of the CD4 cDNA plasmid and Dr. Dan R. Littman for the CXCR4 cDNA plasmid. We thank Carole Danis, Johanne Mercier and Nicole Rougeau for expert technical assistance conducting to smooth operation of our laboratories, Serge Sénéchal for technical support in FACS analysis and Jessy Tremblay for his help with microscopic observations.

This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR), a CANVAC grant in the Canada Network of Excellence, and a Fonds pour les Chercheurs et l'Aide à la Recherche – Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FCAR-FRSQ) group grant (all grants to É.A.C. and G.L.). É.A.C. is the recipient of a Canada Research Chair in Human Retrovirology, G.L. was the recipient of a senior scholarship award from the "Fonds de la Recherche en Santé du Québec" (FRSQ) and G.C.-A. was the recipient of a studentship from the "Ministère de l'Éducation du Québec". We thank Universidad del Norte (Colombia) for continuous financial support of G.C.-A. during his doctoral studies and the Faculty of Graduate Studies of Université de Montréal for partial financial support to M.W.

References

Alexander, M., Bor, Y.-C., Ravichandran, K.S., Hammarskjöld, M.-L., Rekosh, D., 2004. Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with lipid rafts to downmodulate cell surface CD4 and class I major histocompatibility complex expression and to increase viral infectivity. *J. Virol.* 78, 1685-1696.

Asin, S.N., Wildt-Perinic, D., Mason, S.I., Howell, A.L., Wira, C.R., Fanger, M.W., 2003. Human immunodeficiency virus type 1 infection of human uterine epithelial cells: viral shedding and cell contact-mediated infectivity. *J. Inf. Dis.* 187, 1522-1533.

Baumann, J.G., Unutmaz, D., Miller, M.D., Breun, S.K.J., Grill, S.M., Mirro, J., Littman, D.R., Rein, A., KewalRamani, V.N., 2004. Murine T cells potently restrict human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 78, 12537-12547.

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

Berson, J.F., Long, D., Doranz, B.J., Rucker, J., Jirik, F.R., Doms, R.W., 1996. A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J. Virol.* 70, 6288-6295.

Bieniasz, P.D., Cullen, B.R., 2000. Multiple blocks to human immunodeficiency virus type 1 replication in rodent cells. *J. Virol.* 74, 9868-9877.

Bomsel, M., 1997. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat. Med.* 3, 42-47.

Bour, S., Strebel, K., 2003. The HIV-1 Vpu protein: a multifunctional enhancer of viral particle release. *Microbes Infect.* 5, 1029-1039.

Browning, J., Horner, J.W., Pettoello-Montovani, M., Raker, C., Yurasov, S., DePinho, R.A., Goldstein, H., 1997. Mice transgenic for human CD4 and CCR5 are susceptible to HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14637-14641.

Cervantes-Acosta, G., Lodge, R., Lemay, G., Cohen, É.A., 2001. Influence of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein YXXL endocytosis/polarization signal on viral accessory protein functions. *J. Hum. Virol.* 4, 249-259.

Cortés, M.J., Wong-Staal, F., Lama, J., 2002. Cell surface CD4 interferes with the infectivity of HIV-1 particles released from T cells. *J. Biol. Chem.* 277, 1770-1779.

Deschambeault, J., Lalonde, J.-P., Cervantes-Acosta, G., Lodge, R., Cohen, É. A., Lemay G., 1999. Polarized human immunodeficiency virus budding in lymphocytes involves a tyrosine-based signal and favors cell-to-cell viral transmission. *J. Virol.* 73, 5010-5017.

Dunn, C.S., Mehtali, M., Houdebine, L.M., Gut, J.P., Kirn, A., Aubertin, A.M., 1995. Human immunodeficiency virus type 1 infection of human CD4-transgenic rabbits. *J. Gen. Virol.* 76, 1327-1336.

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

Garber, M.E., Wei, P., Kewal Ramani, V.N., Mayall, T.P., Herrmann, C.H., Rice, A.P., Littman, D.R., Jones, K.A., 1998. The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein. *Genes Dev.* 12:3512-3527.

Gill, M.J., Sutherland, L.R., Church, D.L., 1992. Gastrointestinal tissue cultures for HIV in HIV-infected/AIDS patients. *AIDS* 6, 553-556.

Hart, C.E., Ou, C.Y., Galphin, J.C., Moore, J., Bacheler, L.T., Wasmuth, J.J., Petteway, S.R.J., Schochetman, G., 1989. Human chromosome 12 is required for elevated HIV-1 expression in human-hamster hybrid cells. *Science* 246, 488-491.

Hatzioannou, T., Cowan, S., Bieniasz, P.D., 2004. Capsid-dependent and -independent postentry restriction of primate lentivirus tropism in rodent cells. *J. Virol.* 78, 1006-1011.

Heise, C., Dandekar, S., Kumar, P., Duplantier, R., Donovan, R.M., Halsted, C.H., 1991. Human immunodeficiency virus infection of enterocytes and mononuclear cells in human jejunal mucosa. *Gastroenterology* 100, 1521-1527.

Higgins, J. R., Pedersen, N. C., Carlson, J. R., 1986. Detection and differentiation by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay of human T-cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus- and acquired immunodeficiency syndrome-associated retroviruslike clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 24, 424-430.

Hocini, H., Bomsel, M., 1999. Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins. *J. Infect. Dis.* 179 Suppl. 3S, 448-453.

Hofmann, W., Schubert, D., LaBonte, J., Munson, L., Gibson, S., Scammell, J., Ferrigno, P., Sodroski, J., 1999. Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 73, 10020-10028.

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

Johnson, D.C., Huber, M.T., 2002. Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *J. Virol.* 76, 1-8.

Jolly, C., Sattentau, Q.J., 2004. Retroviral spread by induction of virological synapse. *Traffic* 5, 643-650.

Jolly, C., Kashefi, K., Hollinshead, M., Sattentau, Q.J., 2004. HIV-1 cell to cell transfer across an env-induced, actin-dependent synapse. *J. Exp. Med.* 199, 283-293.

Keppler, O.T., Yonemoto, W., Welte, F.J., Patton, K.S., Iacovides, D., Atchison, R.E., Ngo, T., Hirschberg, D.L., Speck, R.F., Goldsmith, M.A., 2001. Susceptibility of rat-derived cells to replication by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 75, 8063-8073.

Kimpton, J., Emerman, M., 1992. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated β -galactosidase gene. *J. Virol.* 66, 2232-2239.

Koito, A., Kameyama, Y., Cheng-Mayer, C., Matsushita, S., 2003. Susceptibility of Mink-derived cells to replication by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 77, 5109-5117.

Lagaye, S., Derrien, M., Menu, E., Coito, C., Tresddi, E., Mauclore, P., Scarlatti, G., Chaouat, G., Barre-Sinoussi, F., Bomsel, M., 2001. Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection. *J. Virol.* 75, 4780-4791.

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

Lama, J., 2003. The physiological relevance of CD4 receptor down-modulation during HIV infection. *Curr. HIV Res.* 1, 167-184.

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

Lévesque, K., Zhao, Y.S., Cohen, É.A., 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, 28346-28353.

Lévesque, K., Finzi, A., Binette, J., Cohen, É.A., 2004. Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection. *Curr. HIV Res.* 2, 51-59.

Levy, J.A., 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol. Rev.* 57, 183-289.

Lodge, R., Göttlinger, H., Gabuzda, D., Cohen, É.A., Lemay, G., 1994. The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J. Virol.* 68, 4857-4861.

Lodge, R., Lalonde, J.-P., Lemay, G., Cohen É. A., 1997. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO J.* 16, 695-705.

Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDougal, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A., Axel, R., 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47, 333-348.

Mariani, R., Rutter, G., Harris, M.E., Hope, T.J., Krausslich, H.G., Landau, N.R., 2000. A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells. *J. Virol.* 74, 3859-3870.

Mariani, R., Rasala, B.A., Rutter, G., Wieggers, K., Brandt, S.M., Kräusslich, H.-G., Landau, N.R., 2001. Mouse-human heterokarions support efficient human immunodeficiency virus type 1 assembly. *J. Virol.* 75, 4141-3151.

Miller, C.J., Hu, J., 1999. T cell tropic simian immunodeficiency virus and simian-human immunodeficiency viruses are readily transmitted by vaginal inoculation of rhesus macaques, and Langerhans' cells of the female genital tract are infected with SIV. *J. Inf. Dis.* 179, S413-S417.

Moore, J.S., Hall, S.D., Jackson, S., 2002. Cell-associated HIV-1 infection of salivary gland epithelial cell lines. *Virology* 297, 89-97.

Münk, C., Brandt, S.M., Lucero, G., Landau, N.R., 2002. A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 13843-13848.

Newstein, M., Stanbridge, E.J., Casey, G., Shank, P.R., 1990. Human chromosome 12 encodes a species-specific factor which increases human immunodeficiency virus type 1 *tat*-mediated trans activation in rodent cells. *J. Virol.* 64, 4564-4567.

Olivetta, E., Publiese, K., Bona, R., D'Aloja, P., Ferrantelli, F., Santarcangelo, A.C., Mattia, G., Verani, P., Federico, M., 2000. cis expression of the F12 human immunodeficiency virus (HIV) Nef allele transforms the highly productive NL4-3 HIV type 1 replication-defective strain: involvement of both Env gp41 and CD4 intracytoplasmic tails. *J. Virol.* 74, 483-492.

Piguet, V., Sattentau, Q., 2004. Dangerous liaisons at the virological synapse. *J. Clin. Invest.* 114, 605-610.

Rabenandrasana, C., Baghdiguan, S., Marvaldi, J., Fantini, J., 1990. CD4 molecules are restricted to the basolateral membrane domain of in vitro differentiated human colon cancer cells (HT29-D4). *FEBS* 265, 75-79.

Speck, R.F., Penn, M.L., Wimmer, J., Esser, U., Hague, B.F., Kindt, T.J., Atchison, R.E., Goldsmith, M.A., 1998. Rabbit cells expressing human CD4 and human CCR5 are highly permissive for human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 72, 5728-5734.

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

Tanaka, M., Ueno, T., Nakahara, T., Sasaki, K., Ishimoto, A., Sakai, H. 2003. Downregulation of CD4 is required for maintenance of viral infectivity of HIV-1. *Virology* 311, 316-325.

Welman, M., Cohen, É.A., Lemay, G. 2005. Sequence context modulates activity of the dual basolateral/endocytosis YXXØ signal of HIV-1 gp41 intracytoplasmic domain. Submitted.

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

Yeaman, G.R., Howell, A.L., Weldon, S., Demian, D.J., Collins, J.E., O'Connell, D.M., Asin, S.N., Wira, C.R., Fanger, M.W., 2003. Human immunodeficiency virus receptor and coreceptor expression on human uterine epithelial cells: regulation of expression during the menstrual cycle and implications for human immunodeficiency virus infection. *Immunology* 109, 137-146.

Yi, Y., Isaacs, S.N., Williams, D.A., Frank, I., Schols, D., de Clercq, E., Kolson, D.L., Collman, R.G., 1999. Role of CXCR4 in cell-cell fusion and infection of monocyte-derived macrophages by primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) strains: two distinct mechanisms of HIV-1 dual tropism. *J. Virol.* 73, 7117-7125.

Fig. 1. Infection of hygromycin/G-418 resistant MDCK cell clones expressing human CD4 and CXCR4. Infectious HIV-1 virions were recovered from HEK293T cells transfected with the HxBc2 proviral DNA construct (Vpu+, Nef-) and used to infect 7 different MDCK cell clones exhibiting resistance to both hygromycin and G-418 and thus harboring the human CD4 and CXCR4 expression vectors. Untransfected MDCK cells were used as a negative control and HeLa-CD4 cells as a positive control of permissive cells. (Panel A) Supernatants were harvested three days post-infection and viral release was quantitated by reverse transcriptase activity assay on viral pellets obtained by ultracentrifugation. (Panel B) Three clones exhibiting highest levels of reverse transcriptase activity in the previous experiment were again infected, samples were harvested each three days and virus was quantitated by p24 ELISA assay on viral pellets obtained by ultracentrifugation of cell supernatants.

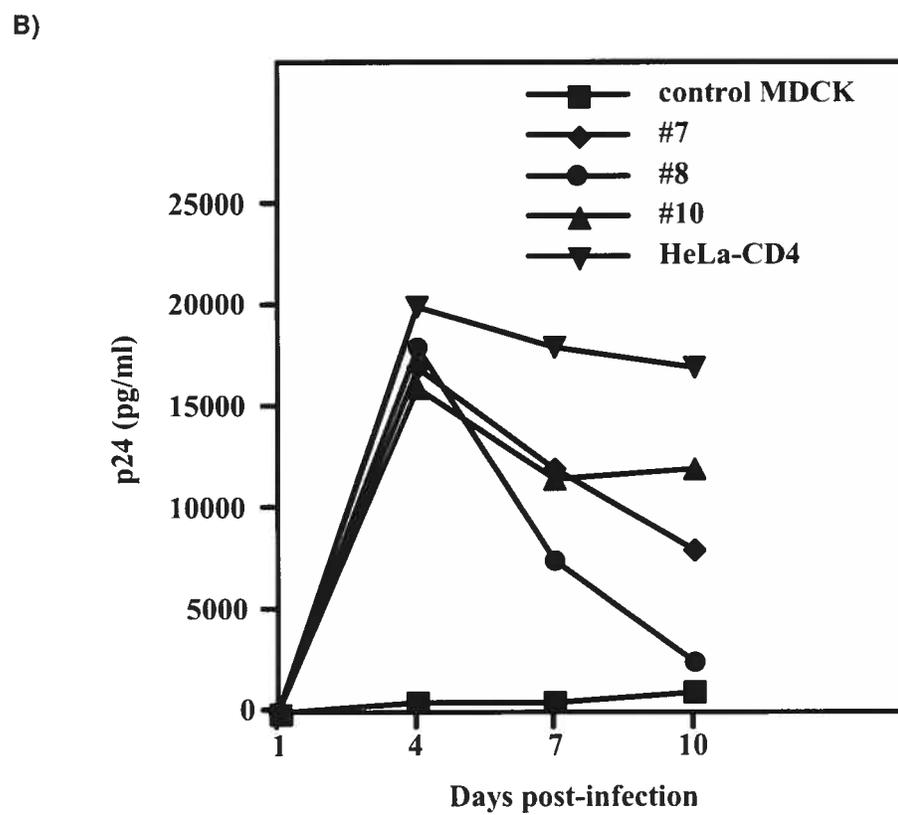
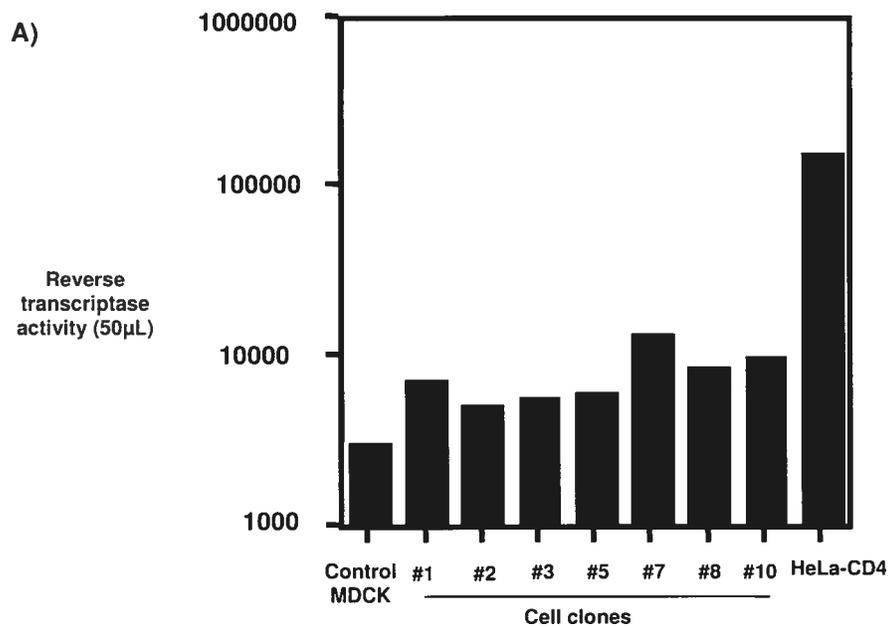


Fig. 2. Syncytia formation in infected MDCK cells. The CD4 and CXCR4 positive MDCK cell clone #7 was infected with wild type NL4.3 virus (Vpu+, Nef+), Untransfected MDCK cells were used as a negative control and HeLa-CD4 cells as a positive control. Cells were stained as described in Materials and Methods and examined at 100X magnification at either 48 or 96 hours post-infection, as indicated. Close up panels are presented to better show syncytia and cytopathic effects in HeLa-CD4 cells and MDCK cell clone #7 (MDCK-T4/R4).

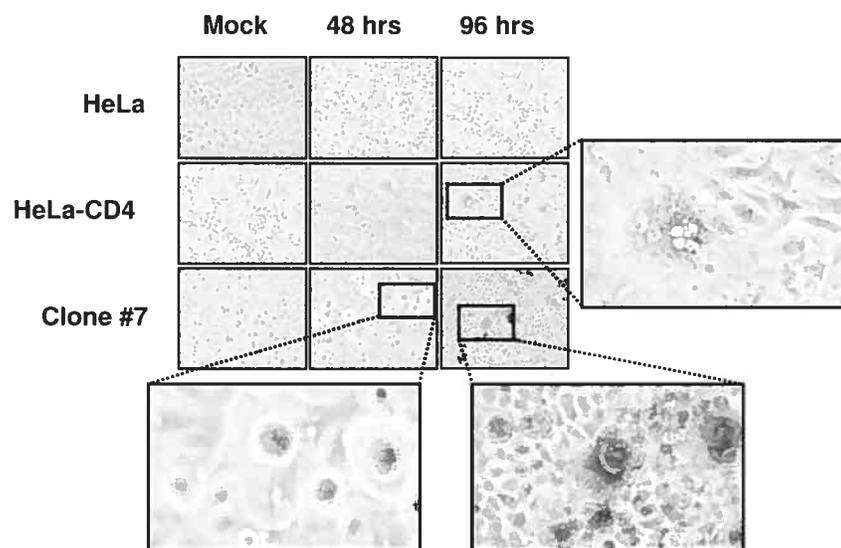


Fig. 3. Polarized viral budding in infected MDCK-T4/R4 cells. Viral stocks harboring either the wild type or Y712S mutant viral glycoprotein devoid of basolateral targeting signal (in the context of (vpu-, nef-) virus backbone) were prepared by transfection of HEK293T cells. These viruses were used to infect MDCK-T4/R4 cells grown onto semipermeable membrane filters. Cells were allowed to grow to confluency and polarization of the cell monolayer was verified by monitoring the electrical resistance between upper and lower chambers. Apical and basolateral supernatants were harvested and viral release was measured by reverse transcriptase activity. The results presented are representative of three distinct experiments.

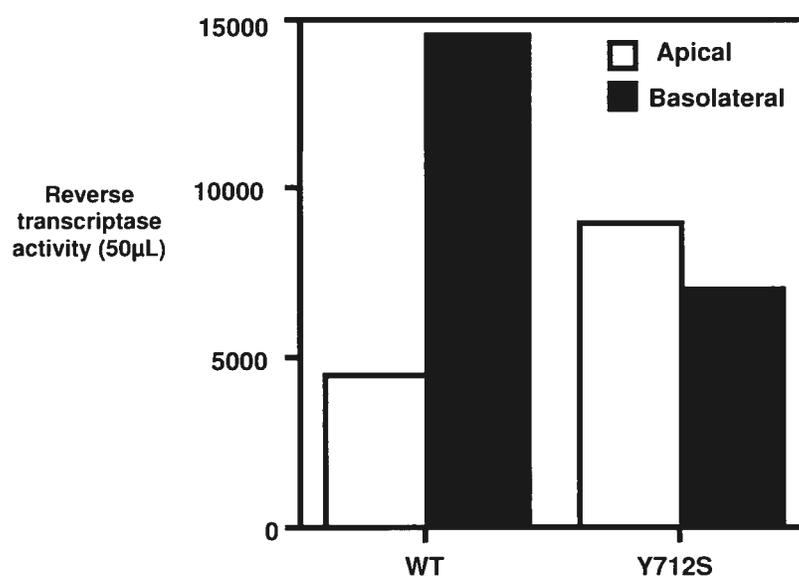


Fig. 4. Infectivity of viruses released from MDCK-T4/R4. Virus stock harboring wild type envelope glycoprotein (in a vpu+, nef- backbone) was generated by transfection of HEK293T cells. MDCK-T4/R4 cells were infected and media containing virus were recovered from apical and basolateral chambers. Total virus amount was determined by measuring reverse transcriptase activity. To determine virus infectivity, serial dilutions of viruses were used to infect the HeLa-CD4-LTR- β -Gal indicator cell line (MAGI cells). The number of positive (blue) infected cells was determined 48h later by staining for β -galactosidase activity. Results are presented as the average of two samples, with variations indicated by error bars, in a representative example out of five distinct experiments.

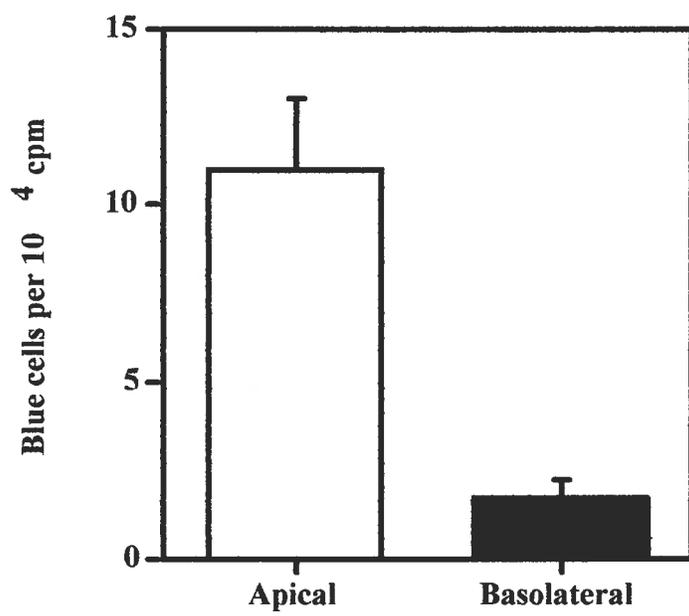


Fig. 5. Effect of viral accessory proteins Vpu and Nef on infectivity of viruses released from MDCK-T4/R4. Viral stocks of *vpu-/nef-* or *vpu+/nef+* NL4.3-based viruses harboring wild type envelope glycoprotein were generated by transfection of HEK293T cells. MDCK-T4/R4 cells were infected and media containing virus were recovered from apical and basolateral chambers and virus infectivity measured by the MAGI assay as in previous figure. Results are presented as the average of two samples with variations indicated by error bars and are representative of four distinct experiments.

